



HAL
open science

Caractérisation d'un anticorps à domaine unique dirigé contre la protéine S et potentialisant son activité anticoagulante

Josepha Sedzro

► To cite this version:

Josepha Sedzro. Caractérisation d'un anticorps à domaine unique dirigé contre la protéine S et potentialisant son activité anticoagulante. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris-Saclay, 2021. Français. <NNT : 2021UP-ASQ052>. <tel-03902487>

HAL Id: tel-03902487

<https://theses.hal.science/tel-03902487v1>

Submitted on 16 Dec 2022

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

Caractérisation d'un anticorps à domaine
unique dirigé contre la protéine S et
potentialisant son activité anticoagulante
*Characterization of an anti-protein S single-domain
antibody enhancing its anticoagulant activity*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569, Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué ITFA
Spécialité de doctorat : Sciences Pharmacologiques
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de Pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **HITH, UMR_S1176 (Université Paris-Saclay, Inserm)**, sous la direction de **Delphine BORGEL**, PU-PH et la co-direction de **François SALLER**, MCU

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 15 décembre 2021, par

Josepha SEDZRO

Composition du Jury

Philippe NGUYEN PU-PH, HDR, CHU de Reims	Président
Anne ANGELILLO-SCHERRER PU-PH, HDR, Université de Bern	Rapporteur & Examinatrice
Isabelle GOUIN-THIBAUT MCU-PH, HDR Université de Rennes	Rapporteur & Examinatrice
Catherine LEMARIÉ Chargée de recherche, HDR Université de Bretagne Occidentale	Examinatrice
Delphine BORGEL PU-PH, HDR Université Paris-Saclay	Directrice de thèse
François SALLER MCU, Université Paris-Saclay	Co-Directeur de thèse

Titre : Caractérisation d'un anticorps à domaine unique dirigé contre la protéine S et potentialisant son activité anticoagulante

Mots clés : Hémostase, thrombose, anticorps à domaine unique, anticoagulants circulants, stratégies antithrombotiques, anticorps thérapeutiques

Résumé : La protéine S (PS) est une protéine vitamine K-dépendante qui limite la génération de thrombine à plusieurs niveaux de la coagulation. En effet, la PS joue un rôle bien connu de cofacteur de la protéine C activée (PCa), en stimulant son activité dans l'inactivation des facteurs Va (FVa) et VIIIa (FVIIIa). La PS est également un cofacteur de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI α) dans l'inhibition directe du facteur Xa. Cependant, l'importance relative de ces activités de la PS n'est pas connue in vivo.

Afin de mieux comprendre les fonctions de la PS in vitro et in vivo, nous avons généré des nanobodies (anticorps à domaine unique produits chez les camélidés) dirigés contre la PS. Ces nanobodies ont été identifiés grâce à des stratégies variées de phage-display réalisées sur une banque immune obtenue à partir d'un lama immunisé avec de la PS recombinante humaine (rhPS). Parmi 14 nanobodies anti-PS identifiés (PS001 à PS014), le nanobody PS003 se liait fortement à la rhPS et présentait un effet de potentialisation tout à fait inattendu de l'activité cofacteur de la PCa de la PS, dans un test fonctionnel plasmatique. Nous avons donc choisi de caractériser ce nanobody plus en détail. Pour augmenter l'affinité du nanobody PS003 pour la PS, nous avons généré une forme bivalente du nanobody PS003 (PS003biv), mais seul un très faible gain d'affinité pour la rhPS, en ELISA, a été obtenu (constantes de dissociation apparentes de 26.8 ± 2.7 nM et 13.8 ± 5.7 nM pour PS003 et PS003biv, respectivement). En ELISA, les deux nanobodies reconnaissent le domaine SHBG isolé de la PS mais pas Gas6, qui est une protéine hautement homologue à PS et qui possède également un domaine SHBG. Ce résultat suggère donc que les nanobodies PS003 et PS003biv sont spécifiques de la PS. PS003 et PS003biv potentialisent tous deux l'activité cofacteur de la PCa de la PS (de 40 % et 80 % respectivement) dans un test de coagulation plasmatique, et de façon intéressante le nanobody PS003biv présente un effet de potentialisation plus important.

Aucun effet de potentialisation de ces nanobodies n'a été observé sur l'activité de cofacteur du TFPI α de la PS en système purifié. Nous avons ensuite évalué le potentiel effet anti-thrombotique de PS003biv dans un modèle murin de thrombose induite par du chlorure de fer au niveau de la microcirculation du mésentère. L'injection de PS003biv (IV 10 mg/kg) a prolongé le temps d'occlusion dans les veinules mésentériques par rapport à un nanobody contrôle et semble induire la formation de thrombi instables et très susceptibles de former des embolies. De façon intéressante, dans un modèle de saignement de type « tail-clip », les souris injectées avec PS003biv (IV 10 mg/kg) ont un temps de saignement et un volume de sang perdu normaux, comparativement à des souris non injectées.

En conclusion, le nanobody PS003biv potentialise l'activité cofacteur de la PS sur la PCa et présente un effet anti-thrombotique in vivo, sans affecter l'hémostase physiologique. Ainsi, l'augmentation de cette activité de la PS avec PS003biv pourrait constituer une stratégie thérapeutique anti-thrombotique originale. À l'heure actuelle, le mécanisme d'action des nanobodies PS003 et PS003biv reste inconnu, probablement complexe, et pourrait faire intervenir un autre partenaire de la PS que la PCa. En effet, nous n'avons pu retrouver l'effet de potentialisation de PS003 et PS003biv observé dans le test de coagulation plasmatique dans un test d'inactivation du FVa ou du FVIIIa par la PCa en présence de PS.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse apportent également une preuve de concept que des nanobodies anti-PS modulant l'activité anticoagulante de la PS peuvent être identifiés. Ces travaux pourraient ouvrir la voie à des stratégies de sélection par phage-display visant à identifier des nanobodies bloquant spécifiquement l'activité cofacteur de la PCa et du TFPI α .

Title : Characterization of an anti-protein S single-domain antibody enhancing its anticoagulant activity

Keywords : hemostatic proteins, thrombosis, single-domain antibodies, physiological anticoagulants, antithrombotic strategies, therapeutic antibodies

Abstract: Protein S (PS) is a vitamin K-dependent protein that limits thrombin generation at multiple levels of the coagulation cascade. Indeed, PS is well-known as a non-enzymatic cofactor for activated protein C (APC) in the proteolytic inactivation of factors Va (FVa) and VIIIa (FVIIIa). More recently, PS has also been described as a cofactor for the alpha isoform of tissue factor pathway inhibitor (TFPI α) in the direct inhibition of factor Xa (FXa). However, the relative importance of these anticoagulant activities of PS in vivo is not known.

In order to better characterize the functions of PS in vitro and in vivo, we aimed at generating nanobodies (single-domain antibodies produced in camelids) targeting PS. These nanobodies were identified after various phage-display strategies using an immune library obtained from a llama immunized with recombinant human PS (rhPS). Among 14 anti-PS nanobodies identified to date (PS001 to PS014), PS003 nanobody was found to strongly bind to rhPS and to exhibit an unexpected enhancing effect on the APC-cofactor activity of rhPS in a plasma-based assay. We have therefore chosen to characterize this nanobody into more detail. To increase its affinity for PS, we generated a bivalent form of the PS003 nanobody (PS003biv), but this only led to a very slight increase in the affinity for rhPS in ELISA (apparent dissociation constants of 26.8 ± 2.7 nM and 13.8 ± 5.7 nM for PS003 and PS003biv, respectively). In ELISA, both nanobodies bound to the isolated SHBG domain of PS but not to Gas6, which is highly homologous to PS and also contains a SHBG domain. This suggested that PS003 and PS003biv were specific for PS. PS003 and PS003biv both increased the APC-cofactor activity of PS (of 40% and 80% respectively) in our plasma-based assay, and interestingly, PS003biv nanobody exhibits a greater enhancing effect than PS003.

No enhancing effect of these nanobodies was observed on the TFPI α -cofactor activity of rhPS in purified systems. We then evaluated the anti-thrombotic potential of PS003biv in a ferric chloride-induced murine thrombosis model on mesenteric microvessels. The injection of PS003biv (IV 10 mg/kg) delayed occlusion time in mesenteric venules compared to a control nanobody and induced the formation of unstable thrombi that were prone to form emboli. Interestingly, in a tail-clip bleeding model, mice injected with PS003biv (IV 10 mg/kg) have normal bleeding times and blood loss volumes.

In conclusion, our PS003biv nanobody enhanced the APC-cofactor activity of PS and exhibited an anti-thrombotic effect in vivo, without affecting physiological hemostasis. Thus, the enhancement of this anticoagulant activity of PS with PS003biv could constitute an original and safe anti-thrombotic therapeutic strategy. To date, the mechanism of action of PS003 and PS003biv nanobodies remains unknown and is probably complex. PS003biv might affect the interaction of PS with a yet unidentified partner other than APC, as we were unable to recapitulate the enhancing effect of PS003 and PS003biv observed in our plasma-based assay in a FVa or FVIIIa inactivation assay by APC in the presence of PS.

This PhD work also provides a proof of concept that anti-PS nanobodies modulating the anticoagulant activity of PS can be identified. This work could pave the way for phage-display selection strategies aimed at identifying nanobodies that specifically inhibit the APC- or TFPI α - cofactor activity of PS.

Table des matières

Table des matières	5
Liste des figures et tableaux	11
Liste des sigles et abréviations	13
Remerciements	16
INTRODUCTION	19
Préambule	21
La cascade de la coagulation et la génération de thrombine	21
L'inhibition de la coagulation	24
La Protéine S (PS), un inhibiteur physiologique de la coagulation	25
Chapitre 1 – Généralités sur la Protéine S (PS)	29
1.1. Structure de la Protéine S	29
1.1.1. Domaine Gla	31
1.1.2. Boucle sensible à la thrombine (TSR)	32
1.1.3. Domaines EGF	33
1.1.4. Domaine SHBG	33
1.2. Gas6, une protéine homologue à la PS	34
1.3. Différents pools physiologiques de PS	35
1.3.1. Types cellulaires exprimant la PS	35
1.3.2. PS plasmatique	36
1.3.2.1. PS libre et PS liée à la C4BP.....	36
1.3.2.2. PS clivée.....	37
1.3.3. PS endothéliale	39
1.3.4. PS plaquettaire	39
Chapitre 2 – Activités anticoagulantes de la PS	41
2.1. Activité cofacteur de la Protéine C activée (PCa)	41
2.1.1. Généralités sur la PCa	41
2.1.2. Inactivation du FVa	43
2.1.2.1. FV et activation	43
2.1.2.2. Inactivation du FVa par la PCa et la PS.....	45
2.1.2.3. Mécanisme d'action de la PS dans l'inactivation du FVa	46
2.1.2.4. Relations structure/fonction dans l'activité cofacteur de la PS lors de	

l'inactivation du FVa	49
2.1.3. Inactivation du FVIIIa.....	51
2.1.3.1. FVIII et activation	51
2.1.3.2. Inactivation du FVIIIa par la PCa	53
2.1.3.3. Cofacteurs de la PCa dans l'inactivation du FVIIIa	54
2.2. Activité cofacteur de l'Inhibiteur de la Voie du Facteur Tissulaire α (TFPIα).....	57
2.2.1. Généralités sur le TFPIα.....	57
2.2.2. Activités anticoagulantes du TFPIα.....	60
2.2.3. Activité cofacteur du TFPIα de la PS.....	62
2.2.3.1. Rôle de la PS dans l'inhibition du FXa	62
2.2.3.2. Mécanisme d'action de la PS dans l'inhibition du FXa.....	64
2.2.3.3. Effet cofacteur synergique du FV et du FV-short sur la PS.....	65
2.2.3.4. Relation structure/fonction de l'activité cofacteur du TFPI α de la PS	68
2.2.3.5. Importance de la formation du complexe entre la PS, le TFPI α , le FV/FV-short et le FXa.....	69
2.3. Activités d'inhibition directe de la PS.....	72
2.3.1. Inhibition directe du complexe prothrombinase	72
2.3.2. Inhibition directe du complexe ténase intrinsèque	74
2.4. Complexité des activités anticoagulantes de la PS.....	75
Chapitre 3 – Activités non anticoagulantes de la PS	79
3.1. Généralités sur la famille des récepteurs TAM.....	80
3.2. Rôle de la voie PS/TAM dans l'inflammation.....	81
3.2.1. Efférocytose.....	82
3.2.2. Régulation de l'expression de cytokines de l'inflammation	84
3.3. Rôle de la voie PS/TAM dans le système vasculaire.....	85
3.3.1. Rôle de la PS dans cellules endothéliales.....	85
3.3.2. Rôle de la PS dans les cellules musculaires lisses	87
3.3.3. Rôle de la PS dans les leucocytes circulants	88
3.3.4. Rôle de la voie PS/TAM dans les plaquettes	89
3.4. Bases moléculaires de l'activation des TAM par la PS	90
Chapitre 4 – Importance physiologique de la PS	91
4.1. Importance physiologique de la PS chez l'homme	91
4.1.1. Manifestations cliniques des déficits en PS.....	91

4.1.2.	Différents types de déficit congénitaux en PS	93
4.1.3.	Diagnostic d'un déficit congénital en PS	94
4.1.4.	Déficits acquis en PS	96
4.1.4.1.	Déficits acquis auto-immuns.....	96
4.1.4.2.	Déficit en PS non spécifique : l'exemple de la drépanocytose.....	97
4.2.	Modèles murins de déficit en PS	99
4.2.1.	Souris knock-out <i>Pros1</i>^{-/-} et <i>Pros1</i>^{+/-}	99
4.2.2.	Souris knock-out conditionnelles <i>Pros1</i>^{Lox/Lox}	101
4.2.3.	Souris <i>Pros1</i>^{Lox/Lox} x PF4-Cre⁺ déficitaires en PS plaquettaire	103
4.2.4.	Souris knock-in PS-K196E	104
4.2.5.	Souris double knock-out <i>F8</i>^{-/-}<i>Pros1</i>^{-/-} et <i>F9</i>^{-/-}<i>Pros1</i>^{-/-}	105
4.2.6.	Importance de la PS dans le développement des hémarthroses hémophiliques	107
Chapitre 5 – Les anticorps à domaine unique (VHHs)		111
5.1.	Immunoglobulines G conventionnelles et les anticorps à chaîne lourde 111	
5.1.1.	Les immunoglobulines G conventionnelles	111
5.1.2.	Les anticorps à chaîne lourde unique	113
5.2.	Propriétés des VHHs	114
5.2.1.	Structure des VHHs	114
5.2.2.	Différences entre les VHs et les VHHs	115
5.2.3.	Identification et expression de VHHs recombinants	116
5.3.	Propriétés des VHHs	118
5.3.1.	Stabilité	118
5.3.2.	Immunogénicité	118
5.3.3.	Reconnaissance de l'antigène	119
5.3.4.	Demie-vie	119
5.4.	Applications des VHHs	120
Problématique de la thèse		122
RÉSULTATS		128
DISCUSSION		167
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		181

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : La cascade de la coagulation et ses principaux inhibiteurs physiologiques

Figure 2 : Structures schématiques de la PS

Figure 3 : PS clivée

Figure 4 : PS libre et PS liée à la C4BP

Figure 5 : Schéma de la PC et de la PCa

Figure 6 : Structure du FV, de la sécrétion à son inactivation

Figure 7 : Activité cofacteur de la PCa de la PS dans l'inactivation du FVa

Figure 8 : Effet de la PS et du FVa sur l'affinité de la PCa pour les phospholipides anioniques

Figure 9 : Complexe tri-moléculaire formé par la PS, la PCa et le FVa au niveau des PLs

Figure 10 : Structure du FVIII, de la sécrétion à son inactivation

Figure 11 : Activité cofacteur de la PCa de la PS dans l'inactivation du FVIIIa

Figure 12 : Schéma du TFPI α et des zones d'interactions avec ses partenaires

Figure 13 : Distribution du TFPI chez l'homme

Figure 14 : Inactivation du FXa par le TFPI α

Figure 15 : Effets des cofacteurs du TFPI α dans l'inhibition du FXa

Figure 16 : Modèle représentant les résidus importants pour l'interaction entre la PS et le TFPI α

Figure 17 : Complexe tri-moléculaire formé par le TFPI α , la PS et le FV/FV-short dans l'inhibition du FXa

Figure 18 : Les différentes activités anticoagulantes de la PS

Figure 19 : Les multiples interactions de la PS avec les protéines de la coagulation

Figure 20 : Schéma de l'interaction entre les récepteurs TAM et la PS ou Gas6

Figure 21 : Rôles de la voie PS/TAM dans l'inflammation

Figure 22 : Lésions causées par un purpura fulminans

Figure 23 : Embryons et cerveau des souris Pros1^{-/-}

Figure 24 : Dysgenèse vasculaire chez les embryons $Pros1^{+/+}$ (WT) et $Pros1^{-/-}$

Figure 25 : Immunoglobuline conventionnelle et anticorps à chaîne lourde (HCAb) chez les camélidés

Figure 26 : Structure cristallographique du complexe formé entre le caplacizumab sous forme monovalente et le domaine A1 du VWF

Figure 27 : Résumé des étapes menant à la sélection de VHHs d'intérêts

Figure 28 : Stratégie de sélection « non spécifique » de VHHs anti-PS.

Figure 29 : Effet de VHHs anti-PS sur l'activité cofacteur de la PCa de la PS dans un test commercial du temps de coagulation

Figure 30 : Effet des VHHs sur l'activité cofacteur de la PCa de la PS lors du clivage du FVIIIa en système purifié

Figure 31 : Sélection ciblée de VHHs inhibant l'interaction PS/TFPI α par une élution compétitive

Tableau 1 : Classification actuelle et proposée des déficits en PS

Tableau 2 : Tableau résumant les différents modèles murins de PS ainsi que les principaux phéno-types associés et les conclusions qui en découlent

Liste des sigles et abréviations

a : activé
aa : acide aminé
AR : région acide
Arg : arginine
Asn : acide asparagine
Asp : acide aspartique
AT : antithrombine
BHE : barrière hémato-encéphalique
BR : région basique
Ca²⁺ : ions calcium
Cu²⁺ : ions cuivre
CCP : domaine des protéines de contrôle du complément
CDR1 : région de complémentarité 1
CH : domaine constant de la chaîne lourde
CIVD : coagulation intravasculaire disséminée
CL : domaine constant de la chaîne légère
COO⁻ : groupement carboxylique
Cys : cystéines
C4BP : la protéine liant le composant du complément 4b
E : jour embryonnaire
EGF : domaine homologue au facteur de croissance épidermique
ELISA : dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
EP : embolies pulmonaires
EPCR : récepteur endothéliale de la PC
F : facteur
FII : prothrombine
FIIa : thrombine
Fab : fragment de liaison à l'antigène
Fc : fragment cristallisable
FeCl₃ : chlorure de fer
Fi : facteur inactif
FR : région charpente
FRET : transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
FT : facteur tissulaire
Fv : fragment variable
GAG : glycosaminoglycanes
Gas6 : gène spécifique d'arrêt de croissance
Gla : acide γ -carboxyglutamique
Glu : acide glutamique
GPI : ancre glycosylphosphatidylinositol

HBE: exosite de liaison à l'héparine
HCAbs : anticorps à chaîne lourde
Hya: acide hydroxyaspartique
Hyn: acide hydroxyasparagine
IFNAR : récepteur des interférons de type I
ICAM-1 : protéine d'adhésion intercellulaire
Ig : domaine immunoglobulines
IgG : immunoglobulines de type G
IL: interleukine
ISTH : Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase
K : domaine Kunitz
K_d: constante de dissociation
kDa : kilodalton
K_i : constante de dissociation
LG: domaine G des laminines
-OH : groupement hydroxyle
P : propeptide
PA : peptide d'activation
PC: protéine C
PCa: Protéine C activée
PLs: phospholipidiques anioniques
PS : Protéine S
PtdSer: phosphatidylsérine
PZ : Protéine Z
rhPS : Protéine S humaine recombinante
rmPS : Protéine S murine recombinante
RPE : épithélium pigmentaire rétinien
RvD1 : résolvine D1
S : peptide signal
Ser : sérine
Serpine : inhibiteur de sérine protéases
SHBG: domaine homologue à la protéine de liaison aux hormones sexuelles
scFv : fragment variable à chaîne unique
sdAb : anticorps à domaine unique
SOCS1 : protéine inhibitrice de la signalisation de cytokines 1
SPR : résonance plasmonique de surface
STAT1: transducteur de signal et activateur de transcription 1
TAM : récepteurs Tyro3, Axl, et MerTK
TFPI : inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
Thr : thréonine
TLRs : récepteurs Toll-like
TM : thrombomoduline
TNF : facteur de nécrose tumorale

TSR : boucle sensible à la thrombine
TVP : thromboses veineuses profondes
Tyr : tyrosine
VCAM-1 : protéine d'adhésion aux cellules vasculaires 1
VH : domaine variable de la chaîne lourde
VHH : domaine variable des anticorps à chaîne lourde
VL : domaine variable de la chaîne légère
VWF : facteur de von Willebrand
ZPI : inhibiteur de protéases dépendant de la protéine Z

Remerciements

Avant toute chose, je remercie mon directeur de thèse Delphine Borgel de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer son équipe de recherche. Je la remercie de m'avoir confié un projet de recherche si intéressant et passionnant. Merci pour le temps qu'elle a consacré pour me conseiller et me guider tout au long de cette thèse. Ses conseils m'ont aidé à rester concentrée et focalisée sur mes objectifs. Ce que je retiens particulièrement de ses conseils est de toujours donner le meilleur de moi-même dans tout ce que j'entreprends pour en tirer le maximum. Je remercie aussi mon directeur de thèse François Saller qui a toujours été à mes côtés et qui a toujours été disponible et très présent pour moi tout au long de ma thèse. Je le remercie de m'avoir beaucoup soutenu et d'avoir été très patient avec moi. Merci pour toutes les explications qu'il m'a apportées, pour toutes ses brillantes suggestions et ses remarques ainsi que nos discussions qui m'ont beaucoup aidé à apprendre. Je le remercie également pour sa gentillesse, son optimisme et sa capacité à voir le bon côté des choses dans toutes les circonstances. Grâce à lui, ces années de doctorat ont été très épanouissante pour moi, malgré les difficultés que j'ai pu rencontrer. Je remercie Frédéric Adam, Allan de Carvalho, Elsa Bianchini et Ivan Peyron d'avoir consacré une partie de leur précieux temps pour m'apprendre de nombreuses choses et pour m'avoir aidé tout au long de ma thèse. En particulier, merci à Elsa Bianchini et Ivan Peyron d'avoir été très disponible pour moi dès que j'en avais besoin et pour toutes les expériences qu'ils m'ont aidés à mettre au point. Merci à Sadyo Darame pour l'aide précieuse qu'elle m'a apporté à tous les niveaux, et en particulier dans la purification des VHHs et aussi pour les ELISAs. Merci à toutes les autres personnes qui m'ont aidé dans mes recherches et qui ont participé à l'avancée de ce projet. Je remercie Tilman Hackeng de m'avoir généreusement offert du TFPI α ainsi que Laurent Frentzel de m'avoir également généreusement offert un anticorps de détection du FVIII humain pour réaliser mes expériences. Je remercie les autres doctorants avec qui j'ai passé beaucoup de temps, pour la bonne ambiance et pour leur

gentillesse, en particulier Miao Feng, Kathia Beddek, Stephen Ferrière, Sénadé Atsou, Thibaud Sefiane, Alexis Texier et Jean Solarz. Je remercie aussi toute ma famille et mes amis pour leur soutien et en particulier ma mère pour son soutien sans failles et pour avoir toujours été présente pour moi toutes ces années.

INTRODUCTION

Préambule

La cascade de la coagulation et la génération de thrombine

La thrombine est une enzyme de type sérine protéase largement impliquée dans des processus physiologiques comme l'hémostase et l'inflammation, mais également dans des processus pathologiques, comme la thrombo-inflammation. Actuellement, la thrombine est même reconnue comme un médiateur central d'un nombre varié de pathologies thrombo-inflammatoires comme le sepsis ou la drépanocytose. La thrombine exerce ses effets en générant de la fibrine à partir de fibrinogène, mais également en activant les plaquettes, ou en exerçant des effets pro-inflammatoires sur l'endothélium vasculaire (1). La compréhension des mécanismes permettant de limiter la génération ou les effets cellulaires de la thrombine apparaît donc cruciale pour mieux comprendre la physiopathologie de ces pathologies thrombo-inflammatoires, ainsi que pour définir de nouvelles approches thérapeutiques. De plus, même dans le cas de processus physiologiques comme l'hémostase et l'inflammation, il est crucial que la thrombine soit très finement régulée.

La thrombine est générée par le système de la coagulation. Ce système très complexe consiste en une série d'activations en cascade des facteurs de la coagulation présents dans le plasma, et qui culmine dans la génération de thrombine (**Figure 1**). Ces activations sont des réactions enzymatiques de protéolyse limitée qui sont fortement accélérées en présence de phospholipides anioniques (PLs) tels que la phosphatidylsérine (PtdSer). Cette PtdSer est notamment relocalisée à la surface des plaquettes, depuis la face interne de la bicouche lipidique membranaire, lorsque les plaquettes sont activées.

On distingue deux voies d'activation de la coagulation. Un premier mode d'activation est la voie « intrinsèque » (ou voie contact) mettant en jeu l'activation du Facteur (F) XI par le FXII activé (a). Le FXII est activé au contact de surfaces ou de molécules chargées négativement (**Figure 1**), comme par exemple les polyphosphates libérés par les plaquettes (2). Un second mode d'activation de la coagulation est la voie « extrinsèque » (ou voie du facteur tissulaire) et dépend de la formation d'un complexe entre le FVIIa et le facteur tissulaire (FT).

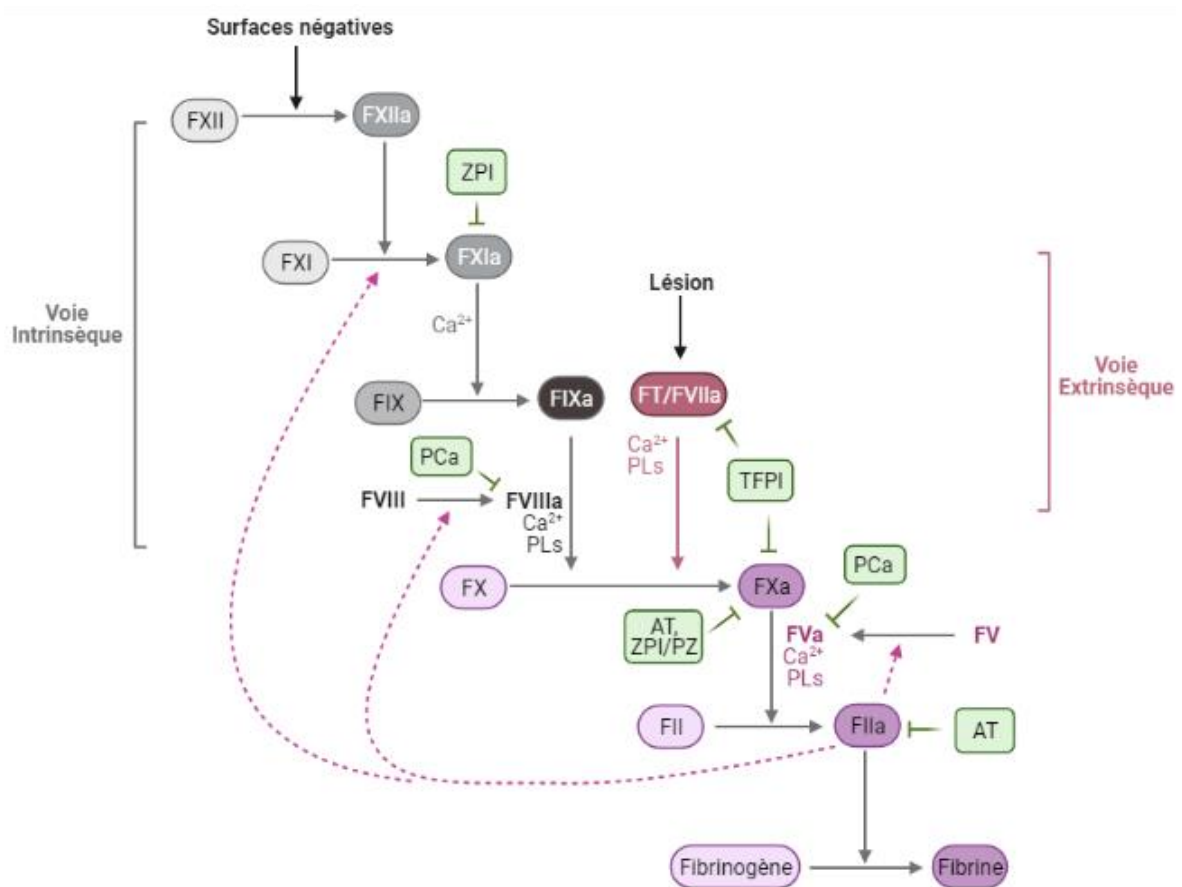


Figure 1 : La cascade de la coagulation et ses principaux inhibiteurs physiologiques. La cascade de la coagulation est physiologiquement activée suite à une exposition ou expression du FT (voie extrinsèque). Une série de réactions en cascade mène à la génération de thrombine puis de fibrine qui va consolider le caillot de plaquettes. Une autre voie d'activation de la coagulation est possible au contact de surfaces chargées négativement (voie intrinsèque). Les protéines anticoagulantes (représentées en vert) agissent à différents niveaux de la cascade pour limiter la génération de thrombine.

Le FT n'entre normalement pas en contact avec le sang car il n'est naturellement présent que dans le compartiment extravasculaire sous-endothélial, où il est exprimé par les cellules entourant les vaisseaux sanguins, comme les cellules musculaires lisses ou les fibroblastes (3,4). Le FT peut devenir exposé au sang dans plusieurs types de situations, par exemple à la suite d'une brèche vasculaire lors de l'hémostase, ou lorsqu'il est exprimé par les monocytes ou les cellules endothéliales, lorsque ces cellules sont activées lors d'un processus thrombo-inflammatoire. Le FT joue un rôle de cofacteur du FVIIa, et la formation du complexe FT/FVIIa active ce dernier et initie la coagulation. La cascade de la coagulation est traditionnellement décrite comme un processus se déroulant en trois étapes principales composées de l'initiation, de l'amplification (ou propagation), et de la limitation et extinction de la génération de thrombine (4).

Lors de l'initiation de la coagulation, le complexe FT/FVIIa forme le complexe ténase « extrinsèque », qui active le FX en FXa, mais peut également activer le FIX en FIXa. Le FXa généré va ensuite activer la prothrombine en thrombine, mais à ce niveau d'activation de la coagulation, de faibles quantités de thrombine sont générées. Ces quantités sont vraisemblablement suffisantes pour activer les cellules endothéliales et les plaquettes, mais insuffisantes pour cliver le fibrinogène en fibrine. Afin de pouvoir générer un réseau de fibrine, la thrombine est néanmoins capable d'amplifier sa propre formation en activant le FXI, qui appartient à la voie intrinsèque, ainsi que les cofacteurs de la coagulation, le FV et le FVIII.

L'activation des cofacteurs Va (FVa) et VIIIa (FVIIIa) est particulièrement importante pour l'amplification de la génération de thrombine car ceux-ci augmentent considérablement (d'environ 10^5 fois) l'activité du FXa et du FIXa, respectivement. En effet, le FVIIIa forme d'une part le complexe ténase « intrinsèque » avec le FIXa activé par le FXIa, les PLs, et les ions Ca^{2+} , pour activer très efficacement le FX. D'autre part, le FVa forme le complexe prothrombinase avec le FXa, les PLs, et les ions Ca^{2+} , pour générer de grandes quantités de thrombine capables de cliver le fibrinogène et de générer de la fibrine.

La génération d'un réseau de fibrine à la surface des plaquettes permet la formation d'un caillot fibrino-plaquettaire composé de plaquettes agrégées et de fibrine réticulée. Finalement, l'activation du FXIII par la thrombine permet de consolider le caillot en favorisant la formation de liaisons covalentes entre les chaînes de fibrine (5). Ce caillot consolidé est capable d'obstruer de façon stable la brèche vasculaire et d'arrêter les saignements, lors de l'hémostase.

L'activation des plaquettes et l'activation de la coagulation sont des mécanismes décrits de façon séparée, mais ce sont en fait des processus intriqués qui agissent de façon coopérative et simultanée. Ceci est particulièrement illustré par la capacité de la thrombine à activer fortement les plaquettes au cours de la phase d'amplification/propagation de la coagulation, mais également par le rôle important joué par les PLs exposés par les plaquettes dans l'amplification des réactions de la coagulation.

L'inhibition de la coagulation

La génération de thrombine par le système de la coagulation se doit d'être finement régulée, et ceci est en particulier assuré par des protéines anticoagulantes naturelles. Ces protéines anticoagulantes agissent de façon ciblée, à plusieurs niveaux de la cascade de la coagulation, pour limiter et/ou éteindre la génération de thrombine (**Figure 1**) (3).

Parmi ces inhibiteurs physiologiques de la coagulation, on retrouve l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), la protéine C activée (PCa), l'antithrombine (AT), et l'inhibiteur de protéases dépendant de la protéine Z (ZPI). La coagulation étant initiée par la voie du FT, c'est celle-ci qui est la première à être régulée par son inhibiteur, le TFPI. Le TFPI exerce son activité anticoagulante en formant un complexe avec le FT/FVIIa et le FXa qui a été généré lors des phases précoces de la coagulation, ce qui inhibe les activités procoagulantes du complexe FT/FVIIa et du FXa (**Partie 2.2**).

Le ZPI et l'AT appartiennent à la famille des inhibiteurs de sérine protéases (serpines), et à ce titre, sont capables d'inhiber les facteurs activés qui sont des sérine protéases. Ainsi, le ZPI inhibe le FXa et le FXIa. L'AT inhibe principalement le FXa et la thrombine, mais également le FVIIa, le FIXa ou le FXIa. La PCa, quant à elle, inhibe les complexes ténase intrinsèque et prothrombinase, en inactivant de façon protéolytique les cofacteurs FVa et FVIIIa (**Partie 2.1**).

La Protéine S (PS), un inhibiteur physiologique de la coagulation

En 1977, un doctorant de l'équipe d'Earl Davie identifie pour la première fois une protéine présentant une activité anticoagulante, lors de la purification d'autres facteurs de la coagulation à partir de plasma bovin. Cette équipe décide alors de l'appeler « Protéine S » en hommage à Seattle, la ville où elle a été découverte (6). Initialement, les chercheurs ont pensé que la Protéine S (PS) était une enzyme et ont essayé d'identifier, en vain, son activité enzymatique (7,8). En revanche, ceux-ci ont rapidement mis en évidence que la PS interagissait fortement avec les PLs (9) et que c'était une protéine dont l'expression dépendait de la vitamine K, comme de nombreux autres facteurs de la coagulation (10).

Quelques années plus tard, le rôle cofacteur de la PS sur la PCa dans l'inactivation du FVa et du FVIIIa a été découvert par Frederick Walker en 1980 et en 1987, respectivement (7,11) (**Figure 18**). De nombreuses études ont depuis confirmé cette activité historique de la PS, mais l'ensemble des études cinétiques montraient que la PS n'augmentait que d'environ 2-20 fois et de 6-7 fois l'inactivation des FVa et FVIIIa par la PCa, respectivement (**Partie 2.1**). Cette potentialisation modeste de la PCa a conduit d'autres équipes de recherche à questionner l'existence de nouvelles activités anticoagulantes de la PS, indépendantes de la PCa. C'est ainsi que des activités inhibitrices directes des complexes ténase (12) et prothrombinase (13-15) ont été décrites, mais celles-ci ont été controversées ou restent encore à être confirmées (**Partie 2.3**).

En 2006, l'équipe de Tilman Hackeng a mis en évidence, de façon plus convaincante, que la PS jouait un rôle de cofacteur de l'isoforme α du TFPI (TFPI α) dans l'inhibition du FXa (16) (**Figure 18**). Cette « nouvelle » activité cofacteur de la PS a été confirmée par d'autres équipes, et elle est depuis largement acceptée par la communauté scientifique (**Partie 2.2**). Une autre activité anticoagulante, indépendantes de la PCa et du TFPI α ont été rapportées dans la littérature, et suggère que la PS inhibe directement le FIXa (**Partie 2.3.2**).

La recherche sur la PS a pris un nouvel essor, au-delà du cadre de l'hémostase et de la thrombose, lorsque des fonctions non anticoagulantes de la PS ont été décrites. Ces fonctions sont reliées à une activation de récepteurs cellulaires à la surface de cellules variées, y compris extravasculaires : les récepteurs Tyro3, Axl, et MerTK (récepteurs TAM) (**Chapitre 3**). Il reste encore à déterminer si ces activités cellulaires peuvent contribuer aux propriétés antithrombotiques de la PS, mais ces activités sont clairement à prendre en compte lors de l'étude de la PS *in vivo* ou lors de la modulation de la PS à visée thérapeutique.

Les différents effets anticoagulants de la PS ont été décrits dans des systèmes d'étude *in vitro*, en systèmes purifiés ou dans des tests de coagulation plasmatique. Néanmoins, il reste difficile d'évaluer *in vitro* l'importance relative de chacune des activités anticoagulantes de la PS. L'importance physiologique de la PS est attestée par les manifestations thrombotiques observées chez les patients déficitaires en PS, en particulier les patients présentant des déficits sévères (héréditaires ou acquis) (**Partie 4.1**). L'établissement, plutôt récente, de différents modèles murins de déficits en PS a également permis de confirmer l'importance physiologique de la PS, mais également d'obtenir des informations précieuses sur les lieux d'action de la PS *in vivo* (**Partie 4.2**). À nouveau, ces modèles ne permettent pas encore d'évaluer l'importance relative des activités anticoagulantes de la PS *in vivo*, soulignant le besoin de développer de nouveaux outils pour répondre à cette question.

La problématique de ma thèse s'inscrit dans ce contexte, avec le développement d'anticorps à domaine unique (VHHs) ciblant la PS. En effet, l'utilisation de tels anticorps produits chez le lama présente de nombreux avantages, en particulier de pouvoir cibler des régions cryptiques et non accessibles aux anticorps conventionnels (**Partie 5**). De plus, ces VHHs peuvent être sélectionnés à partir de larges banques de VHHs très diverses, par des techniques de phage display à haut débit. Ainsi, il est théoriquement possible d'envisager l'identification de VHHs reconnaissant des zones enfouies de la PS, et donc une modulation des activités anticoagulantes de la PS de façon tout à fait originale et inattendue. Également, l'identification de VHHs ciblant spécifiquement chacune des activités anticoagulantes (ou même cellulaires) de la PS peut être proposée, ce qui permettrait d'évaluer plus en détail l'importance relative des différentes activités de la PS entre elles (**discuté dans la partie « problématique de la thèse »**).

Chapitre 1 – Généralités sur la Protéine S (PS)

1.1. Structure de la Protéine S

La PS est exprimée sous la forme d'un précurseur comportant 676 acides aminés (aa) (**Figure 2A**). Cette forme contient encore un peptide signal permettant l'adressage au réticulum endoplasmique, ainsi qu'un propeptide qui est le site de liaison pour l'enzyme responsable de la γ -carboxylation de la PS dans le réticulum endoplasmique. À la suite de sa traduction et de ses modifications post-traductionnelles, la PS est finalement synthétisée sous sa forme mature, qui est une protéine modulaire de 75 kDa (kilodalton), composée de 635 aa. Cette forme mature est débarrassée de son peptide signal et de son propeptide, et est composée d'un domaine riche en acides γ -carboxyglutamiques (domaine Gla), qui est la cible de la γ -carboxylation (résidus 1-46), d'une région appelée « boucle sensible à la thrombine » (TSR pour « thrombin-sensitive region » en Anglais) (résidus 47-75), de quatre domaines homologues au facteur de croissance épidermique (EGF) (EGF 1 à 4 ; résidus 76-242), et d'un large domaine homologue à la protéine de liaison aux hormones sexuelles (SHBG) (résidus 258-625) (**Figure 2A**) (17,18). La numérotation des résidus utilisée au cours de cette thèse se réfère à la forme mature de la PS.

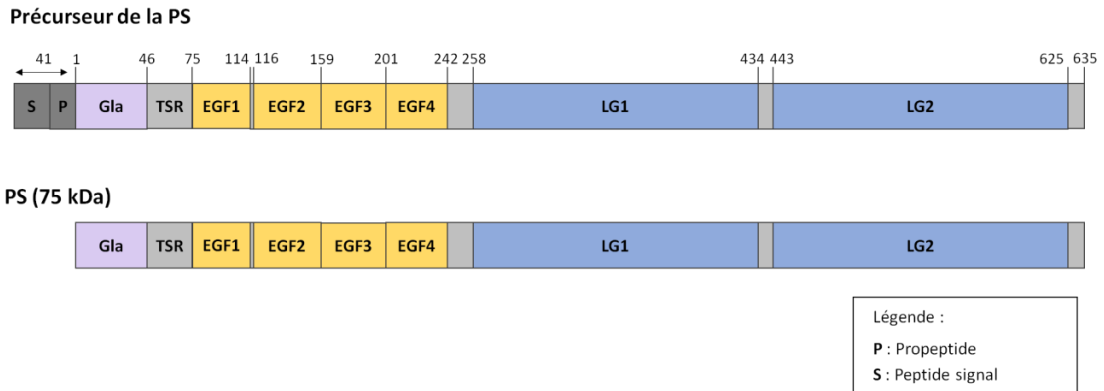
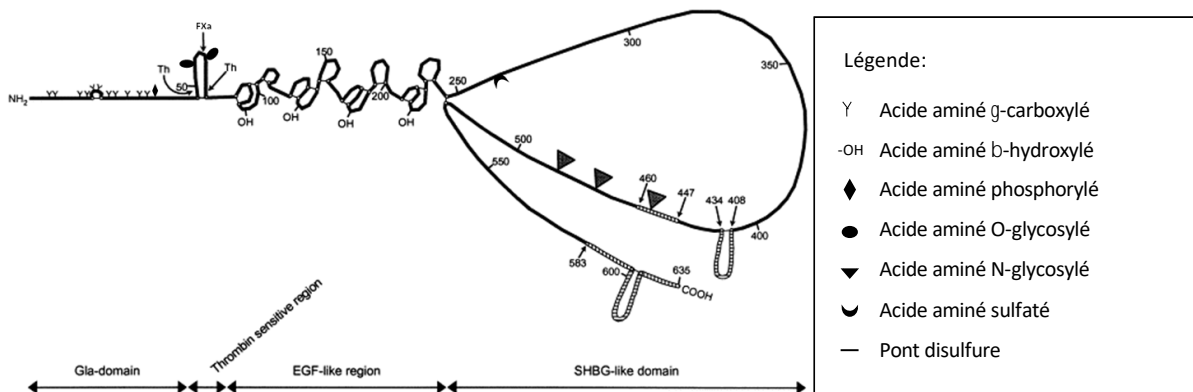
A**B**

Figure 2 : Structures schématiques de la PS. A) Schéma du précurseur de la PS et de la PS mature, (basée sur les données Uniprot). La PS mature, débarrassée de son peptide signal (S) et de son propeptide (P) est une protéine de 75 kDa composée de quatre domaines distincts : le domaine Gla, la TSR, quatre domaines EGF (EGF1-4), et un domaine SHBG composé de deux domaines LG (domaine G des laminines). **B) Structure de la PS avec les modifications post-traductionnelles.** Le domaine Gla de la PS est composé de onze acides aminés γ -carboxylés. La TSR comporte deux sites de clivage à la thrombine et un site de clivage au FXa, ainsi que deux acides aminés O-glycosylés. Chacun des domaines EGF de la PS comprend un acide aminé β -hydroxylé. Enfin, le large domaine SHBG est composé de trois sites de N-glycosylation (situés dans le domaine LG2) ainsi que d'un potentiel site de sulfatation sur tyrosine dans le domaine LG1. Figure tirée de Van de Poel *et al.*, Trends Cardiovasc Med, 2000 (19), avec la permission de l'éditeur.

1.1.1. Domaine Gla

Située à l'extrémité N-terminale, le domaine Gla N-terminal de la PS est composé de 46 aa (**Figure 2**) et inclut une région riche en résidus aromatiques (« aromatic stack », résidus 38-46). Ce domaine comporte onze résidus acide glutamique (Glu) (Glu6, 7, 14, 16, 19, 20, 25, 26, 29, 32, 36) qui sont γ -carboxylés en résidus acide γ -carboxyglutamique (Gla), par une modification enzymatique post-traductionnelle dépendant de la vitamine K. Cette γ -carboxylation est également observée sur toutes les protéines de la coagulation dites « vitamine K-dépendantes » (FII, FVII, FIX, FX, protéine C, PS, protéine Z). Par conséquent, l'ensemble de ces protéines possèdent un domaine Gla N-terminal, et la γ -carboxylation du domaine Gla au sein de ces protéines est cruciale pour leur biosynthèse et leurs activités biologiques (20,21). Dans le reticulum endoplasmique, une γ -carboxylase ajoute un groupement carboxylique (COO^-) aux résidus Glu, ce qui permet d'obtenir les résidus Gla. L'activité de cette γ -carboxylase nécessite la présence de vitamine K comme cofacteur.

La formation des résidus Gla permet au domaine Gla des protéines vitamine K-dépendantes d'adopter une conformation importante pour la liaison aux ions Ca^{2+} (22). Cette interaction avec le Ca^{2+} leur permet d'interagir avec les membranes phospholipidiques anioniques contenant en particulier de la PtdSer (9,23). Les protéines vitamine K-dépendantes présentent des affinités variables pour les PLs, mais la PS est considérée comme l'une des plus affines pour les PLs (9,24). Cette liaison est cruciale pour la grande majorité des effets biologiques de la PS, et notamment pour son activité cofacteur de la PCa, son activité cofacteur du TFPI α , ou encore sa capacité à se lier et activer les récepteurs de la famille TAM.

1.1.2. Boucle sensible à la thrombine (TSR)

La TSR est une courte région (29 aa) en forme de boucle, et qui n'est retrouvée que sur la PS (**Figures 2 et 3**) (18,25). La TSR doit son nom à la présence de deux sites de clivage protéolytique par la thrombine au niveau des Arg49 et Arg70 (26). Toutefois, ces clivages ne semblent pas physiologiques puisqu'*in vitro*, ils ne se réalisent qu'en absence d'ions Ca^{2+} (27). Un clivage physiologique a lieu au niveau d'un troisième site, l'Arg60 (28), comme démontré par la circulation dans le plasma d'une forme de PS clivée au niveau de ce site (**Partie 1.3.2.2**). La présence du pont disulfure Cys47-Cys72 (**Figures 2B et 3**) permet à la PS clivée de rester sous une forme monocaténaire, contenant le domaine Gla connecté au reste de la molécule. Ce clivage joue probablement un rôle important dans la régulation des activités biologiques de la PS *in vivo*, mais ce rôle reste encore largement méconnu.

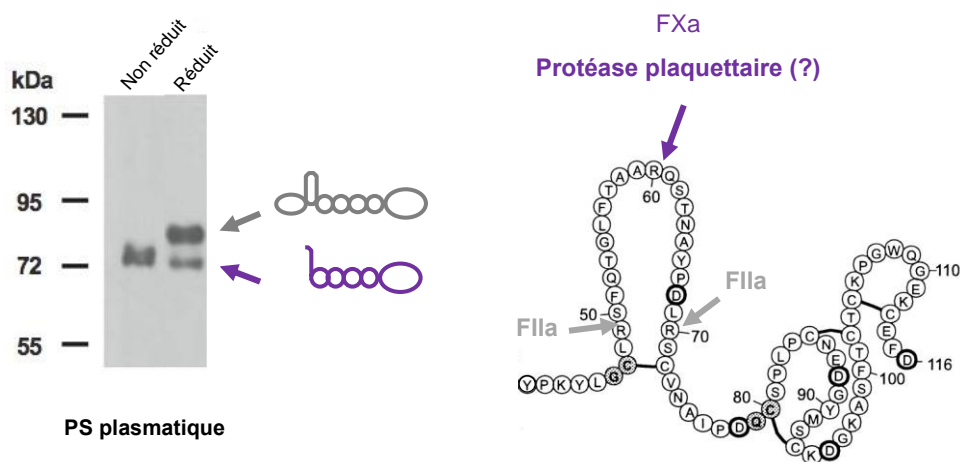


Figure 3 : PS clivée. La PS plasmatisque est constituée d'un mélange de PS non clivée et clivée au niveau de la TSR. En conditions réductrices, la partie N-terminale contenant le domaine Gla est séparée du reste de la molécule, ce qui conduit à la formation d'une forme de PS avec une mobilité électrophorétique augmentée (Figure de gauche). La PS présente des sites de clivage protéolytique par la thrombine (FIIa), au niveau des résidus Arg49 et Arg70, et par le FXa, au niveau de l'Arg60 (Figure de droite). Le clivage protéolytique a lieu au niveau de l'Arg60, probablement par l'intermédiaire d'une protéase localisée à la membrane des plaquettes.

1.1.3. Domaines EGF

A la suite de la TSR, la PS comporte quatre domaines homologues à l'EGF : l'EGF1 (39 aa), l'EGF2 (44 aa), l'EGF3 (42 aa) et l'EGF4 (41 aa). Des domaines EGF homologues sont également retrouvés dans certaines protéines de la coagulation, et ces domaines EGF sont structurés sous forme de feuillets β . Chaque domaine EGF est composé de deux feuillets β et comprend 3 ponts disulfures arrangés de façon très caractéristique (18,25) (**Figure 2B**). Des sites de liaison aux ions Ca^{2+} sont présents au sein des EGF 2, 3 et 4 de la PS, mais pas au niveau de l'EGF1 (29–31).

L'acide aspartique Asp95 (EGF1) et les asparagines Asn136 (EGF2), 178 (EGF3) et 217 (EGF4) sont modifiés de façon post-traductionnelle par β -hydroxylation, au cours de la biosynthèse de la PS. L'ajout par une Asp/Asn- β -hydroxylase d'un groupement hydroxyle (-OH) sur ces résidus forme les résidus hydroxyaspartique Hya95 et hydroxyasparagine Hyn136, Hyn178 et Hyn217 (**Figure 2B**). Un résidu β -hydroxylé a également été retrouvé dans l'EGF1 des autres protéines vitamine K-dépendantes (26), ainsi que dans chacun des EGFs de Gas6 (32).

1.1.4. Domaine SHBG

L'EGF4 de la PS est finalement connecté à un large domaine SHBG C-terminal, représentant plus de la moitié de la PS (383 aa). Contrairement au domaine Gla et aux domaines EGF, aucun domaine SHBG homologue n'est retrouvé sur les autres protéines de la coagulation. Ce domaine est composé de deux domaines homologues au domaine G des laminines, le domaine LG1 (177 aa) et le domaine LG2 (183 aa) (**Figure 2B**). Le domaine SHBG présente deux ponts disulfures qui ont été déterminés expérimentalement lors de la caractérisation initiale de la PS bovine (33), entre les Cys408 et Cys434 dans le domaine LG1, et entre les Cys598 et Cys625 dans le domaine LG2. Un troisième pont disulfure entre les Cys247 et Cys527 permettrait de relier les domaines LG1 et LG2, même si sa formation n'avait pas été formellement

confirmée expérimentalement (33). Le domaine SHBG permet l'interaction de la PS avec la protéine liant le composant du complément 4b (C4b-binding protein ou C4BP) (34,35), mais également avec le TFPI α (36), ou encore le FV/FVa (37). Le domaine SHBG contient des sites de liaison aux ions Ca²⁺ (38,34), et l'interaction avec les ions Ca²⁺ semble au moins requise pour l'interaction de la PS avec C4BP (34).

La PS contient 3 sites de N-glycosylation (Asn458, Asn468 et Asn489) qui sont tous situés dans le domaine LG2 du domaine SHBG (26). Des sites de O-glycosylation ont récemment été identifiés au niveau des résidus thréonine Thr57 et Thr63, dans la TSR de la PS (39), et ces modifications ont un effet inhibiteur sur le clivage protéolytique au niveau de cette TSR (39). Toutefois, la proportion de PS O-glycosylée circulant dans le plasma ou encore l'importance physiologique de ces O-glycosylations sur l'activité biologique de la PS ne sont pas connues.

La PS pourrait également être modifiée par une sulfatation sur tyrosine (Tyr), probablement au niveau du résidu Tyr256, dans le domaine LG1 du domaine SHBG (40), et ce genre de sulfatations sur tyrosine est également observé sur le FV, le FVIII, le FIX et d'autres protéines de l'hémostase (26).

1.2. Gas6, une protéine homologue à la PS

La structure modulaire particulière de la PS n'est retrouvée qu'au niveau de Gas6 (gène spécifique d'arrêt de croissance 6). Gas6 est une protéine vitamine K-dépendante qui montre une forte analogie de séquence (44 %) avec la PS, mais qui ne présente aucune activité anticoagulante connue à ce jour (41). Comme la PS, Gas6 est composée d'un domaine Gla suivi de quatre domaines EGF et d'un domaine SHBG. Gas6 comprend également une boucle située entre le domaine Gla et le domaine EGF1, avec un pont disulfure à sa base, mais cette boucle est plus courte que la

TSR de la PS, et elle n'est pas sensible à un clivage protéolytique par la thrombine ou le FXa. Un domaine SHBG est retrouvé sur Gas6, mais malgré l'analogie de séquence (~ 44 %), le domaine SHBG de Gas6 ne se lie pas à la C4BP ou au TFPI α . En revanche, les domaines SHBG de la PS et de Gas6 leur permettent de se lier et d'activer toutes les deux les récepteurs TAM (**Partie 3.1**).

1.3. Différents pools physiologiques de PS

1.3.1. Types cellulaires exprimant la PS

Comme les autres protéines vitamine K-dépendantes de la coagulation, la PS est physiologiquement produite par les hépatocytes dans le plasma (42). La PS présente toutefois la particularité d'être également exprimée par un nombre varié de cellules, comme par exemple les mégacaryocytes (43), les cellules endothéliales (44,45), les cellules musculaires lisses vasculaires (46), les cellules épithéliales bronchiques (47), les cellules de Leydig (48), les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) (49), les ostéoblastes (50), les synoviocytes (51), des cellules du système nerveux central (52,53), ou encore des cellules du système immunitaire comme les macrophages (54) ou les lymphocytes T CD4+ et CD8+ activés (55,56).

Cette large diversité d'expression de la PS est probablement reliée à sa capacité à exercer des effets cellulaires au sein des tissus de différents organes, par l'intermédiaire de l'activation des récepteurs TAM (**Chapitre 3**). Il est également possible que la PS synthétisée par certaines de ces cellules participe à limiter la génération de thrombine lors de processus de coagulation extravasculaire, mais aucune donnée n'est actuellement rapportée pour la PS dans de tels processus.

1.3.2. PS plasmatique

1.3.2.1. PS libre et PS liée à la C4BP

La PS circule dans le plasma à une forte concentration. Dans des conditions physiologiques, la concentration plasmatique totale de PS circulant chez l'homme est d'environ 25 $\mu\text{g/mL}$, soit 330 nM. Dans le plasma, la majorité (60 %) de la PS est complexée par l'intermédiaire de son domaine SHBG à la C4BP (**Figure 4**). La C4BP est une protéine heptamérique de haut poids moléculaire (~ 570 kDa) composée d'un assemblage de plusieurs chaînes α et β , avec 3 isoformes principales : $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 7$ et $\alpha 6\beta 1$. Les chaînes α et β sont constituées d'un enchainement de plusieurs domaines CCP (protéine contrôle du complément) glycosylés (**Figure 4**). La chaîne α est composée de 8 domaines CCP alors que la chaîne β n'en a que 3. L'extrémité C-terminale de chaque chaîne est composée d'un domaine permettant l'oligomérisation des chaînes entre elles, et l'assemblage de la protéine sous forme d'un heptamère.

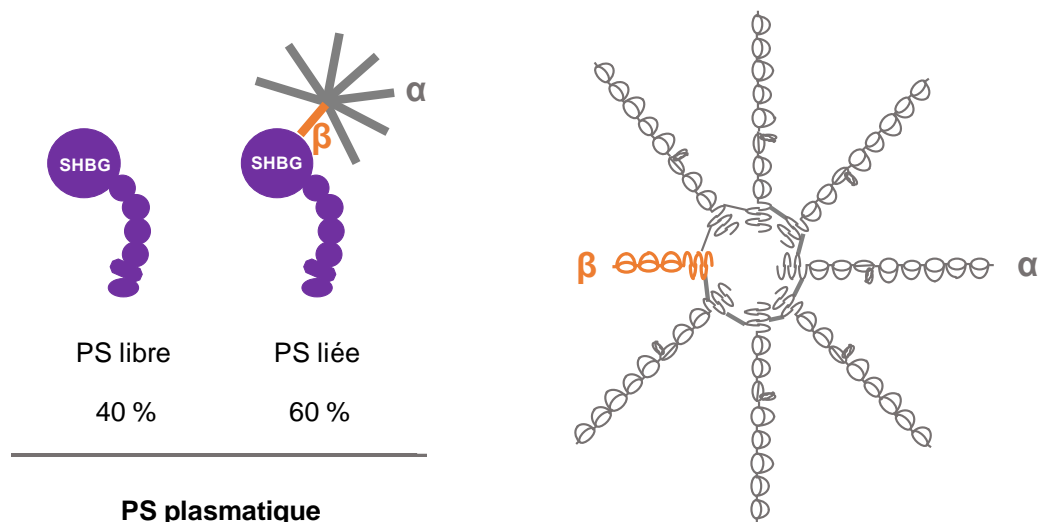


Figure 4 : PS libre et PS liée à la C4BP. L'isoforme majoritaire $\alpha 7\beta 1$ de la C4BP est constituée de 7 chaînes α (gris) et d'une chaîne β (orange). La C4BP interagit avec la PS par l'intermédiaire de sa chaîne β . Ainsi dans le plasma, environ 60 % de la PS est complexée à cette isoforme de la C4BP et 40% de PS plasmatique est sous forme libre.

La PS n'interagit qu'avec la chaîne β de la C4BP. Sur la PS, les aa 420-434 et 447-460 (dans le domaine LG1), et 605-615 (dans le domaine LG2), sont impliqués dans son interaction avec la C4BP (57–60). La concentration plasmatique de C4BP est d'environ 200 $\mu\text{g/mL}$, soit 400 nM, et cette concentration est donc supérieure à celle de la PS. Pourtant, toute la PS n'est pas complexée à la C4BP malgré une forte affinité entre les deux protéines (constante de dissociation d'environ 0.1 nM). En effet, les isoformes de C4BP pouvant interagir avec la PS sont uniquement celles qui comportent la chaîne β (β^+), soit $\alpha_7\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$. Or, la PS est exprimée en excès par rapport à ces isoformes β^+ . Par conséquent, la PS circulant librement dans un plasma normal (PS libre) représente l'excès de PS par rapport aux formes β^+ de C4BP. Ainsi, dans un plasma normal, la concentration de PS libre est d'environ 10 $\mu\text{g/mL}$ (130 nM) et la concentration de PS liée (à la C4BP) est d'environ 15 $\mu\text{g/mL}$ (200 nM). Chez la souris, il est important de noter que la PS n'interagit pas avec la C4BP, car la C4BP d'origine murine ne possède pas de chaîne β (61,62). Dans le plasma murin, la PS circule donc seulement sous sa forme libre, à une concentration de 5-7.5 $\mu\text{g/mL}$ (63).

Comme la PS complexée à la C4BP exprime des activités anticoagulantes fortement réduites, l'existence dans le plasma de ces fortes concentrations de complexe PS-C4BP reste énigmatique, encore à l'heure actuelle.

1.3.2.2. PS clivée

Une forme clivée de PS est également présente dans le plasma humain (64–66), mais également murin (67). Chez l'homme, il a été montré que la PS plasmatique était clivée au niveau de l'Arg60, dans la TSR (**Figure 3**) (64). La proportion dans le plasma de cette PS clivée apparaît variable selon les études, et représenterait entre 10 % (65) et 25 % (66) de la PS plasmatique totale. Le FXa est capable de cliver *in vitro* la TSR de la PS au niveau de l'Arg60, et dans des conditions physiologiques, notamment en présence d'ions Ca^{2+} et de PLs. Toutefois, il est reconnu que le FXa ne clive vraisemblablement

blement pas la PS *in vivo* (28), et la protéase responsable de ce clivage *in vivo* reste encore inconnue.

Il a été proposé que les plaquettes pourraient contribuer de façon importante à la présence de PS clivée dans le plasma, notamment parce que les plaquettes contiennent une protéase capable de cliver la PS (68,28). De plus, le compte plaquettaire corrèle avec le taux de clivage de la PS plasmatique. En effet, le clivage de la PS est significativement réduit chez des patients avec une thrombopénie induite par chimiothérapie (compte plaquettaire < 50 G/L), et significativement augmenté chez des patients présentant une thrombocytémie essentielle (compte plaquettaire > 800 G/L) (66). Étant donnée la proportion plutôt importante de PS clivée dans le plasma (10-25 %), il est peu probable que la présence de PS clivée s'explique par un faible niveau d'activation plaquettaire basale, qui libèrerait une protéase intra-plaquettaire, qui cliverait à son tour la PS plasmatique. Il est possible que la PS clivée provienne d'un clivage de PS plasmatique à la surface de plaquettes au repos, par l'intermédiaire d'une protéase constitutivement active ou par l'intermédiaire d'une protéase qui pourrait être activée dans certaines situations physiologiques (contraintes de cisaillement élevées dans certains vaisseaux, par exemple). De façon tout aussi hypothétique, cette protéase plaquettaire pourrait également être exprimée à la surface des cellules endothéliales vasculaires, et la PS plasmatique pourrait alors être clivée lors de sa circulation et de son passage dans certains vaisseaux. Dans cette hypothèse, l'endothélium contribuerait également au pool plasmatique de PS clivée.

De façon intéressante, environ 85 % de PS clivée est détectée dans du plasma commercial traité par solvant/détergent (69). À nouveau, l'origine de cette très forte proportion de PS clivée est inconnue, même si les conditions utilisées pour traiter ce type de plasma pourraient favoriser le clivage de la PS. Le clivage de la PS au niveau de sa TSR est probablement important d'un point de vue physiologique pour réguler son action anticoagulante. En effet, le clivage de la PS dans la TSR abolit son activité cofacteur de la PCa *in vitro* (27,70,71).

L'ensemble de ces données soulignent l'importance probable du clivage de la PS. Toutefois, son origine et son rôle précis dans les activités anticoagulantes de la PS *in vivo* restent encore à l'heure actuelle des questions ouvertes, et un sujet de recherche particulièrement intéressant.

1.3.3. PS endothéliale

Alors que les autres protéines vitamine K-dépendantes plasmatiques de la coagulation proviennent généralement d'une synthèse purement hépatique, plusieurs études suggèrent que la PS circulant dans le plasma pourrait, en plus d'une synthèse hépatique, provenir d'une synthèse constitutive par l'endothélium vasculaire (44,45,67). De façon intéressante, et même si ces résultats ne sont pas transposables chez l'homme, il a été démontré que chez la souris, environ 45 % du pool de PS plasmatique provenait des cellules endothéliales, la grande majorité des 55 % restant provenant des hépatocytes (67).

La PS provenant des cellules endothéliales vasculaires pourrait également jouer un rôle de limitation de la génération de thrombine, localement à leur surface, à la suite d'une blessure ou d'une inflammation vasculaire. Toutefois, cette hypothèse est difficile à vérifier expérimentalement, en particulier *in vivo*.

1.3.4. PS plaquettaire

La PS est également synthétisée par les mégacaryocytes (43) et contenue dans les granules α des plaquettes (72). Les plaquettes peuvent ainsi libérer de la PS, après leur activation.

Comme les plaquettes contiennent une protéase capable de cliver la PS (68,28), il est raisonnable de penser que de la PS peut être clivée à la suite de sa libération à partir des plaquettes activées. De façon très intéressante, l'activation de pla-

quettes humaines par de la thrombine libère de la PS qui est très majoritairement clivée. En revanche, avec une activation par le collagène, les plaquettes libèrent de plus faibles quantités de PS, pour l'essentiel non clivée (73). Ce résultat est intéressant car il suggère également que des formes de PS exprimant des activités anticoagulantes différentes (PS clivée et non clivée) pourraient être sélectivement libérées suivant les conditions dans lesquelles les plaquettes sont activées.

Chapitre 2 – Activités anticoagulantes de la PS

2.1. Activité cofacteur de la Protéine C activée (PCa)

2.1.1. Généralités sur la PCa

La Protéine C (PC) est une protéine vitamine K-dépendante (62 kDa), synthétisée dans le foie, et circulant dans le plasma à une concentration d'environ 60-70 nM. La PC est composée d'une chaîne légère constituée d'un domaine Gla et de deux domaines EGF. Cette chaîne légère est reliée par un pont disulfure à une chaîne lourde constituée d'un peptide d'activation (PA) et d'un domaine sérine protéase (**Figure 5A**). Le clivage de la PC par la thrombine associée à la thrombomoduline (TM), au niveau de l'Arg169 de la PC, libère le peptide d'activation et génère la PCa (74) (**Figure 5A**). Ce clivage de la PC est favorisé lorsque la PC est fixée par l'intermédiaire de son domaine Gla sur son récepteur situé à la surface de l'endothélium, le récepteur endothélial de la PC (EPCR) (**Figure 5B**) (75).

La PCa est une sérine protéase anticoagulante qui limite la génération de thrombine en inactivant les facteurs FVa et FVIIIa par dégradation protéolytique. La PCa est également largement impliquée dans plusieurs processus anti-inflammatoires, anti-apoptotiques, ou protecteurs de la barrière endothéliale, en partie par l'intermédiaire de sa capacité à cliver et activer le récepteur PAR1 (76). Toutefois, ces effets ne semblent pas être modulés par la PS, et ne seront pas évoqués dans cette thèse.

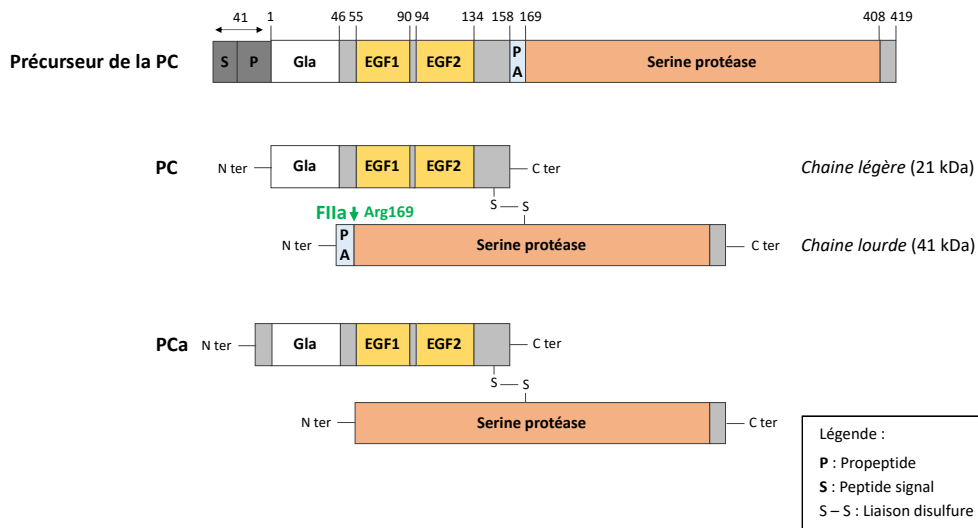
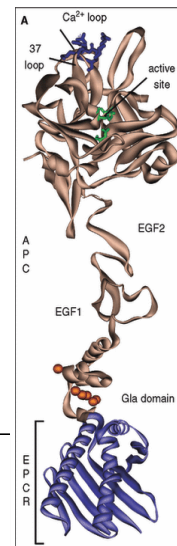
A**B**

Figure 5 : A) Représentation schématique de la PC et de la PCa (basée sur les données Uniprot). Le précurseur de la PC est composé d'un peptide signal (S), d'un propeptide (P), d'un domaine Gla, de deux EGF, d'un peptide d'activation (PA) et d'un domaine sérine protéase. Après le clivage du peptide signal et du propeptide, la PC est exprimée sous forme d'un zymogène composé d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. Finalement, le clivage du peptide d'activation par la thrombine (FIIa) permet l'activation de la PC en PCa. **B) Structure de la PCa complexée à l'EPCR.** Tout comme la PS, la PCa est composée d'un domaine Gla (Gla domain) γ -carboxylé permettant l'interaction avec les ions Ca^{2+} (cercles orange), les PLs, mais aussi l'EPCR. La PC non activée se fixe également sur son récepteur EPCR par l'intermédiaire de son domaine, tout comme la PCa. Figure tirée de Griffin *et al.*, *J Thromb Haemost*, 2007 (77), avec la permission de l'éditeur.

Comme la plupart des enzymes de la coagulation, l'activité maximale de la PCa nécessite la présence de membranes phospholipidiques anioniques et de cofacteurs. La PS est un cofacteur historique bien connu et qui a été largement décrit comme potentialisant l'activité protéolytique de la PCa vis-à-vis du FVa et du FVIIIa (78). Plus récemment, le FV a été décrit comme cofacteur synergique de la PS dans l'inactivation protéolytique du FVIIIa par la PCa (79), et cette activité anticoagulante du FV a depuis été largement confirmée (80,81).

2.1.2. Inactivation du FVa

2.1.2.1. FV et activation

Le FV est une protéine volumineuse qui circule dans le plasma sous la forme d'un monomère (~ 330 kDa) composé de domaines A1, A2, B, C1 et C2 (**Figure 6**) (82). Le FV présente une région basique (BR) et une région acide (AR2) localisées dans son large domaine B, ainsi qu'une autre région acide (AR1) située à la jonction entre les domaines A2 et B (**Figure 6**). L'interaction entre le domaine BR et A2 maintient le FV dans un état de pro-cofacteur (83,84).

Dans le plasma, le FV circule à une concentration d'environ 20 nM (85), et un pool plutôt important et mobilisable de FV est contenu dans les plaquettes. Suite à l'activation des plaquettes, ce FV plaquettaire peut être libéré sous forme non clivée, mais aussi sous forme partiellement clivée au niveau du domaine B, et également sous forme complètement activée (86–88).

Le FV peut être clivé en FVa par la thrombine (mais aussi par le FXa), au niveau des Arg709, Arg1018 et Arg1545 (89). Ces clivages libèrent le domaine B du reste de la protéine pour générer un hétérodimère composé d'une chaîne lourde (A1-A2, ~ 105 kDa) et d'une chaîne légère (A3-C1-C2, ~ 73 kDa), associées entre elles par des ions métalliques divalents (**Figure 6**). L'activation du FV lui permet d'acquérir des propriétés procoagulantes très puissantes. En effet, le FVa s'associe avec le FXa à la surface de membranes phospholipidiques anioniques, en présence d'ions Ca^{2+} , pour former le complexe prothrombinase. Ce complexe est capable d'augmenter le clivage de la prothrombine en thrombine d'un facteur $\sim 10^5$, comparativement au FXa seul (90,91).

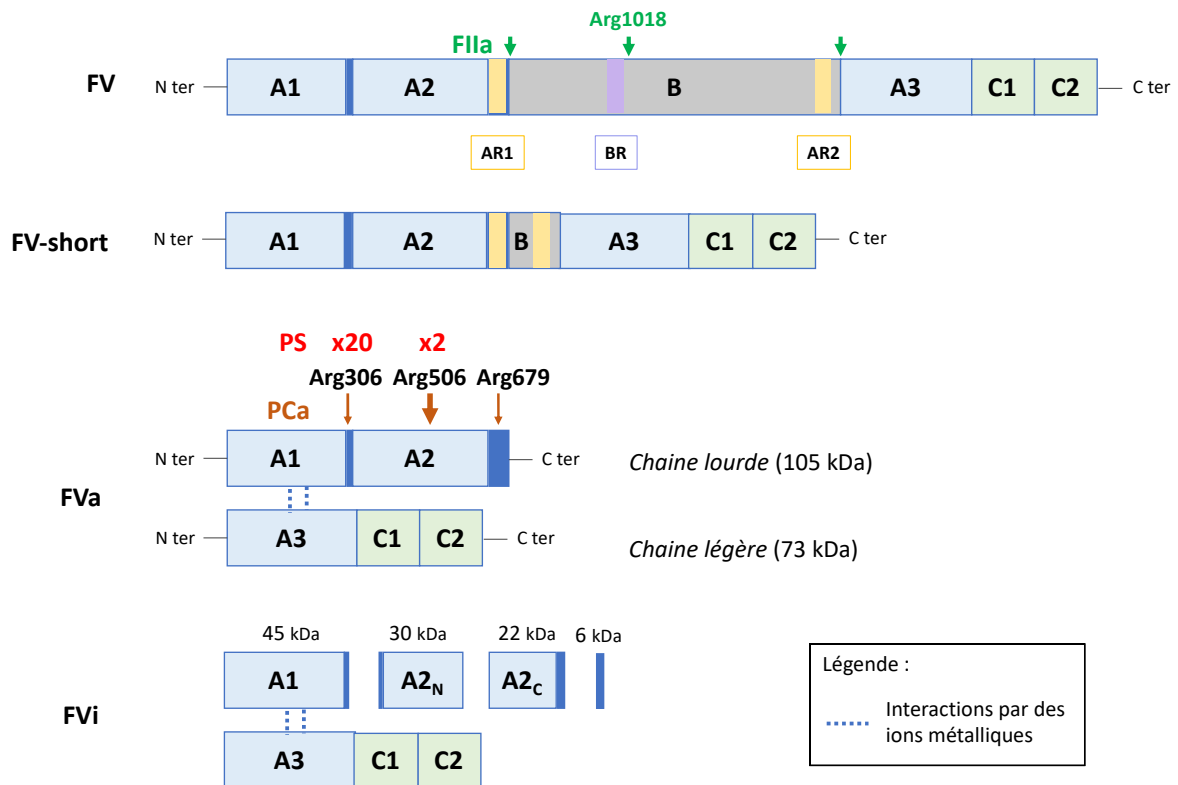


Figure 6 : Structure du FV, de la sécrétion à son inactivation. Le FV est une protéine composée des domaines A1, A2, B, A3, C1 et C2. À la suite du clivage par la thrombine (FIIa) au niveau des arginines (Arg) 709, 1018 et 1545, le domaine B du FV est libéré et le FV est activé (FVa). Le FVa est désormais composé d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère de 105 kDa et 73 kDa respectivement, associées l'une à l'autre grâce à des ions métalliques divalents. Le clivage du FVa par la PCa (potentialisé par la PS), principalement au niveau des Arg306 et Arg506 rend le FVa inactif (FVi). Le FV-short est une isoforme du FV issue d'un épissage alternatif, dans laquelle la majorité du domaine B est absente.

Ce complexe prothrombinase très puissant doit être finement mais efficacement régulé, et la PCa apparaît comme un inhibiteur physiologique important de ce complexe, en clivant le FVa. Cette inactivation protéolytique du FVa par la PCa résulte en une perte drastique de l'activité procoagulante du FVa (92).

2.1.2.2. Inactivation du FVa par la PCa et la PS

Des études cinétiques en systèmes purifiés dans lesquels le FVa est inactivé par de la PCa seule, en présence de PLs et d'ions Ca^{2+} , permettent de démontrer que la PCa clive la chaîne lourde du FVa au niveau de trois sites : les Arg306, Arg506 et Arg679 (93) (**Figure 6**). Ces études mettent également en évidence que l'inactivation du FVa par la PCa est biphasique (93), avec un premier clivage rapide au niveau de l'Arg506 (avec une constante $k_{506} = 4.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), suivi d'un second clivage plus lent au niveau de l'Arg306 ($k_{306} = 2.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Le premier clivage en Arg506 génère un intermédiaire de FVa qui conserve environ 40 % de son activité procoagulante, et seul le second clivage en Arg306 permet une inactivation totale du FVa. Le clivage du FVa en Arg679 est très peu caractérisé mais semble avoir un effet mineur sur l'activité du FVa puisqu'il touche le domaine C-terminal du FVa.

Lorsqu'il est inséré dans le complexe prothrombinase, le FVa est protégé de son inactivation par la PCa, notamment au niveau du clivage en Arg506 (94). Cet effet protecteur est conféré par le FXa, qui entre en compétition avec la PCa pour des sites de liaison sur le FVa (93,95–98). La prothrombine pourrait également protéger le FVa du clivage par la PCa, lorsque le FVa est dans le complexe prothrombinase (99,100).

En 1980, Frederick Walker est le premier à identifier un rôle de cofacteur, dans l'inactivation du FVa par la PCa, d'une protéine anticoagulante découverte quelques années plus tôt : la PS (7). De nombreuses études ultérieures montreront que la PS est effectivement nécessaire pour une inactivation optimale du FVa, puisqu'elle favorise en particulier le clivage du FVa par la PCa au niveau de l'Arg306, le clivage le plus lent mais conduisant à une perte d'activité totale du FVa (**Figure 7**) (93). Au niveau cinétique, l'ajout de PS augmente de 20 fois la vitesse du clivage en Arg306, augmentant la constante k_{306} de $2.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ à $4.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (93). En revanche, le clivage en Arg506 n'est que modestement accéléré en présence de PS (de 4.2 à $4.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (93).

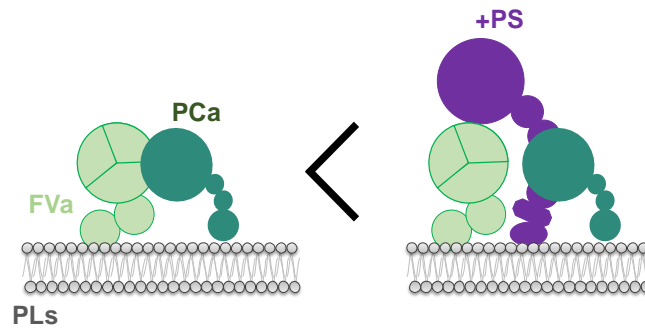


Figure 7 : Activité cofacteur de la PCa de la PS dans l'inactivation du FVa. L'ajout de PS accélère l'inactivation protéolytique du FVa par la PCa.

2.1.2.3. Mécanisme d'action de la PS dans l'inactivation du FVa

L'inactivation du FVa par la PCa a lieu à la surface des PLs, et il a été montré que la PS était capable de relocaliser le site catalytique de la PCa plus à proximité de la surface des PLs, dans une position favorisant notamment le clivage en Arg306 (101,102). Ceci démontre que la PS est capable d'interagir avec la PCa, à la surface des PLs, mais également de moduler sa conformation. Également, la PS favorise l'interaction de la PCa avec les membranes phospholipidiques anioniques (**Figure 8**) (103–105), et ceci concorderait avec le fait que la PS possède une forte affinité pour les PLs (9,23), alors que la PCa ne présente qu'une faible affinité pour les PLs.

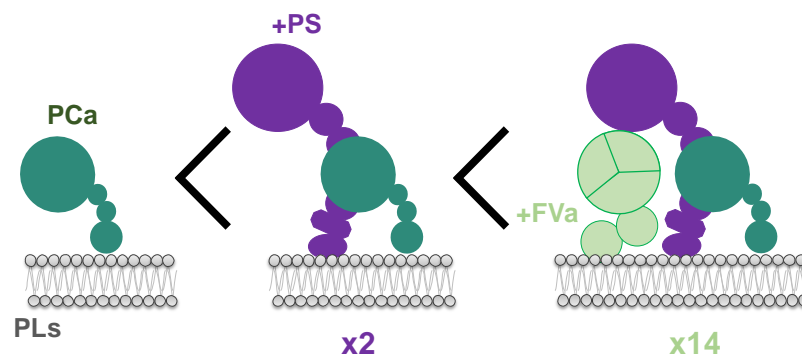


Figure 8 : Effet de la PS et du FVa sur l'affinité de la PCa pour les phospholipides anioniques. L'ajout de PS augmente d'environ 2 fois l'affinité de la PCa pour les phospholipides

anioniques, et l'ajout de FVa en plus de la PS permet une augmentation de cette affinité de 14 fois (106).

Ces effets de la PS sur la PCa ont été observés dans des conditions expérimentales dans lesquelles seules la PS et la PCa sont présentes. En revanche, une étude récente suggère que le PS et le FVa agiraient même de façon synergique pour augmenter l'affinité de la PCa pour les PLs (106). Dans cette étude, la PS seule augmente de 2 fois l'affinité de la PCa pour les PLs, alors que la PS et le FVa augmentent de 14 fois cette affinité (**Figure 8**). Ceci soulignerait l'importance de la formation d'un complexe tri-moléculaire de haute affinité entre la PS, la PCa et le FVa, dans lequel les trois protéines interagissent les unes avec les autres, à la surface des PLs (**Figures 8 et 9**). Dans cette étude, l'importance du complexe tri-moléculaire a été montrée en mesurant comme « read-out » l'affinité de la PCa pour les PLs. Toutefois, il est probable que la formation de ce complexe joue un rôle fonctionnel important dans l'inactivation du FVa par la PCa/PS. La PS pourrait orchestrer la formation de complexe, par sa capacité à interagir avec la PCa et le FVa. En effet, il a été montré que la PS se lie à du FV/FVa dans des tests de liaison directe (37).

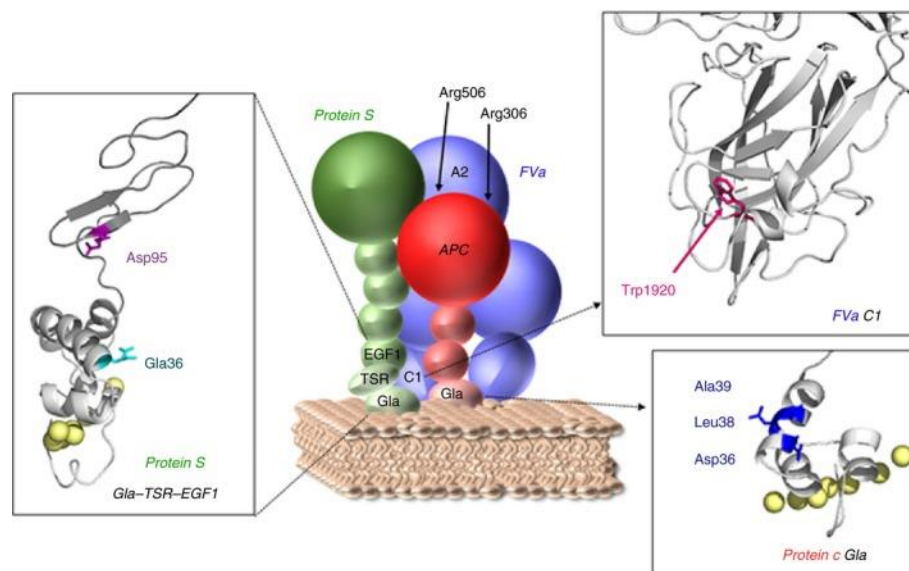


Figure 9 : Complexe tri-moléculaire formé par la PS, la PCa et le FVa au niveau des PLs.

Dans la PS, l'extrémité N-terminale et en particulier les résidus Gla36 (dans le domaine Gla) et Asp95 (dans l'EGF1) sont importants pour la formation du complexe PS/PCa/FVa à la surface des PLs. Le domaine Gla de la PCa (résidus Asp36, Leu38 et Ala39) (107) et le résidu Trp1920 du domaine C1 du FVa sont importants pour la formation du complexe tri-moléculaire . Fi-

gure tirée de Gierula et *al.* J Thromb Haemost, 2019 (78). Figure en accès libre. (106). Figure tirée de Gierula et *al.*, J Thromb Haemost, 2020 (78), avec la permission de l'éditeur.

Sur la base de cette étude, un modèle schématique du complexe trimoléculaire PS/PCa/FVa a été proposé (**Figure 9**). Dans ce modèle, certains domaines de la PS (Gla et EGF1), de la PCa (Gla) et du FVa (C1) ont été suggérés comme étant particulièrement impliqués dans la formation du complexe tri-moléculaire. Ces domaines sont tous localisés à proximité des PLs. Au niveau de la PS, les résidus Gla36 (Gla) et Asp95 (EGF1) joueraient un rôle crucial pour l'interaction entre la PS et le FVa, et non pas au niveau de l'interaction entre la PS et la PCa (25,106–109) (**Partie 2.1.2.4**).

Lorsque les effets de la PS sur l'inactivation du FVa sont évalués dans le contexte du complexe prothrombinase, dans des études cinétiques en systèmes purifiés, la PS semble capable de lever l'effet de protection assuré par le FXa sur l'inactivation du FVa par la PCa (93,94). Cet effet est à nouveau très complexe et pourrait être dû à des interactions de la PS avec le FVa, mais également avec le FXa. En effet, une interaction directe entre la PS et le FXa, à la surface des PLs, a été mise en évidence, et la TSR de la PS a été impliquée dans cette interaction (14,15). Le rôle de la PS au niveau de la protection du FVa par la prothrombine a également été décrit. Toutefois, il semble particulièrement difficile à interpréter, puisque la PS ne semble pas lever l'effet protecteur de la prothrombine sur le FVa, mais au contraire l'amplifie (99). Cet effet est observé à des concentrations physiologiques de prothrombine, mais pas à de plus faibles concentrations.

Malgré un grand nombre d'études qui ont tenté de comprendre l'effet cofacteur de la PS dans l'inactivation du FVa par la PCa, les bases moléculaires de cet effet restent à l'heure actuelle non élucidées.

2.1.2.4. Relations structure/fonction dans l'activité cofacteur de la PS lors de l'inactivation du FVa

Il est en revanche possible de montrer l'importance de domaines ou même de résidus de la PS dans son activité cofacteur dans l'inactivation du FVa. Toutefois, pour la plupart, il est difficile de leur attribuer un rôle dans l'interaction directe avec la PCa ou dans l'interaction directe avec le FVa.

La liaison du domaine Gla de la PS aux PLs est absolument cruciale pour son activité cofacteur de la PCa (110). Cependant, ce domaine Gla semble également impliqué directement dans l'activité cofacteur de la PCa, indépendamment de sa capacité à ancrer la PS aux PLs (111,112,108). Ceci est particulièrement illustré par l'analyse d'un mutant de PS au niveau du résidu Gla36 (PS-E36A) qui conserve sa capacité de liaison aux PLs, mais perd presque complètement sa capacité à agir en tant que cofacteur de la PCa (25,108). De façon intéressante, ceci n'est pas dû à une perte d'interaction avec la PCa, mais à une perte d'interaction avec le FVa, ce qui empêche la formation du complexe tri-moléculaire PS/PCa/FVa (**Figure 9**) (106). De plus, le résidu Gla36 est proche de l'« aromatic stack » contenu dans le domaine Gla, et, un site de liaison au FVa a été identifié au sein de cette région (113). Ainsi, même s'il a été proposé qu'il pouvait être impliqué dans une interaction directe avec le domaine Gla de la PCa (108,112), le domaine Gla de la PS pourrait plutôt lui permettre d'interagir avec le FVa, au sein du complexe tri-moléculaire PS/PCa/FVa (78,106).

De façon importante, l'EGF1 semble aussi crucial pour l'activité cofacteur de la PS (114), et de façon spectaculaire, la mutation d'un seul résidu de l'EGF1 (Asp95) conduit à une perte majeure de l'activité cofacteur de la PCa (~ 80%) (115). Comme pour le résidu Gla36, il a été proposé que le résidu Asp95 serait impliqué dans une interaction avec le FVa, permettant au complexe PS/PCa/FVa de se former (**Figure 9**) (106).

La mutation des résidus Asp78, Gln79 et Thr103, tous situés dans l'EGF1 de la PS, entraîne également une perte de l'activité cofacteur de la PS, mais moins importante que pour la mutation du résidu Asp95 (115,116).

Enfin, l'EGF2 de la PS est lui aussi important pour l'activité cofacteur de la PCa de la PS (115,117), même si le rôle précis de cet EGF2 est encore inconnu. En effet, la délétion totale de l'EGF2 ou son remplacement par l'EGF3 de la PS résulte en une perte d'activité cofacteur de la PCa de près de 90 % (117).

Lors de l'inactivation du FVa, le domaine SHBG C-terminal de la PS ne semble pas impliqué dans une interaction directe avec la PCa ou le FVa. En effet, une forme de PS ne contenant pas le domaine SHBG a été générée, et cette « mini-PS » présente une activité cofacteur de la PCa complètement normale dans l'inactivation du FVa, en systèmes purifiés (118). Ainsi, ce domaine SBHG ne semble pas nécessaire pour la formation du complexe tri-moléculaire PS/PCa/FVa.

Le rôle du domaine SHBG dans l'activité cofacteur de la PS peut aussi être analysé au regard des effets de la C4BP, qui se fixe sur ce domaine. La C4BP réduit l'activité cofacteur de la PS dans un test d'inactivation du FVa par la PCa, en systèmes purifiés (119,120). En revanche, la C4BP n'altère pas l'interaction entre la PS et la PCa, tout comme la PCa n'altère pas non plus l'interaction entre la PS et la C4BP (104). Ces résultats concordent avec le fait que la PCa et la C4BP interagissent avec des domaines différents de la PS, et suggèrent surtout que l'activité cofacteur de la PS en présence de C4BP n'est pas inhibée en raison d'une perte de l'interaction entre la PS et la PCa. En revanche, en présence du complexe PS-C4BP, l'association de la PCa aux PLs est moins augmentée qu'en présence de la PS libre (106). De plus, l'effet synergique de la PS et du FVa sur l'affinité de la PCa pour les PLs est fortement réduit lorsque le complexe PS-C4BP est utilisé (106). Ceci suggère que la C4BP pourrait affecter la formation du complexe tri-moléculaire PS/PCa/FVa (106).

Pour conclure, la façon dont PS stimule l'activité protéolytique de la PCa vis-à-vis du FVa est loin d'être élucidée. Il apparaît raisonnable de penser que cet effet cofacteur de la PS doit être évalué dans des conditions expérimentales les plus « globales » possibles, et pas simplement dans un test d'inactivation du FVa en système purifié. Seules ces conditions permettent de tenir compte de modulateurs physiologiquement importants, connus ou inconnus, de cette activité. De plus, il paraît également nécessaire de prendre en considération l'importance de l'interaction entre la PS et le FVa, ainsi que la formation probable d'un complexe tri-moléculaire PS/PCa/FVa, à la surface des PLs, dans cet effet cofacteur.

2.1.3. Inactivation du FVIIIa

2.1.3.1. FVIII et activation

Le FV et le FVIII sont très proches au niveau de leurs structures, et le FVIII contient une chaîne lourde (A1-A2-B) et une chaîne légère (A3-C1-C2), associées par des ions métalliques divalents (**Figure 10**). Dans le plasma, le FVIII circule toutefois sous la forme d'un mélange hétérogène de FVIII, et des études suggèrent que cette hétérogénéité de masse moléculaire est causée par l'existence de plusieurs clivages dans le domaine B, ayant lieu pendant la maturation post-traductionnelle du FVIII (122). La concentration plasmatique de FVIII est très faible et estimée à 0.1-0.4 µg/mL, soit 0.4-1.7 nM (123–126). En raison de la forte affinité de l'interaction entre le FVIII et le Facteur Willebrand (VWF) ($K_d = 0.2$ nM) (127), 95 à 97 % du FVIII est complexé au VWF, dans un équilibre dynamique. Le reste du FVIII (3 à 5 %) circule librement dans le plasma (128–130). Cette interaction entre le FVIII et le VWF permet notamment de stabiliser l'association entre la chaîne lourde et la chaîne légère du FVIII, d'allonger sa demi-vie (de 2 à 12 heures), et de protéger le FVIII d'une dégradation protéolytique prématurée.

En présence d'ions Ca^{2+} , la thrombine clive et active le FVIII au niveau des Arg 372 et Arg740 (dans la chaîne lourde), ainsi qu'au niveau de l'Arg1648 (dans la chaîne légère) (**Figure 10**). Le FVIIIa est ainsi un hétérotrimère composé des domaines A1 (~ 50 kDa) et A2 (~ 43 kDa), formant la chaîne lourde, et des domaines A3-C1-C2 (~ 80 kDa), formant la chaîne légère (**Figure 10**). Le clivage au niveau de l'Arg372 dissocie la liaison covalente entre les domaines A1 et A2, et ceux-ci n'interagissent désormais que très faiblement ensemble grâce à des ions métalliques divalents (131). Le clivage au niveau de l'Arg740 libère finalement le domaine B. Une fois activée, le FVIIIa change de conformation, ce qui permet sa dissociation du VWF, augmente son affinité pour les PLs, et permet son interaction avec ses partenaires protéiques (132).

Le FVIIIa exprime sa forte activité procoagulante en augmentant d'environ 15 000 fois la constante catalytique du FIXa dans l'activation du FX (133). Pour cela, le FVIIIa forme avec le FIXa le complexe ténase intrinsèque à la surface de membranes phospholipidiques anioniques, en présence d'ions Ca^{2+} (133,134). Le FVIIIa interagit avec le FIXa avec une forte affinité (K_d de 2 nM) (135), principalement par l'intermédiaire de ses domaines A2 (K_d de 3.9 nM) (136,137) et A3 (K_d de 14.8 nM).

Le FVIIIa est en lui-même une protéine très peu stable. Les faibles interactions entre les domaines A1 et A2 expliquent la dissociation spontanée du domaine A2, en quelques minutes, qui s'accompagne d'une perte d'activité du FVIIIa (138). Cependant, le FVIIIa peut être stabilisé grâce à l'interaction du domaine A2 du FVIIIa avec le FIXa (139), ainsi qu'en présence de PLs (140), comme c'est le cas lorsque le FVIIIa est intégré au sein du complexe ténase intrinsèque.

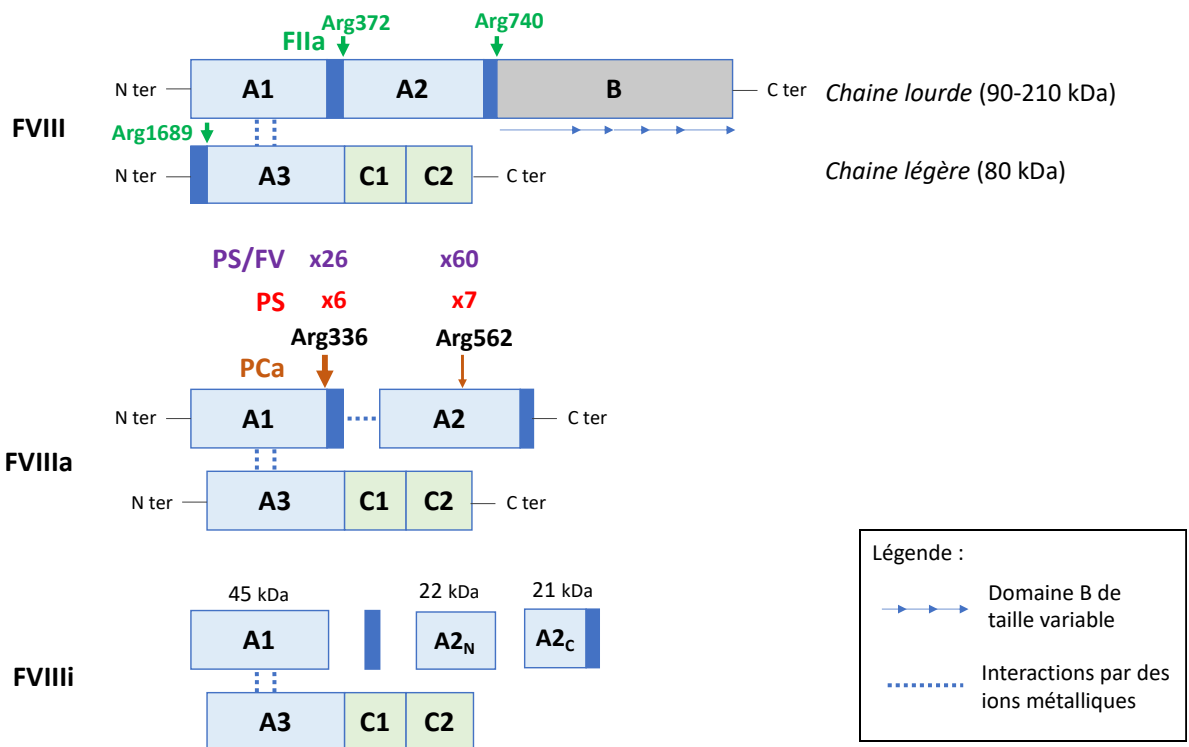


Figure 10 : Structure du FVIII, de la sécrétion à son inactivation. Tout comme le FV, le FVIII est composé des domaines A1, A2, B, A3, C1 et C2. La forme mature du FVIII est composée d'une chaîne lourde de taille variable, entre 90 et 210 kDa, et d'une chaîne légère de 80 kDa, associées l'une avec l'autre grâce à des ions métalliques divalents. Le FVIII est activé après un clivage par la thrombine (FIIa) au niveau des arginines 372, 740 et 1689. Dans le FVIIIa, le clivage en Arg740 entraîne une dissociation des domaines A1 et A2 qui sont désormais associés grâce à des ions métalliques divalents. L'inactivation du FVIIIa (FVIIIi) par la PCa est assurée par un clivage protéolytique au niveau des Arg336 et Arg562. La PS et le FV ont été décrits comme des cofacteurs synergiques amplifiant ensemble l'inactivation du FVIIIa par la PCa.

2.1.3.2. Inactivation du FVIIIa par la PCa

Comme pour le complexe prothrombinase, le complexe ténase intrinsèque est régulé négativement par la PCa. En présence de PLs et d'ions Ca^{2+} , la PCa clive le FVIIIa au niveau de deux sites localisés dans la chaîne lourde : l'Arg336 (domaine A1) et l'Arg562 (domaine A2) (**Figure 10**), et ces clivages sont corrélés avec une perte d'activité procoagulante du FVIIIa, démontrant ainsi que la PCa inactive le FVIIIa (141,142).

En présence de PCa seule, le clivage au niveau de l'Arg336 est plus rapide que celui au niveau de l'Arg562, et ceux-ci se produisent à une vitesse de 0.1 nmole de FVIIIa clivé/min et 0.019 nmole de FVIIIa clivé/min pour 1 nanomole de PCa, respectivement (143)

Tout comme pour le FVa dans le complexe prothrombinase, le FVIIIa est protégé du clivage par la PCa par le FIXa, lorsqu'il est inséré dans le complexe ténase intrinsèque (144,145). Cette protection résulte probablement d'une compétition pour des sites de liaison sur le FVIIIa, de façon similaire à ce qui est observé pour la protection du FVa.

L'importance physiologique de l'inactivation du FVIIIa par la PCa a été relativement sous-évaluée, comparativement à l'inactivation du FVa par la PCa. En effet, l'inactivation du FVIIIa par la PCa est plutôt lente, alors que l'inactivation spontanée du FVIIIa (par dissociation du domaine A2) est rapide. Cependant, l'équipe de George Lindsey a montré très récemment que la PCa contribuait effectivement à la régulation négative du FVIIIa *in vivo*, chez la souris (146).

2.1.3.3. Cofacteurs de la PCa dans l'inactivation du FVIIIa

Comme pour l'inactivation du FVa par la PCa, la PS agit en tant que cofacteur de la PCa dans l'inactivation du FVIIIa. Les études cinétiques montrent que la PS accélère les clivages au niveau des Arg336 et Arg562, d'environ 6 et 7 fois, respectivement (143) (**Figure 11**). Comme pour l'inactivation du FVa par la PCa au sein du complexe prothrombinase, la PS semble capable de lever l'effet protecteur du FIXa sur le FVIIIa, au sein du complexe ténase intrinsèque (145). La PS pourrait exercer ces effets en interagissant directement avec le FIXa, et une interaction entre la PS et le FIXa a été récemment mise en évidence dans des expériences d'anisotropie de fluorescence ou de co-immunoprécipitation (147). La PS est également capable de se lier au FVIIIa dans un test de liaison directe (12), et cette interaction entre la PS et le FVIIIa

pourraient participer à l'effet de levée de protection du FVIIIa dans le complexe ténase intrinsèque. Les domaines de la PS impliqués dans son interaction avec le FVIIIa et le FIXa n'ont cependant pas encore été identifiés.

Il est largement démontré que le FV peut aussi jouer un rôle de cofacteur de la PCa dans l'inactivation du FVIIIa. Le FV n'a aucun effet cofacteur seul, mais il agit en synergie avec la PS (79,143,148). L'effet synergique de la PS et du FV augmente jusqu'à 60 fois le clivage en Arg562, et seulement 26 fois le clivage en Arg336 (**Figure 11**), ce qui permet aux deux clivages de se produire à des vitesses comparables (143).

L'activation du FV et le remplacement du domaine B du FV par celui du FVIII abolissent l'effet synergique du FV sur la PS (79,149), suggérant que le domaine B du FV est nécessaire pour cet effet. De plus, il a également été montré que pour exercer son effet de cofacteur synergique de la PS, le FV devait être clivé par la PCa au niveau de l'Arg506 (de son domaine A2). En effet, les variants de FV dans lesquels le clivage en Arg506 est aboli (FV-Q506 et FV-Q306/Q506) n'exercent presque aucune activité cofacteur synergique de la PCa, tandis que la suppression du clivage en Arg306 seul (FV-Q306) n'a pas d'effet sur l'activité anticoagulante du FV (81).

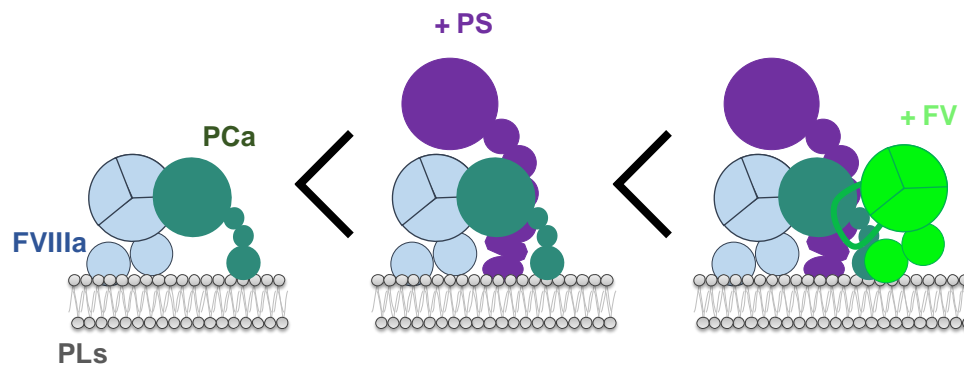


Figure 11 : Activité cofacteur de la PCa de la PS dans l'inactivation du FVIIIa. L'ajout de PS accélère l'inactivation protéolytique du FVa par la PCa. Le FV, en présence de PS, est un cofacteur synergique qui augmente encore plus la vitesse d'inactivation du FVIIIa.

À la suite de la découverte de cet effet du FV dans l'inactivation du FVIIIa, la question de la capacité du FV à agir comme cofacteur dans l'inactivation du FVa par la PCa/PS se posait naturellement. Dans ce contexte, Cramer et ses collaborateurs ont montré un effet de potentialisation du FV sur la PCa, dans un test coagulation plasmatique modifié pour être insensible au FVIII/FVIIIa (150). Comme ce test ne mesure plus la contribution de l'inactivation du FVIIIa par la PCa, les auteurs de l'étude ont conclu que le FV pourrait jouer un rôle de cofacteur de la PCa dans l'inactivation du FVa. Si les résultats de cette étude sont conceptuellement intéressants, ils n'ont toujours pas été corroborés par des études mécanistiques en systèmes purifiés. Surtout, le rôle de la PS dans ce système n'a pas été évalué, et cette étude ne renseigne donc pas sur la possibilité que le FV agisse de façon synergique avec la PS pour potentialiser l'activité protéolytique de la PCa sur le FVa.

L'interaction entre le FV et la PS joue vraisemblablement un rôle important dans l'effet synergique de ces deux cofacteurs sur l'inactivation du FVIIIa par la PCa. Des sites d'interaction entre la PS et le FV (et le FVa) ont été localisés au niveau de l'extrémité C-terminale du domaine SBBG (aa 621-635) (37). De façon intéressante, deux études ont montré que le domaine LG2 (qui contient les aa 621-635), mais pas le domaine LG1, est nécessaire pour l'effet synergique de la PS et du FV dans l'inactivation du FVIIIa par la PCa (151,152). L'« aromatic stack » du domaine Gla de la PS a également été impliqué dans une interaction avec le FVa, mais l'interaction de ce domaine avec le FV n'a pas été démontrée dans cette étude (113).

Le rôle de la PS dans l'inactivation du FVIIIa par la PCa est complexe. Ce rôle, apparaît encore plus complexe, en partie en raison de l'effet synergique du FV. Ainsi, il n'est pas étonnant que cette activité de la PS soit très peu étudiée dans la littérature. De plus, cette activité cofacteur de la PS est particulièrement difficile à étudier expérimentalement. Pour ces raisons, les bases moléculaires de cette activité cofacteur de la PS sont encore moins connues que pour son activité cofacteur dans l'inactivation du FVa, et seules quelques rares études ont tenté d'explorer les relations

structure/fonction de la PS au niveau de cette activité. L'interaction entre la PS et le FV semble centrale l'activité cofacteur de la PS dans l'inactivation du FVIIIa, mais il n'est pas clair si la PS interagit avec le FV de la même façon qu'avec le FVa, lors de l'inactivation du FVa par la PCa.

2.2. Activité cofacteur de l'Inhibiteur de la Voie du Facteur Tissulaire α (TFPI α)

2.2.1. Généralités sur le TFPI α

L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) (153) est une glycoprotéine anticoagulante de la famille des inhibiteurs de protéases à sérine de type Kunitz, qui existe sous plusieurs variants d'épissage. L'isoforme α (TFPI α) (36 kDa) est composée de trois domaines Kunitz K1, K2, et K3, ainsi que d'une région C-terminale basique (**Figure 12**).

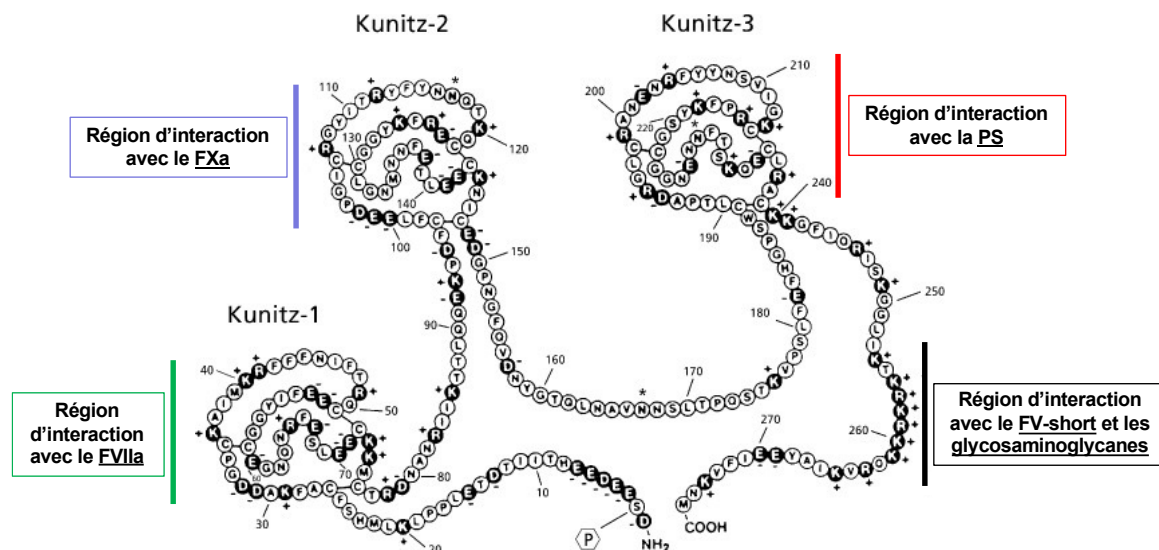


Figure 12 : Le TFPI α et les zones d'interactions avec ses partenaires. Le TFPI α interagit avec le FVIIa (via son domaine K1), le FXa (via son domaine K2), la PS (via son domaine K3), le FV-short ou les glycosaminoglycane (via sa région basique C-terminale). Figure tirée de Lwa-leed et *al.*, *J Pathol*, 2005 (154), avec la permission de l'éditeur.

Dans l'isoforme β (TFPI β) (28 kDa), le domaine Kunitz K3 et la région C-terminale basique sont remplacés par une séquence polypeptidique contenant une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) (155–157). Chez l'homme, le TFPI α est principalement synthétisé par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes, alors que le TFPI β est très majoritairement exprimé par les cellules endothéliales mais n'est pas contenu dans les plaquettes. Ce profil d'expression permet de définir plusieurs pools de TFPI dans l'organisme : plasmatique, vasculaire, et plaquettaire.

Chez l'homme, la majorité (80 %) du TFPI est associée à la paroi des vaisseaux (**Figure 13**). Environ 80 % de ce pool vasculaire est constitué de TFPI α associé à l'endothélium, soit par l'intermédiaire d'une protéine non identifiée et liée aux membranes par une ancre GPI (75 à 80 % du pool vasculaire) (158), soit par l'intermédiaire d'une liaison directe avec les glycosaminoglycanes (GAGs) présents à la surface de l'endothélium (0 à 5 % du pool vasculaire) (159). Le reste du TFPI vasculaire (15-20 % du pool vasculaire) est constitué de TFPI β directement associé à l'endothélium par l'intermédiaire de son ancre GPI (158).

Chez les patients, une partie du pool vasculaire de TFPI α peut être mobilisé par de l'héparine et mis en circulation, comme suggéré par le fait que l'infusion d'héparine augmente la quantité de TFPI α circulant d'environ de 2 à 4 fois (160–164). Il a été proposé que ce TFPI α puisse être du TFPI α qui était associé aux GAGs vasculaires. Toutefois, des études sur des cellules endothéliales en culture suggèrent que ce TFPI α mobilisable serait majoritairement présent au sein de granules endothéliaux intracellulaires et secrété après stimulation par de l'héparine (160–164) ou de la thrombine (165).

Le reste du TFPI (20 %) circule dans le sang (**Figure 13**), à une concentration d'environ 1.6-2.3 nM (159,166). La plus grande partie de ce TFPI sanguin (~ 80-90 %) est tronquée au niveau C-terminal, au niveau du domaine K3 ou de la région basique, et ce TFPI tronqué est associé à des lipoprotéines dans le plasma. Malgré la forte proportion de ce TFPI tronqué dans le plasma, sa fonction reste inconnue. Environ 0-

5 % du TFPI sanguin est retrouvé dans les plaquettes, et sous la forme de TFPI α (167). Ce TFPI α peut être libéré des plaquettes, comme pour la PS, suite à une activation plaquettaire (167,165,168). Le reste du TFPI sanguin (15 %) circule librement dans le plasma et 5 % de ce TFPI plasmatique libre est constitué de TFPI β , alors que les 10 % restants sont constitués de TFPI α (autrement appelé « TFPI entier » ou « TFPI full-length », en Anglais) (169,156).

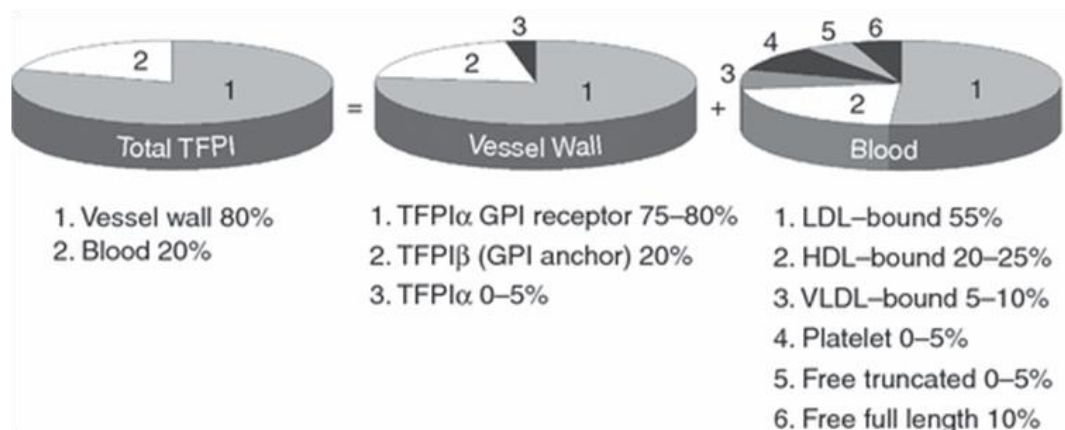


Figure 13 : Distribution du TFPI chez l'homme. Chez l'homme, la majorité du TFPI est localisée au niveau de la paroi vasculaire (80 %) et le TFPI restant se trouve dans le sang (20 %). Parmi le TFPI de la paroi vasculaire, du TFPI α ancré par une ancre GPI (75-80 %) ou directement lié aux glycosaminoglycanes (0 à 5 %) a été identifié. Du TFPI β est lui directement associé à l'endothélium par l'intermédiaire de son ancre GPI (20 %). Dans le sang, 80 à 90 % du TFPI est plus ou moins tronqué au niveau de de son domaine C-terminal ou de son domaine K3, et est associé à des lipoprotéines (lipoprotéines de faible, haute et très basse densité, LDL-bound, HDL-bound et VLDL-bound) dans le plasma. Entre 0 et 5 % du TFPI sanguin est du TFPI α localisé dans les plaquettes. Finalement, entre 0 et 15% du TFPI plasmatique est libre, composé de 5 % de TFPI β et 10 % de TFPI α . Figure tiré de Hackeng *et al.*, *J Thromb Haemost*, 2009 (156), avec la permission de l'éditeur.

Un quatrième pool de TFPI, extravasculaire et sous son isoforme α , a été proposé très récemment dans une étude de l'équipe d'Alan Mast. Les auteurs de cette étude ont proposé que le TFPI α mobilisable par l'héparine ne serait pas situé à la surface intraluminale de l'endothélium vasculaire, mais serait plutôt localisé dans la matrice extracellulaire située dans l'adventice entourant les vaisseaux, et serait associé à

des protéoglycanes (170). Ces auteurs ont par ailleurs proposé que ce TFPI α servirait à inhiber l'initiation de la coagulation après une blessure vasculaire, dans le compartiment extravasculaire, alors que le TFPI β et le TFPI α intravasculaires contrôleraient plutôt l'initiation de la coagulation à la surface d'un endothélium activé ou enflammé.

2.2.2. Activités anticoagulantes du TFPI α

Le TFPI α est un anticoagulant naturel qui a été largement décrit comme un inhibiteur du complexe FT/FVIIa lors de l'initiation de la coagulation, mais également comme un inhibiteur du FXa, lorsque celui-ci est généré en faibles quantités. Ainsi, le TFPI α apparaît comme un inhibiteur très efficace, mais uniquement à de faibles niveaux d'activation de la coagulation. En effet, de fortes concentrations de FXa générées à plus haut niveau d'activation vont échapper à l'inhibition par le TFPI α , car celui-ci est un inhibiteur lent et circule dans le plasma à faibles concentrations. En revanche, lorsque la coagulation est activée à de faibles niveaux, la génération de FXa est beaucoup plus faible et lente, et dans ces conditions le FXa peut être effectivement inhibé par le TFPI α .

Même avant l'identification du TFPI α , de nombreuses études avaient mentionné l'existence d'une protéine dans le plasma déplété en protéines vitamine K-dépendantes, capable d'inhiber l'activité du complexe FT/FVIIa (171–173). Ensuite, les chercheurs ont identifié que cet inhibiteur n'exerçait pas son activité inhibitrice par une action de protéolyse sur ses cibles, mais plutôt par l'intermédiaire d'une inhibition réversible et Ca²⁺-dépendante (171). Par la suite, le TFPI a été cloné, et ses isoformes α et β identifiées.

Les bases moléculaires de l'activité anticoagulante du TFPI α ont été largement étudiées, et deux mécanismes principaux ont été proposés dans la littérature. Un premier modèle d'inhibition, qui a été le plus accepté, propose que le TFPI α se lie directement et rapidement au complexe trimoléculaire FT/FVIIa/FXa formé immédia-

tement après l'activation du FX par le complexe ténase extrinsèque. Cette liaison du TFPI α inhibe ainsi le complexe FT/FVIIa et le FXa (174). Au niveau moléculaire, le TFPI interagit avec les sites catalytiques du FVIIa et du FXa, par l'intermédiaire de ses domaines K1 et K2, respectivement.

Un second modèle implique un mode d'inhibition séquentiel de l'activité du complexe FT/FVIIa par le TFPI α , mais qui est à nouveau dépendant du FXa (171,173,175). Plus précisément, lors d'une première étape, le domaine K2 du TFPI α interagit avec le FXa, permettant la formation du premier complexe. Comme l'interaction a lieu au niveau du site catalytique du FXa, celui-ci est inhibé par la formation du complexe TFPI α /FXa. Au cours d'une seconde étape, ce complexe TFPI α /FXa peut interagir avec le site catalytique du FVIIa, par l'intermédiaire du domaine K1 du TFPI α , et former un complexe quaternaire TF/FVIIa/FXa/TFPI α inactif, entraînant l'inhibition de l'activité procoagulante du complexe FT/FVIIa (176).

Des études cinétiques ont permis de montrer que l'inhibition du FXa par le TFPI α était biphasique. En effet, à la suite de son activation par le complexe FT/FVIIa, le FXa libéré est tout de suite inhibé par le TFPI α , suggérant la formation rapide d'un premier complexe TFPI α /FXa, avec une constante de dissociation K_i évalué entre 2.7 et 14.6 nM (177–179). Ce complexe tend ensuite lentement vers une stabilisation, avec une constante de dissociation K_i^* évalué entre 0.034 et 0.065 nM (177–179). En raison des caractéristiques de ce mécanisme, le TFPI α est décrit comme un inhibiteur lent à haute affinité (« *slow tight-binding inhibitor* » en anglais) du FXa (177,178).

Ce mécanisme d'inhibition d'un FXa « libre » par le TFPI α , indépendant du complexe FT/FVIIa, permettrait théoriquement à du FXa généré par une autre voie que celle du FT d'être inactivé de la même façon. Une étude basée sur des expériences de génération de thrombine *in vitro* a permis de montrer que le TFPI α pouvait également inhiber du FXa généré par l'intermédiaire du complexe ténase intrinsèque, indépendamment du complexe FT/FVIIa (180).

Quelle que soit l'origine du FXa (voie extrinsèque ou voie intrinsèque), l'activité inhibitrice du TFPI α sur le FXa nécessite que le TFPI α soit d'abord capable de former un complexe avec le FXa. Toutefois, la K_i du complexe TFPI α /FXa (4.4 nM) est bien supérieure à la concentration plasmatique de TFPI α libre (0.25 nM), et il était ainsi peu probable que ce complexe puisse se former physiologiquement.

La présence dans le plasma d'un cofacteur permettant à cette inhibition de se produire physiologiquement a été postulée, mais son identité est restée inconnue pendant longtemps. En 2006, Tilman Hackeng et son équipe ont montré pour la première fois que la PS pouvait justement agir en tant que cofacteur du TFPI α dans l'inhibition du FXa (178). Cette activité cofacteur du TFPI α de la PS a depuis été confirmée dans de multiples études, par différentes équipes, et apparaît maintenant largement reconnue par la communauté scientifique. Cette activité cofacteur de la PS a également permis d'élucider le rôle fonctionnel du domaine Kunitz K3, spécifique de l'isoforme α du TFPI, et qui était resté énigmatique pendant longtemps. En effet, ce domaine K3 est impliqué dans l'interaction du TFPI α avec la PS (184–186).

2.2.3. Activité cofacteur du TFPI α de la PS

2.2.3.1. Rôle de la PS dans l'inhibition du FXa

Comme mentionné précédemment, l'inhibition du FXa par le TFPI α a été décrite comme étant biphasique, avec la formation d'un premier complexe TFPI α /FXa, caractérisée par une constante de dissociation K_i (4.4 nM). Ce complexe isomérisse et se stabilise ensuite en un complexe TFPI α /FXa*, avec une constante de dissociation K_i^* (0.05 nM) (178). Des analyses cinétiques en présence de PS montrent que la PS favorise l'inhibition du FXa par le TFPI α en stimulant la formation du complexe « de rencontre » TFPI α /FXa (représentée par la constante de dissociation K_i). En effet, la présence de PS diminue cette K_i d'un facteur 9, en l'abaissant de 4.4 nM à 0.5 nM (178).

En revanche, la PS n'a pas d'effet sur la formation du second équilibre (représentée par la constante de dissociation K_i^*).

La PS permettrait donc d'abaisser la K_i du complexe TFPI α /FXa à une valeur (0.5 nM) plus proche de la concentration plasmatique de TFPI α libre (0.16-0.25 nM), suggérant que la PS permettrait au TFPI α de pouvoir inhiber physiologiquement le FXa (178). Par conséquent, ces données nouvelles à l'époque ont également permis de réévaluer l'intérêt pour cette activité d'inhibition directe du FXa par le TFPI α , qui était controversée jusque-là.

L'activité cofacteur du TFPI α de la PS peut être aisément mise en évidence expérimentalement, par un test fonctionnel *in vitro* mesurant l'activité amidolytique du FXa en présence de TFPI α , de PS, de PLs, et d'ions Ca^{2+} (**Figure 14**). L'activité cofacteur du TFPI α de la PS peut aussi être détectée en système plasmatique, dans des tests de génération de thrombine, mais uniquement lorsque celle-ci est induite avec de faibles concentrations de FT (~ 1 pM) (36,178,180). En effet, en présence de fortes concentrations de FT (14 pM), l'activité d'inhibition du complexe TFPI α /PS est trop faible pour limiter les plus fortes concentrations de FXa qui sont générées (156). Dans ces tests de génération de thrombine, la PS est également capable de jouer son rôle de cofacteur du TFPI α lorsque la génération de thrombine est déclenchée avec des activateurs de la voie intrinsèque, comme le FXIa, le FIXa, ou un activateur du FX (180). À nouveau, ce rôle de cofacteur n'est mesuré qu'à de faibles niveaux d'activation de la génération de thrombine.

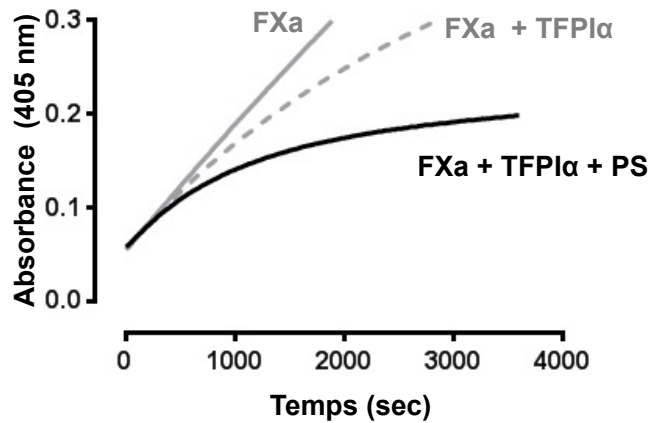


Figure 14 : Activité cofacteur de la PS dans l'inactivation du FXa par le TFPIα. En présence de vésicules phospholipidiques anioniques et d'ions Ca^{2+} , l'activité amidolytique du FXa vis-à-vis d'un substrat chromogénique spécifique est enregistrée (courbe « FXa »). L'ajout de TFPIα inhibe l'activité amydotique du FXa (courbe « FXa + TFPIα »), et cette inhibition est potentialisée par l'ajout de PS (courbe « FXa + TFPIα + PS »). En absence de TFPIα, la PS n'inhibe pas le FXa. Figure tirée de Sedzro *et al.*, 2021 (article en cours de soumission).

2.2.3.2. Mécanisme d'action de la PS dans l'inhibition du FXa

Expérimentalement, des vésicules phospholipidiques anioniques sont systématiquement utilisées pour mesurer l'effet cofacteur du TFPIα de la PS, et la plupart des études suggèrent que la présence de PLs est requise pour l'expression de l'activité cofacteur du TFPIα de la PS (178,181). En revanche, la présence de PLs ne semble pas indispensable à l'inhibition du FXa par le TFPIα seul. En effet, bien que la région basique C-terminale du TFPIα soit probablement impliquée dans son interaction avec les PLs, leur présence semble avoir une importance mineure dans l'activité du TFPIα seul (182,183). Ainsi, le TFPIα est capable d'inhiber, même si plus faiblement, le FXa en absence de PLs (183). De plus, des variants de TFPIα délétés de différentes portions du domaine C-terminal (TFPI_{C1}, TFPI_{C2} et TFPI_{C3}) présentent une affinité réduite pour les PLs, mais conservent une certaine capacité d'inhibition du FXa (181).

En revanche, la présence de PLs est indispensable pour l'activité cofacteur de la PS dans l'inhibition du FXa par le TFPIα (178). De plus, la PS stimule normalement l'activité inhibitrice des variants de TFPIα délétés des différentes portions de leur do-

maine C-terminal (TFPI_{C1} et TFPI_{C2}), et qui présentent une affinité réduite pour les PLs (181). Ces résultats suggèrent, d'une part, que la PS agit en favorisant l'ancrage du TFPI α au niveau des membranes phospholipidiques anioniques et, d'autre part, que c'est la PS qui assure le « maximum » de l'ancrage du TFPI α aux PLs. Cette hypothèse est renforcée par une autre étude montrant que lorsque le TFPI α est déjà ancré aux PLs, la PS ne joue plus son rôle de cofacteur (184).

L'ancrage du TFPI α aux PLs, fortement facilité par la PS, permettrait probablement de rapprocher le TFPI α de sa cible, le FXa, lui aussi lié au niveau de ces PLs. Ceci est en accord avec les données cinétiques qui établissent que le rôle de la PS consiste à favoriser la « rencontre » entre le TFPI α et le FXa (178).

2.2.3.3. Effet cofacteur synergique du FV et du FV-short sur la PS

Des données récentes ont démontré que la présence de FV augmente encore plus l'effet cofacteur du TFPI α de la PS. En effet, si le FV seul n'a aucun effet sur l'activité inhibitrice du TFPI α sur le FXa, des concentrations croissantes de FV potentialisent de façon dose-dépendante l'inhibition du FXa par le TFPI α , en présence de PS (179). Le FV joue ainsi un rôle de cofacteur synergique de la PS dans l'inhibition du FXa par le TFPI α , comme il jouait un rôle de cofacteur synergique de la PS dans l'inactivation du FVIIIa par la PCa. Une étude cinétique a montré que la K_i du complexe TFPI α /FXa est abaissée de 2.7 à 0.7 nM en présence de PS seule, puis à 0.23 nM en présence de PS et de FV, soit une diminution globale de 12 fois en présence de PS/FV (179) (**Figure 15**).

La présence de PS ou de PS/FV ne modifie pas de façon significative la valeur de la K_i^* , ce qui va dans le sens d'un effet synergique du FV avec la PS, puisque la PS seule n'avait déjà aucun effet sur l'isomérisation du complexe TFPI α /FXa (représentée par la constante K_i^*). Cet effet cofacteur synergique de la PS et du FV sur le TFPI α permet donc d'abaisser la K_i (0.23 nM) à une valeur encore plus proche de la concen-

tration plasmatique physiologique de TFPI α (0.16-0.25 nM), suggérant encore plus l'importance physiologique de l'inhibition du FXa par le TFPI α (179) en présence du couple PS/FV.

L'effet synergique du FV et de la PS sur le TFPI α est observé aussi bien avec le FV qu'avec une forme de FV non clivable par la thrombine, mais pas avec le FVa ou une forme de FV délétée de son domaine B (179). Les résultats suggèrent qu'une région contenue dans le domaine B du FV est impliquée dans l'effet synergique du FV et de la PS sur le TFPI α . À l'heure actuelle, les bases moléculaires et les relations structure/fonctions de cet effet synergique du FV et de la PS sur le TFPI α ne sont pas encore élucidées (179).

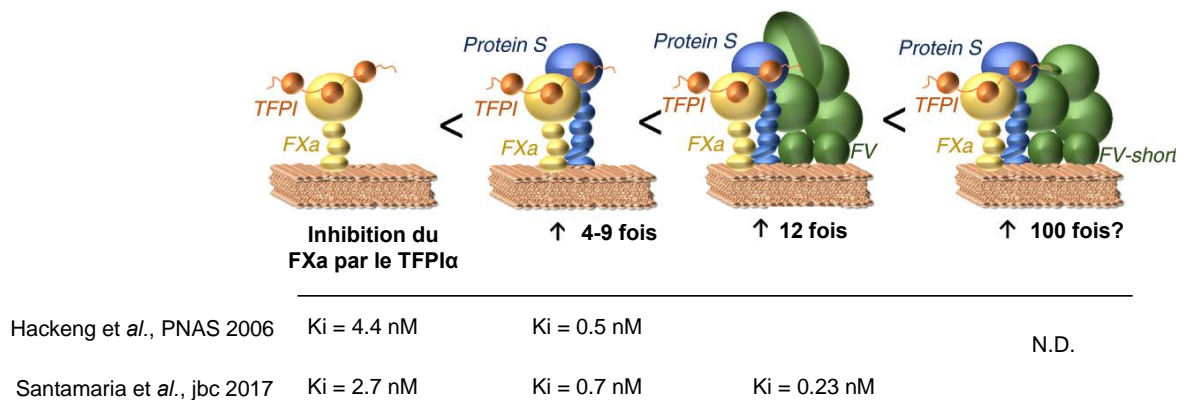


Figure 15 : Effets des cofacteurs du TFPI α dans l'inhibition du FXa. En présence de phospholipides anioniques et d'ions Ca²⁺, le TFPI α inhibe le FXa avec une Ki d'environ 2.7-4.4 nM. L'ajout de PS abaisse cette Ki à environ 0.5-0.7 nM et l'ajout de FV, en plus de la PS, l'abaisse encore plus (0.23 nM) (178,179). Le FV-short est un cofacteur encore plus actif que le FV dans l'inactivation du FXa puisqu'il faut 10 fois plus de FV pour obtenir un effet inhibiteur comparable à celui obtenu en présence de FV-short. Cependant, la Ki exacte de la réaction d'inhibition du FXa par le TFPI α /PS en présence de FV-short n'a pas été déterminée. Figure tirée de Gierula et al., J Thromb Haemost, 2020 (78), avec la permission de l'éditeur.

Un transcrite d'épissage du FV, le FV-short (**Figure 6**), a été décrit comme un « supercofacteur » synergique de la PS dans l'inhibition du FXa par le TFPI α . Le FV-short est un variant du FV dans lequel 702 aa (résidus 756-1458) du domaine B sont absents, suite à un épissage alternatif (**Figure 6**) (185–188). Dans le FV-short, le do-

maine BR est absent, et ne peut donc pas interagir avec la région AR2. Cette dernière région AR2 se retrouve donc librement exposée, et cette région a notamment été décrite comme pouvant interagir fortement avec le TFPI α (affinité de l'ordre de 90 pM) (185,189). En particulier, des études suggèrent que le FV-short pourrait jouer un rôle physiologique anticoagulant important, notamment en collaboration avec la PS lors de l'inhibition du FXa par le TFPI α . Le FV-short est très faiblement exprimé dans le plasma normal (0.2-0.4 nM), mais sa concentration peut être augmentée jusqu'à 10 fois chez les porteurs de la mutation A2440G dans le gène codant pour le FV (FV « East Texas »). En effet, cette mutation favorise l'épissage alternatif à l'origine du FV-short (185). Les patients porteurs de la mutation FV East Texas présentent un phénotype hémorragique car la surexpression de FV-short dans le plasma cause également une augmentation des taux circulants de TFPI α , probablement par diminution de la clairance de ce dernier.

Comme le FV, le FV-short potentialise l'inhibition de l'activité amidolytique du FXa par le TFPI α en présence de PS, alors qu'il n'a aucun effet en absence de PS (190,191). De plus, cet effet du FV-short est également retrouvé dans un test de génération de thrombine (190). De façon intéressante, le FV-short semble 10 fois plus efficace que le FV dans cet effet synergique (190). Par exemple, dans un test d'inhibition du FXa par le TFPI α /PS en système purifié, il faut utiliser des concentrations 10 fois plus élevées de FV, pour que l'effet synergique du FV soit comparable à celui du FV-short (190). Ceci résulterait en une activité du TFPI α potentiellement 100 fois plus forte en présence de FV-short et de PS, comparativement à son activité en présence de FV et de PS (**Figure 15**). De façon impressionnante, des concentrations sous-nanomolaires de FV-short sont ainsi suffisantes pour obtenir un effet synergique maximal avec la PS, alors qu'à ces mêmes concentrations le FV ne présente presque aucun effet cofacteur synergique avec la PS. Ces concentrations sous-nanomolaires de FV-short sont de l'ordre de grandeur des concentrations de FV-short circulant normalement dans le plasma (0.2-0.4 nM), suggérant que le FV-short pourrait effectivement jouer ce rôle physiologiquement.

2.2.3.4. Relation structure/fonction de l'activité cofacteur du TFPI α de la PS

L'interaction entre la PS et le TFPI α est évidemment cruciale pour l'expression de l'activité cofacteur du TFPI α de la PS. De façon surprenante, cette interaction est beaucoup plus facile à mettre en évidence expérimentalement que l'interaction entre la PS et la PCa. Ainsi, l'interaction entre la PS et le TFPI α peut être évaluée en absence de PLs, par résonance plasmonique de surface (SPR) (192) ou même en ELISA (181).

Il est largement démontré que le TFPI α interagit avec la PS par l'intermédiaire de son domaine K3 (**Figure 16**). En effet, le TFPI α délété de son domaine K3 (TFPI Δ K3 ou TFPI Δ C3) n'est pas stimulé par la PS, dans des tests de génération de thrombine ou d'activité amidolytique du FXa, et ne se lie pas à la PS (181). Des études plus approfondies utilisant des variants de TFPI α comprenant des mutations ponctuelles dans le domaine K3 du TFPI α montrent que le résidu Glu226 est crucial dans l'activité cofacteur de la PS. En effet, en système purifié, la PS ne présente aucun effet cofacteur sur le variant de TFPI α -E226Q, et son effet cofacteur est fortement réduit dans un test de génération de thrombine (193). De façon moins importante que le Glu226, le résidu Arg199 situé dans le domaine K3 du TFPI α a également été rapporté comme étant important pour l'interaction du TFPI α avec la PS (193,194).

Il apparait aussi clairement que la PS interagit avec le domaine K3 du TFPI α par l'intermédiaire de son domaine SHBG. Plus particulièrement, une importance spécifique du domaine LG1 dans cette interaction a été mise en évidence en étudiant des PS chimériques dans lesquelles les domaines LG1 et LG2 du domaine SHBG de la PS ont été remplacés par ceux de Gas6 (36). Des mutants de PS au niveau de ce domaine LG1 ont ensuite été générés par l'équipe de Bjorn Dahlbäck, pour tenter de préciser la zone d'interaction avec le TFPI α , et des clusters de résidus du domaine LG1 ont été identifiés (192). Cependant, cette étude n'a pas réussi à mettre en évidence des résidus sur la PS qui seraient cruciaux pour cette interaction (**Figure 16**), puisque les pertes d'activité cofacteur du TFPI α et d'interaction avec le TFPI α ne sont que modestes. Ceci souligne clairement que des études supplémentaires pour éventuelle-

ment identifier un résidu sur la PS qui, comme le résidu Glu226 sur le TFPI α , serait crucial pour l'interaction entre la PS et le TFPI α .

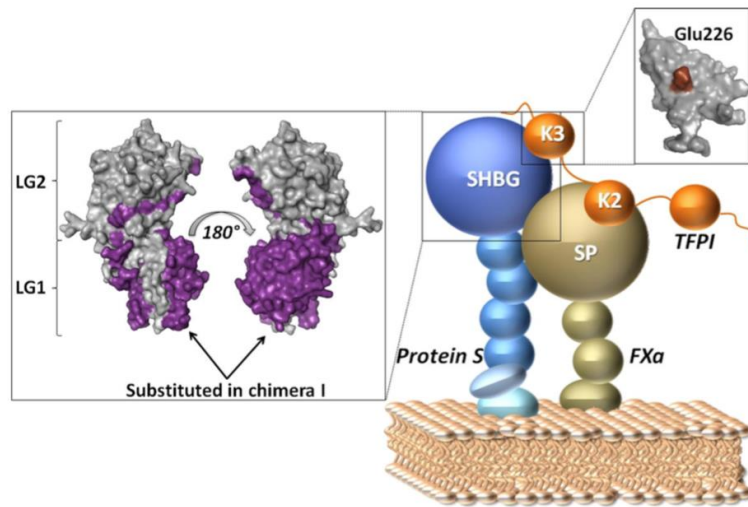


Figure 16 : Modèle représentant les résidus importants pour l'interaction entre la PS et le TFPI α . La PS interagit avec le TFPI α grâce à son domaine SHBG, et en particulier le domaine LG1 semble indispensable pour cette interaction (36). Le domaine du TFPI α interagissant avec la PS est son domaine K3, avec un acide aminé indispensable, le Glu226. Figure tirée de Reglinska-Matveyev *et al.*, Blood, 2014 (36), avec la permission de l'éditeur.

2.2.3.5. Importance de la formation du complexe entre la PS, le TFPI α , le FV/FV-short et le FXa

L'effet cofacteur synergique de la PS et du FV/FV-short sur le TFPI α suggère que la PS, le TFPI α et le FV/FV-short interagissent probablement tous ensemble, lors de l'inactivation du FXa (**Figure 17**).

Au sein de ce complexe, le TFPI α interagit avec la PS par l'intermédiaire de son domaine K3, avec le FXa par l'intermédiaire de son domaine K2, et avec le FV-short (ou FV) probablement par l'intermédiaire de sa région C-terminale basique. La PS, elle, interagirait avec le TFPI α via le domaine LG1 de son domaine SHBG, et avec le FV/FV-short, probablement par l'intermédiaire de l'extrémité C-terminale de son domaine SHBG (dans le domaine LG2) (37). Toutefois, l'implication effective de cette

extrémité C-terminale de la PS dans l'effet cofacteur synergique de la PS et du FV/FV-short n'a pas été prouvée expérimentalement.

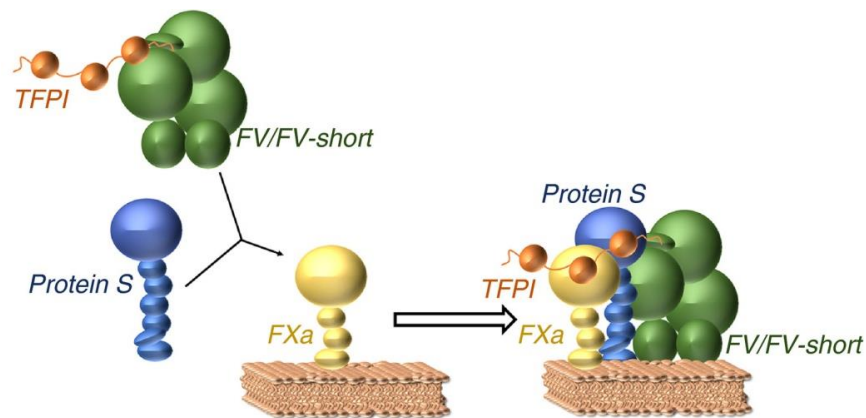


Figure 17 : Complexe tri-moléculaire formé par le TFPI α , la PS et le FV/FV-short dans l'inhibition du FXa. En raison des interactions décrites entre le TFPI α et la PS, mais aussi entre le TFPI α et le FV/FV-short, et finalement entre la PS et le FV/FV-short, la formation d'un complexe tri-moléculaire entre le TFPI α , la PS, le FV/FV-short, a été postulée. Ce complexe tri-moléculaire viendrait ensuite interagir avec le FXa pour l'inhiber. Dans le plasma, les taux de TFPI α et de FV, d'une part, mais également de TFPI α et de PS, d'autre part, semblent dépendants l'un de l'autre, ce qui suggère que ces complexes pourraient se former et circuler dans le plasma. Cependant, les bases moléculaires exactes de la formation de ce complexe et l'existence de tels complexes dans le plasma restent encore à mettre en évidence. Figure tirée de Gierula et *al.*, *J Thromb Haemost*, 2020 (78), avec la permission de l'éditeur.

Finalement, des données cliniques suggèrent que, dans le plasma, le TFPI α pourrait former un complexe avec du FV/FV-short. En effet, le déficit en FV est associé à une réduction des taux plasmatiques de TFPI α (195). À l'inverse, les patients porteurs de la mutation East Texas du FV (FV-A2440G) présentent des taux plasmatiques de FV-short élevés, mais également des taux plasmatiques de TFPI α augmentés de 10 fois (185). Ces patients présentent un phénotype hémorragique qui pourrait en partie s'expliquer par une augmentation de l'activité anticoagulante du TFPI α . Également, l'immunodéplétion en FV d'un plasma normal entraîne une déplétion de TFPI α (195). De façon similaire, lorsque du TFPI α est immunoprécipité à partir de plasma normal, du FV et du FV-short sont co-immunoprécipités (185). L'ensemble de ces expériences

d'immunodéplétion renforcent ainsi l'hypothèse que le FV et le FV-short sont des transporteurs de TFPI α dans le plasma.

Certaines observations suggèrent également que le TFPI α et la PS pourraient former un complexe dans le plasma. En effet, les individus atteints d'un déficit quantitatif en PS présentent également une réduction des taux plasmatiques de TFPI α dans le plasma (196). De plus, l'activité anticoagulante du TFPI α corrèle avec la concentration de PS (197). Ainsi, malgré la faible affinité de l'interaction entre la PS et le TFPI α *in vitro*, en absence de PLs (évaluée entre 0.15 μ M et 1 μ M) (181,193,196), la PS et le TFPI α pourraient former un complexe *in vivo*. Toutefois, lorsque du TFPI α est immunoprécipité à partir de plasma normal, de la PS ne semble pas être co-immunoprécipitée, contrairement au FV et au FV-short (185). De plus, étant données les faibles concentrations plasmatiques de TFPI α libre retrouvées dans le plasma (0.16-0.25 nM), la formation de ce complexe semble très hypothétique. Ceci pourrait suggérer d'autant plus la présence d'un autre partenaire plasmatique, qui pourrait être le FV/FV-short et qui permettrait physiologiquement la formation du complexe entre la PS et le TFPI α . Ainsi, le FV/FV-short pourrait jouer un rôle clé dans l'interaction de la PS avec le TFPI α *in vivo*, et permettrait la formation d'un complexe tri-moléculaire PS/TFPI α /FV ou FV-short (**Figure 17**) (78).

2.3. Activités d'inhibition directe de la PS

La PS a largement été étudiée pour son rôle de cofacteur de la PCa et du TFPI α . Cependant, certaines études révèlent que la PS présente également des propriétés anti-coagulantes, indépendantes de la PCa et du TFPI α , *in vitro*.

2.3.1. Inhibition directe du complexe prothrombinase

Au début des années 1990, plusieurs études ont montré que la PS, même en absence de PCa, pouvait inhiber la formation de thrombine par le complexe prothrombinase, probablement en interagissant avec le FVa et le FXa (14,15).

Dans des tests de liaison en ELISA, la PS se lie à du FVa (et du FV) immobilisé (13). Réciproquement, le FVa est également capable de se lier à de la PS immobilisée. La liaison de la PS au FVa a également été vérifiée en phase liquide, et une affinité de l'ordre de 33 nM a été mesurée (13). La PS est également capable d'inhiber la liaison de la prothrombine à du FVa, et il a été proposé que ceci était vraisemblablement dû à un effet de compétition entre la PS et la prothrombine au niveau de sites de liaison sur le FVa, plutôt qu'à une interaction de la PS avec la prothrombine (13).

Une analyse cinétique plus poussée de l'inhibition directe du complexe prothrombinase par la PS suggérait toutefois que le mécanisme de cette inhibition était complexe et ne dépendait pas uniquement de sa capacité à interagir avec le FVa (13). Par la suite, la même équipe de recherche a montré que la PS pouvait également interagir avec le FXa, avec une affinité de l'ordre de 18 nM en phase liquide (14). Dans cette étude, la PS démontrait une activité inhibitrice sur l'activité amidolytique du FXa, ainsi que sur l'activité protéolytique du FXa vis-à-vis de la prothrombine, dans le contexte d'un complexe prothrombinase (14).

Une autre équipe a proposé que l'effet inhibiteur direct de la PS sur le complexe prothrombinase pourrait plutôt être lié à sa capacité à se lier aux PLs avec une forte affinité, et donc à entrer en compétition avec des composants du complexe prothrombinase vis-à-vis de leur liaison aux PLs (198). Cette hypothèse a été basée sur l'observation que l'activité anticoagulante directe de la PS est très variable d'une préparation de PS à l'autre, et que les activités anticoagulantes directes de ces différentes préparations corrèlent positivement avec leurs affinités pour les PLs. Plus tard, l'équipe de Tilman Hackeng a montré que des formes multimériques de PS étaient contenues dans les préparations de PS purifiées. De façon intéressante, les formes multimériques de PS présentent une très forte affinité pour les PLs ($K_d < 1$ nM), comparativement à de la PS non multimérisée ($K_d \sim 250$ nM), ainsi qu'une forte capacité à inhiber directement le complexe prothrombinase (199).

L'importance physiologique de l'activité inhibitrice directe de la PS sur le complexe prothrombinase reste donc encore controversée à l'heure actuelle. Ceci est principalement dû aux différences importantes qui existent entre les conditions expérimentales, mais également les préparations de PS utilisées, pour démontrer cet effet *in vitro*. En particulier, il est reconnu que la capacité de la PS purifiée à inhiber directement le complexe prothrombinase est largement dépendante de sa méthode de purification (200), car celle-ci peut conduire à des quantités variables de formes multimériques. La question de la présence de ces formes multimériques de PS dans le plasma, et la capacité de la PS plasmatique native à exercer une activité inhibitrice directe du complexe prothrombinase, n'est pas encore tranchée (199,200). Enfin, il n'est pas clair si la PS non multimérisée est capable d'exercer cette activité inhibitrice directe, même si l'équipe de Mary-Jo Heeb avait montré que la PS multimérisée et non multimérisée étaient capables d'inhiber directement le complexe prothrombinase (201).

2.3.2. Inhibition directe du complexe ténase intrinsèque

Plusieurs études ont également montré que la PS était capable d'inhiber le complexe ténase intrinsèque, indépendamment de la PCa. Dans l'une d'elles, la PS diminue la génération de FXa par le complexe ténase intrinsèque, que ce soit en système purifié en mesurant l'activité amidolytique du FXa (12,202), ou en système plasmatique, en déterminant le temps de coagulation déclenché par du FIXa dans un plasma déficient en FIX (203).

Les données suggèrent qu'en interagissant avec le FVIIIa, la PS limite également l'interaction entre le FVIIIa et le FIXa, et donc l'activité du FVIIIa sur le FIXa (12). En particulier, la PS pourrait interagir directement avec le FVIIIa et entrer en compétition avec le FIXa pour l'interaction avec le FVIIIa.

Des tests directs de liaison en SPR et ELISA montrent que le FVIIIa interagit avec la PS avec une affinité de l'ordre de 14 nM, par l'intermédiaire de ses domaines A2 et A3 (12).

Très récemment, l'équipe de Rinku Majumder a proposé une interaction directe entre la PS et le FIXa, *in vitro* et *in vivo*, entraînant une inhibition de l'activité enzymatique du FIXa (147,203). En utilisant des variants de FIXa, il a été montré que le FIXa interagissait avec la PS par l'intermédiaire d'un exosite liant l'héparine, situé à proximité du centre catalytique du FIXa (147). En revanche, les résidus ou domaines de la PS qui interagiraient avec le FIXa n'ont pas encore été identifiés. Pour démontrer l'importance physiologique potentielle de cette activité inhibitrice de la PS sur FIXa *in vivo*, du FIXa ou un mutant de FIXa moins sensible à l'inhibition par la PS (FIXa-K132A/R170A) ont été injectés à des souris hémophiles B, et la formation de thrombus a été mesurée. De façon intéressante, la taille du thrombus formé est plus importante avec le mutant FIXa-K132A/R170A qu'avec du FIXa (147). Ces données suggèrent ainsi que la PS pourrait effectivement inhiber le FIXa *in vivo* et ainsi limiter la génération de thrombine et la formation du thrombus.

2.4. Complexité des activités anticoagulantes de la PS

A la lecture des données bibliographiques sur les activités anticoagulantes de la PS, il apparaît de manière évidente que celles-ci sont particulièrement complexes. La PS semblerait ainsi agir à de multiples niveaux de la coagulation (**Figure 18**). Lors de l'initiation de la coagulation, la PS fonctionne en tant que cofacteur du TFP α dans l'inhibition du FXa et l'inhibition du complexe FT/FVIIa. D'autre part, la PS stimule les dégradations protéolytiques du FVa et le FVIIIa par la PCa, pour limiter les activités des complexes ténase intrinsèque et prothrombinase, respectivement. Une activité d'inhibition directe de la PS a même été décrite sur les complexes prothrombinase et ténase intrinsèque, sur le FIXa, ou de façon encore plus anecdotique le FXa.

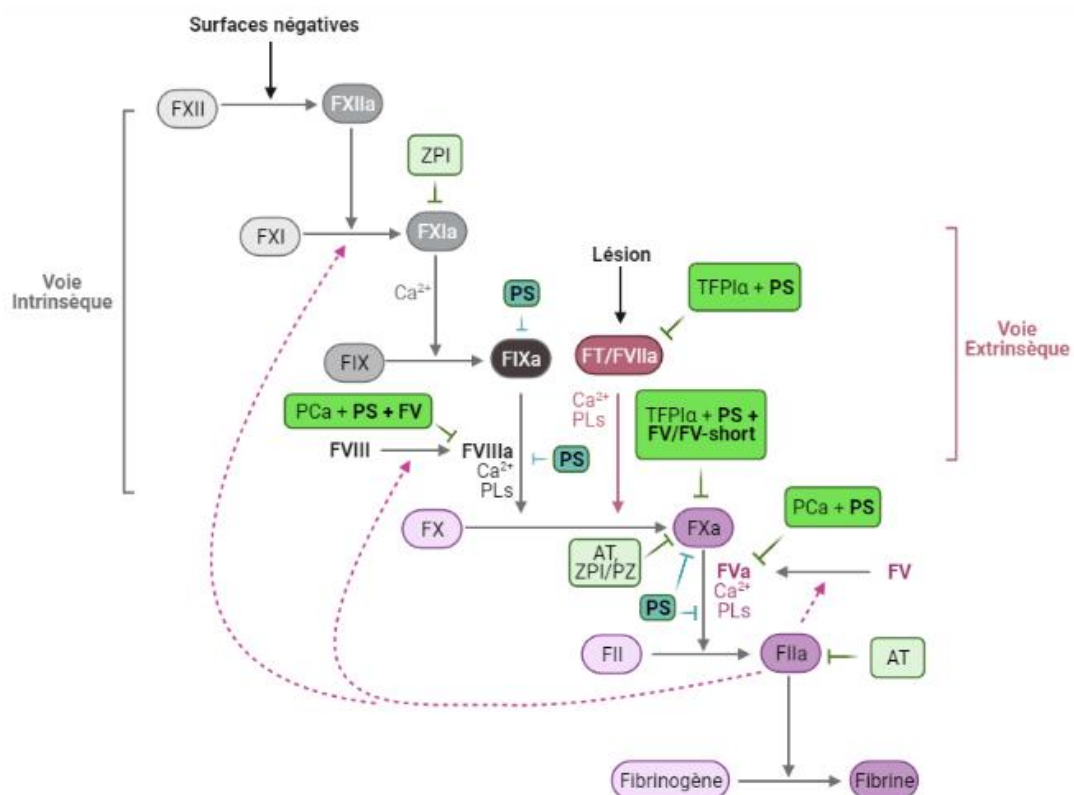


Figure 18 : Les différentes activités anticoagulantes de la PS. La PS exerce ses activités anticoagulantes à différents niveaux de la cascade de coagulation. Elle assure un rôle de cofacteur de la PCa lors du clivage protéolytique du FVa et du FVIIIa, mais également du TFP α dans l'inhibition du FXa généré par le complexe FT/FVIIa ou par le complexe ténase intrinsèque. D'autres activités d'inhibitions directes des complexes prothrombinase, ténase intrinsèque, du FXa et du FIXa ont également été décrites pour la PS.

Tous ces effets anticoagulants de la PS ont été identifiés *in vitro*, mais leur importance physiologique reste cependant difficile à évaluer. De plus, il est difficile d'imaginer comment la PS pourrait exercer effectivement tous ces différents effets *in vivo*. A l'heure actuelle, les activités cofacteur de la PCa et du TFP α sont les plus acceptées, même si leurs bases moléculaires restent non élucidées.

Pour assurer ses nombreuses activités anticoagulantes, la PS doit interagir avec de multiples partenaires, parmi lesquels la PCa, le TFP α , le FVa, le FVIIIa, le FV/FV-short, le FXa, ou le FIXa. Ces interactions sont à priori complexes, ont probablement lieu au niveau de larges complexes multi-moléculaires, et pourraient impliquer des zones étendues sur la PS, au sein de différents domaines de la PS (**Figure 19**).

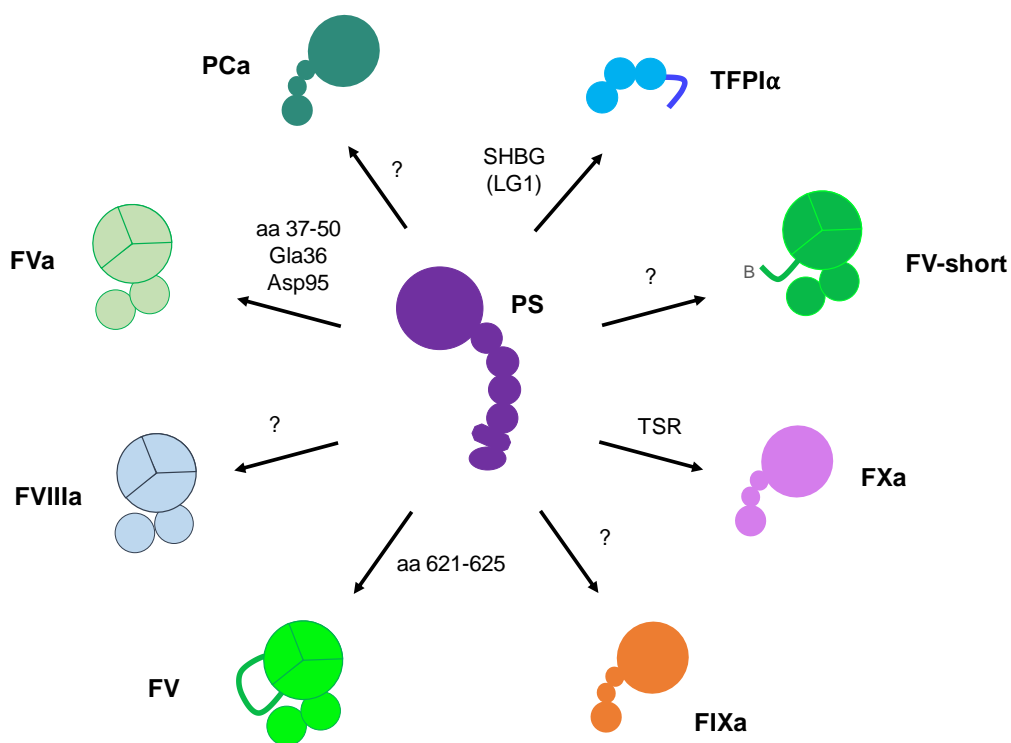


Figure 19 : Les multiples interactions de la PS avec les protéines de la coagulation. La PS interagit avec la PCa, le TFPI α et le FV/FVa. D'autres partenaires de la PS sont également décrits, comme le FVIIIa, le FIXa, le FXa, et probablement aussi le FV-short. Cependant, les domaines de la PS impliqués dans ces dernières interactions ne sont pas connus.

Comme la PS interagit avec de nombreux partenaires qui peuvent potentialiser ou inhiber ses activités anticoagulantes, il est possible de proposer qu'une modulation de ces interactions pourrait avoir des conséquences fonctionnelles différentes, avec des effets aussi bien antithrombotiques que pro-hémostatiques.

Chapitre 3 – Activités non anticoagulantes de la PS

Il est largement reconnu que la PCa exerce non seulement des activités anticoagulantes, mais également des effets cellulaires variés. En particulier, la PCa est capable d'activer le récepteur PAR1 à la surface des cellules endothéliales, et d'entraîner de puissants effets cytoprotecteurs (anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et protecteurs de la fonction de la barrière endothéliale) (204). De façon similaire, la PS exerce des effets cellulaires indépendants de ses propriétés anticoagulantes. En effet, la PS a été identifiée en 1995 comme un ligand activant Tyro3, un récepteur appartenant à une famille de trois récepteurs à activité tyrosine kinase : Tyro3, Axl, et MerTK (récepteurs TAM) (205). Au cours de cette étude pionnière, Gas6, qui est fortement homologue à la PS (**Partie 1.2**), a également été identifiée comme un ligand d'Axl (205). Par la suite, de nombreuses études viendront confirmer ces résultats et caractériser plus en détail l'activation des récepteurs TAM par la PS et Gas6. En particulier, il sera démontré que ces deux ligands activent les récepteurs TAM de façon différente. En effet, la PS n'active que MerTK et Tyro3, mais pas Axl. Au contraire, Gas6 active très préférentiellement Axl, puis moins fortement les récepteurs Tyro3 et MerTK.

La PS est de plus en plus reconnue comme un ligand physiologiquement important des récepteurs MerTK et Tyro3. Même si les effets cellulaires de la PS sont loin d'être caractérisés en détail, notamment au niveau vasculaire, il apparaît raisonnable de devoir les prendre en considération. En effet, ces effets pourraient participer aux effets de la PS dans l'hémostase et l'inflammation, et pourraient être altérés dans certaines pathologies thrombo-inflammatoires. De plus, une modulation pharmacologique des activités anticoagulantes de la PS pourrait interférer avec ces effets cellulaires.

3.1. Généralités sur la famille des récepteurs TAM

Les récepteurs TAM sont relativement homologues entre eux. En particulier, ils sont tous les trois composés d'un domaine extracellulaire N-terminal comprenant deux domaines immunoglobulines (Ig) et deux domaines fibronectine de type III, et ce domaine extracellulaire est suivi d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase (**Figure 20**) (206). Comme tous les récepteurs à activité tyrosine kinase, les récepteurs TAM transduisent des signaux intracellulaires par trans-autophosphorylation de leur domaine intracytoplasmique, et régulent différents processus cellulaires comme la migration, l'adhérence, la prolifération et la survie. Ainsi, il n'est pas étonnant que les récepteurs aient été largement impliqués dans le cancer, et que leur ciblage thérapeutique soit l'objet d'intenses recherches, actuellement.

Les récepteurs TAM sont exprimés à la surface d'un nombre très varié de types cellulaires, comme les cellules de Sertoli (207), les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (cellules RPE) (208), les kératinocytes (209), ou les ostéoclastes (210,211). Ces récepteurs sont également retrouvés à la surface de plusieurs cellules du système immunitaire, comme les macrophages et les cellules dendritiques (212,213), les cellules de Langerhans de l'épiderme, ou les cellules « natural killer » (214). Au niveau vasculaire, les récepteurs TAM sont exprimés par les plaquettes (215,216), les monocytes (217), les neutrophiles (218), les cellules endothéliales (219–221), et les cellules musculaires lisses (222,223). Pour chaque type cellulaire, le profil d'expression est complexe, avec une expression d'un seul, de deux, ou de trois récepteurs TAM possible. La biologie des récepteurs TAM est donc très complexe et contexte-dépendante, car celle-ci implique trois récepteurs et au moins deux ligands, la PS et Gas6. Parmi les ligands des récepteurs TAM, Gas6 apparaît souvent comme le ligand majoritairement utilisé dans les études *in vitro*, ce qui pourrait contribuer à sous-estimer l'importance de la PS en tant que ligand des récepteurs TAM. Toutefois, la PS apparaît comme un ligand physiologiquement important de MerTK et Tyro3.

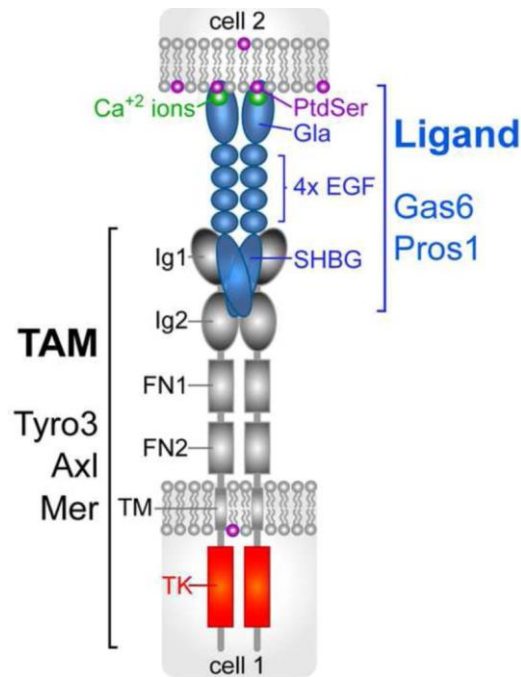


Figure 20 : Interaction entre les récepteurs TAM et la PS. Les récepteurs TAM, via leurs domaines immunoglobulines (Ig), interagissent avec le domaine SHBG de la PS (ou de Gas6). La PS (et Gas6), via leur domaine Gla, interagissent avec la PdSer exposée sur des cellules apoptotiques ou des cellules activées, ou même exprimée faiblement à la surface de cellules non activées. Cette liaison à la PtdSer favorise l'interaction des ligands PS et Gas6 avec les récepteurs TAM, exprimés à la surface d'une autre cellule, ou sur la même cellule exprimant la PtdSer. Bien que ce mécanisme reste à être confirmé, il a été proposé que les ligands (PS ou Gas6) puissent homodimériser et ainsi entraîner la dimérisation des récepteurs TAM (224). Figure tirée de Greg Lemke, Trends Biochem Sci, 2017 (224), avec la permission de l'éditeur.

3.2. Rôle de la voie PS/TAM dans l'inflammation

L'analyse phénotypique des souris triple knock-out *Tyro3^{-/-}Axl^{-/-}Mertk^{-/-}* (207,225) a permis de mettre en évidence que les récepteurs TAM étaient tout à fait uniques parmi les autres récepteurs à activité tyrosine kinase, en étant impliqués de façon particulièrement importante dans la régulation négative de l'immunité ainsi que dans l'efférocytose et la phagocytose (226). Si les trois récepteurs TAM semblent jouer un rôle immunorégulateur, MerTK a été plus particulièrement impliqué dans les processus de phagocytose et d'efférocytose.

3.2.1. Efférocytose

La phagocytose est un processus qui permet à des cellules immunitaires spécialisées, comme les macrophages ou les cellules dendritiques, d'ingérer des pathogènes et des débris cellulaires, pour s'en débarrasser. L'efférocytose, elle, est le processus qui consiste en la phagocytose et l'élimination de cellules apoptotiques ou de certains corps cellulaires, par des phagocytes « professionnels » ou « non professionnels » (227). Les macrophages sont un exemple de phagocytes professionnels particulièrement impliqués dans l'efférocytose des cellules apoptotiques.

L'efférocytose est cruciale dans des processus de renouvellement de cellules à fort turn-over, mais elle participe également aux phases tardives de l'inflammation, par exemple lorsque les neutrophiles entrent en apoptose et doivent être éliminés lors de la phase de résolution de l'inflammation. Dans ces phases tardives, et contrairement à la phagocytose de micro-organismes pathogènes, la phagocytose de cellules apoptotiques se doit d'être immuno-silencieuse. Ainsi, l'efférocytose s'accompagne d'une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF (facteur de nécrose tumorale) ou l'interleukine (IL) 1 β , mais également d'une stimulation de la production de médiateurs anti-inflammatoires, comme par exemple l'IL-10 ou des molécules lipidiques de résolution de l'inflammation (résolvines) (228).

Au cours de l'efférocytose, l'exposition de PtdSer à la surface des cellules apoptotiques agit comme l'un des multiples signaux de reconnaissance et d'ingestion par les phagocytes (**Figure 21**) (229). La PtdSer exposée est ensuite reconnue par les récepteurs TAM, ce qui déclenche ensuite des voies de signalisation dans lesquelles l'activation de la RhoGTPase Rac1 joue un rôle central pour entraîner les remaniements cellulaires nécessaires à l'ingestion (230).

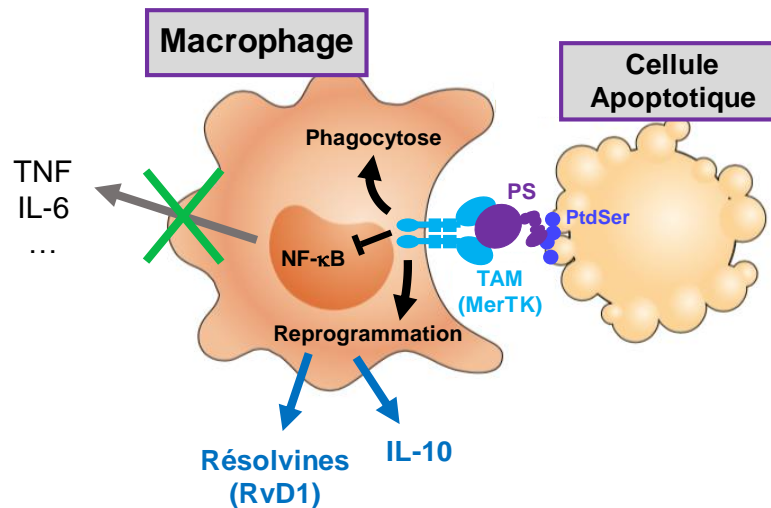


Figure 21 : Rôles de la voie PS/TAM dans l'inflammation. Les cellules/corps cellulaires exposant de la PtdSer sont reconnus par les phagocytes grâce à un mécanisme de « pontage » assuré par la PS (ou Gas6). Ce mécanisme permet ensuite l'activation des récepteurs TAM, le plus souvent MerTK, et le déclenchement de voies de signalisation facilitant le remodelage du cytosquelette au sein des phagocytes, pour favoriser l'ingestion des cellules apoptotiques. La voie PS/TAM est également impliquée dans l'inhibition de la voie du facteur de transcription NF- κ B et la diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, mais également dans la reprogrammation du macrophage vers une production de médiateurs anti-inflammatoires et pro-résolutifs de l'inflammation, comme l'IL-10 et les résolvines, respectivement.

La PtdSer est reconnue de façon indirecte par les récepteurs TAM. En effet, la PS et Gas6 assurent un rôle de « pont » moléculaire entre la PtdSer exposée par les cellules apoptotiques et le récepteur TAM exprimé par le phagocyte (**Figure 21**) (206,231). Au niveau moléculaire, la PS et Gas6 se lient à la PtdSer par l'intermédiaire de leur domaine Gla, et interagissent avec les récepteurs TAM par l'intermédiaire de leur domaine SHBG (232–235). Des résidus importants pour l'activation des récepteurs TAM ont été localisés au niveau du domaine LG1, même si aucun résidu crucial n'a été identifié (233).

La PS a été largement impliquée dans des processus de phagocytose/efférocytose, y compris *in vivo*, et le récepteur TAM impliqué est presque exclusivement MerTK. Ainsi, la PS exprimée par les cellules RPE est impliquée dans la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par ces cellules, par

l'intermédiaire de l'activation de MerTK (49). Il a aussi été montré que la voie PS/MerTK était impliquée, au cours de l'érythropoïèse, dans l'élimination des noyaux expulsés à partir des érythroblastes, qui mène à la production des réticulocytes. (236).

3.2.2. Régulation de l'expression de cytokines de l'inflammation

De façon très intéressante, il a été montré plus récemment que la PS était produite par les macrophages, dans un modèle murin de péritonite, mais seulement au cours de la phase tardive de résolution de l'inflammation (54). En supprimant l'expression de PS spécifiquement dans les macrophages, il a pu être montré que la PS facilitait l'efférocytose des polynucléaires neutrophiles (et autres débris cellulaires), mais qu'elle exerçait également des effets anti-inflammatoires au niveau des macrophages (54). Plus précisément, l'activation de MerTK par la PS permettrait de « reprogrammer » les macrophages et de les diriger vers une production de médiateurs fortement anti-inflammatoires et résolutifs de l'inflammation, parmi lesquels des molécules lipidiques dites « résolutives de l'inflammation », comme la résolvine D1 (RvD1) (237).

Toujours dans les phases tardives de l'inflammation, la PS exerce également des effets anti-inflammatoires au niveau des cellules dendritiques. Au cours des phases précoces de l'inflammation, les cellules dendritiques activent les lymphocytes T pour initier la réponse immunitaire adaptative. Toutefois, les lymphocytes T activés doivent également être capables de mettre en place des systèmes immunorégulateurs pour ensuite réduire cette activation des cellules dendritiques, et limiter la durée et l'intensité de la réponse immunitaire (238). La voie PS/TAM est l'un de ces systèmes, fonctionnant ainsi à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. Cette voie ne doit pas être active au tout début de la réponse immunitaire, lorsqu'une activation des cellules dendritiques est nécessaire, mais elle s'active au fur et à mesure de la mise en place de la réponse immunitaire, notamment parce que les récepteurs TAM sont fortement exprimés après activation des récepteurs Toll-like (TLRs) dans les cellules dendritiques (226). La PS exprimée par les lymphocytes T activés, eux-mêmes,

engagerait ensuite les récepteurs TAM sur les cellules dendritiques, pour limiter ou éteindre leur activation, et diminuer notamment la production de cytokines pro-inflammatoires. Ce mécanisme a été élégamment démontré en supprimant l'expression de PS spécifiquement dans les lymphocytes T (55). De façon intéressante, cette PS lymphocytaire resterait confinée à la surface des lymphocytes T activés, car ceux-ci exposent également de la PtdSer (55). Ceci permettrait donc de localiser cet effet inhibiteur de la PS au niveau de la synapse formée entre le lymphocyte T et la cellule dendritique.

3.3. Rôle de la voie PS/TAM dans le système vasculaire

Les observations précédentes démontrent que, dans un contexte inflammatoire, la voie PS/TAM est essentielle dans la résolution de l'inflammation et la restauration de l'homéostasie tissulaire. L'activation des récepteurs TAM pourrait également jouer un rôle dans l'homéostasie vasculaire. En effet, ces récepteurs semblent être capables de fonctionner au niveau intravasculaire (plaquettes et leucocytes circulants) et extravasculaire (cellules musculaires lisses), ainsi qu'au niveau de l'endothélium vasculaire. A nouveau, le rôle de Gas6 dans le système vasculaire a été beaucoup plus étudié que celui de la PS, probablement car le récepteur Axl a été pendant longtemps le récepteur TAM le plus étudié au niveau vasculaire.

3.3.1. Rôle de la PS dans cellules endothéliales

Les cellules endothéliales expriment les récepteurs TAM, avec un profil d'expression variable en fonction du type de cellules endothéliales (219–221), et expriment également de la PS (44,45,67). Axl est généralement considéré comme le récepteur TAM majoritairement exprimé à la surface de l'endothélium, et son activation par Gas6 a été beaucoup plus étudiée que l'activation de Tyro3/MerTK par la PS. L'ensemble des

données publiées vont dans le sens d'une contribution de la voie Gas6/Axl dans l'activation des cellules endothéliales, l'inflammation vasculaire, et la thrombogénicité (239).

Néanmoins, la PS pourrait exercer des effets plutôt protecteurs sur les cellules endothéliales, par l'intermédiaire de l'activation des récepteurs MerTK et Tyro3. De façon intéressante, une étude récente a montré que sur des cellules endothéliales pulmonaires humaines, le knock-down de MerTK induit une perméabilité basale (240). La suppression de l'expression de MerTK dans les cellules endothéliales augmente également la perméabilité et la transmigration de neutrophiles induites par le TNF, et l'expression des molécules d'adhérence ICAM-1 (protéine d'adhésion intercellulaire) et VCAM-1 (protéine d'adhésion aux cellules vasculaires 1) est augmentée dans ces cellules (240). Cependant, dans cette même étude, l'expression de MerTK a été spécifiquement supprimée dans les cellules endothéliales, chez la souris, et les résultats obtenus *in vitro* n'ont pu être confirmés *in vivo* (240).

Dans une autre étude, il a été montré que la PS renforce la barrière endothéliale dans un modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique (BHE), avec des cellules endothéliales cérébrales murines qui expriment Axl et MerTK (221). Dans ce système d'étude, MerTK est le récepteur TAM impliqué dans ces effets protecteurs. De façon intéressante, les auteurs ont proposé qu'un tel mécanisme de renforcement de la BHE par l'intermédiaire de l'activation de MerTK pourrait être utilisé à leur avantage par des virus enveloppés neuro-invasifs qui exposent de la PtdSer, pour favoriser l'infection virale (221).

Une dernière étude confirme que la PS pourrait jouer un rôle dans le maintien de la fonction de barrière endothéliale, à nouveau au niveau de la BHE (220). Dans cette étude, un modèle *in vitro* de BHE humaine a été utilisé pour montrer que la PS est capable de réduire la perméabilité de la monocouche endothéliale induite par une déprivation en oxygène et glucose (220). Cet effet protecteur de la PS est cette fois dépendant de l'activation de Tyro3, mais pas de MerTK ou Axl. Dans un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris, l'administration de PS prévient les fuites vascu-

laires au niveau des microvaisseaux corticaux cérébraux, et cet effet de protection de la BHE *in vivo* n'est pas observé sur des souris *Tyro3^{-/-}* (220).

Collectivement, ces données démontrent que la PS pourrait effectivement jouer un rôle de protection de la barrière endothéliale, par l'intermédiaire de l'activation des récepteurs Tyro3 et MerTK.

3.3.2. Rôle de la PS dans les cellules musculaires lisses

Axl est exprimé par les cellules musculaires lisses et des agents impliqués dans le remodelage vasculaire, comme la thrombine et l'angiotensine II, entraînent une surexpression d'Axl (241). L'expression de Tyro3 et MerTK à la surface des cellules musculaires lisses, ainsi que leurs rôles dans les fonctions de ces cellules, n'ont pas été rapportés dans la littérature. Ainsi, la voie Gas6/Axl a été très largement étudiée dans les cellules musculaires lisses et le remodelage vasculaire, avec des effets de régulation positive sur la survie, la prolifération, et la migration de ces cellules (241–243).

En revanche, les effets fonctionnels de la PS sur les cellules musculaires lisses restent à l'heure actuelle très mal caractérisés. Avant la mise en évidence de l'activation des récepteurs TAM par la PS, l'équipe d'Omar Benzakour avait montré que la PS présentait un très fort effet mitogène sur des cellules musculaires lisses de rat, aussi puissant que celui induit par la thrombine, sans pour autant identifier spécifiquement le récepteur cellulaire impliqué (244). Cet effet a été confirmé sur des cellules musculaires lisses humaines (245,246), et l'implication d'un récepteur cellulaire non identifié a été démontrée (246). Plus tard, il a finalement été montré que les cellules musculaires lisses humaines synthétisaient de la PS, et que son expression était stimulée par la thrombine (243).

Le rôle de la PS sur les cellules musculaires reste cependant intrigant. En effet, Axl semble être le récepteur TAM très majoritairement exprimé à la surface des cellules musculaires lisses, mais il est largement reconnu que la PS n'active pas Axl.

3.3.3. Rôle de la PS dans les leucocytes circulants

Dans une étude récente, il a été montré que des monocytes humains exprimaient MerTK, mais peu Tyro3 et pas d'Axl (19). Même s'ils sont viables, ces monocytes exposent également de petites quantités de PtdSer qui sont suffisantes pour capter de la PS, comme démontré expérimentalement dans cette étude (19). De façon très surprenante, et contrairement à ce qui est observé sur des macrophages en présence de cellules apoptotiques, la PS stimule sur ces monocytes la production de cytokines pro-inflammatoires (comme par exemple le TNF et l'IL-6) déclenchée par le LPS (19). Cette stimulation par la PS est réversée lorsque les monocytes sont traités avec un inhibiteur pharmacologique des récepteurs TAM, et la seule présence de PS n'entraîne pas de production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes.

Les auteurs de cette étude ont donc proposé que la PS pourrait jouer un rôle au niveau de la phase d'initiation de l'inflammation, complètement à l'opposé de son rôle anti-inflammatoire dans les phases tardives de résolution de l'inflammation (**Partie 3.2.2**). En effet, étant donnée la forte concentration de PS dans le plasma, et la faible exposition de PtdSer à la surface des monocytes circulants, ces cellules pourraient être naturellement « opsonisées » par la PS, pour répondre rapidement à des stimuli pro-inflammatoires (19).

3.3.4. Rôle de la voie PS/TAM dans les plaquettes

L'implication des récepteurs TAM dans la physiologie plaquettaire a été suggérée par l'observation que les souris knock-out pour *Gas6* (*Gas6*^{-/-}) étaient fortement protégées dans des modèles variés de thrombose (247). Par la suite, il a montré que les souris knock-out pour chaque récepteur TAM (*Axl*^{-/-}, *Tyro3*^{-/-}, et *Mertk*^{-/-}) étaient également protégées dans ce type de modèles de thrombose (215). Cette protection a été attribuée à un défaut d'activation plaquettaire, mais seulement induite par de faibles concentrations d'ADP, ainsi qu'à un défaut de signalisation « outside-in » de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et, par conséquent, à un défaut de stabilisation du thrombus (215,247,248). Chez la souris, l'activation par *Gas6* des récepteurs TAM plaquettaires est rendue possible car *Gas6* est contenue dans les granules α des plaquettes (247). Toutefois chez l'homme, le rôle d'une telle voie *Gas6*/TAM dans les plaquettes est resté controversée. En effet, *Gas6*, n'a pu être détectée dans les plaquettes humaines, et *Gas6* n'est présente qu'à très faibles concentrations dans le plasma humain (0.16-0.28 nM), et proviendrait des cellules endothéliales (249,250).

Contrairement à *Gas6*, la PS est contenue dans les granules α plaquettaires chez l'homme, et son ligand préférentiel est MerTK. Or, MerTK semble être le récepteur très majoritairement exprimé par les plaquettes humaines (251), et un inhibiteur pharmacologique de MerTK inhibe l'activation et l'agrégation de plaquettes humaines *in vitro* (216).

Ces observations suggèreraient que le ligand physiologique de MerTK, dans les plaquettes humaines, pourrait être la PS. Néanmoins, le rôle de la PS en tant qu'activateur de MerTK à la surface des plaquettes humaines n'a jamais été rapporté. Lors de la formation d'un thrombus chez l'homme, l'activation du récepteur MerTK plaquettaire (si elle existe), et la nature du ligand impliqué, restent ainsi encore hypothétiques.

3.4. Bases moléculaires de l'activation des TAM par la PS

La compréhension des mécanismes d'activation de MerTK au cours de l'efférocytose des cellules apoptotiques a permis ensuite de montrer que l'activation des récepteurs TAM par la PS était fortement potentialisée en présence de surfaces exposant de la PtdSer (232,252), même pour des processus indépendants de la phagocytose et de l'efférocytose. Ainsi, en présence de PtdSer, la PS active beaucoup plus fortement ses récepteurs MerTK et Tyro3. En revanche, la PS semble rester incapable d'activer directement Axl, même en présence de surfaces contenant de la PtdSer. Physiologiquement, ces surfaces peuvent être présentes au niveau de cellules apoptotiques, de cellules activées (plaquettes, lymphocytes T) ou non (monocytes), de microvésicules produites par des cellules activées (plaquettes, cellules endothéliales, leucocytes), de globules non fonctionnels, ou encore à la surface de virus enveloppés. Ainsi, il est possible de proposer que la voie PS/TAM soit particulièrement opérante lorsque de telles surfaces contenant de la PtdSer sont présentes.

Les mécanismes moléculaires à la base de la potentialisation par la PtdSer de l'activation des récepteurs TAM par la PS ne sont pas encore élucidés. Il a été proposé que la liaison de la PS sur la PtdSer exposée entraînerait un changement de conformation, notamment au niveau du domaine SHBG, permettant de moduler l'interaction entre le ligand et son récepteur (252). Alternativement, il est possible d'envisager que la liaison du ligand à la PtdSer induise sa multimérisation, et ensuite l'oligomérisation (« clustering ») du récepteur TAM, potentialisant ainsi fortement son activation (**Figure 20**) (252). De façon très intéressante, ce dernier mécanisme serait en accord avec l'observation que la liaison de la PS sur des cellules apoptotiques, ou des vésicules phospholipidiques anioniques contenant de la PtdSer, entraîne une multimérisation de la PS (253). Cette forte potentialisation par la PtdSer souligne enfin l'importante fonctionnelle du domaine Gla et de sa γ -carboxylation, en plus du domaine SHBG dans les effets cellulaires de la PS.

Chapitre 4 – Importance physiologique de la PS

4.1. Importance physiologique de la PS chez l'homme

4.1.1. Manifestations cliniques des déficits en PS

La PS étant une protéine anticoagulante, les déficits en PS sont associés à des manifestations thrombotiques. Lorsque le déficit en PS est modéré, celui-ci est associé à un risque accru d'évènements thromboemboliques veineux, comme les thromboses veineuses profondes (TVP) ou les embolies pulmonaires (EP), qui peuvent survenir de façon récurrente et/ou chez des sujets jeunes (254). Un déficit modéré s'observe généralement chez des patients avec un déficit héréditaire hétérozygote. Le déficit sévère en PS, par exemple observé chez des patients avec un déficit héréditaire homozygote, est extrêmement rare. Celui-ci s'accompagne de manifestations thrombotiques dramatiques de type purpura fulminans (**Figure 22**), associées à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), qui se développent quelques heures ou jours après la naissance (254–257). La CIVD témoigne d'une hyperactivation de la coagulation, et le purpura fulminans est effectivement initié par la formation de thromboses étendues dans les microvaisseaux du derme de la peau, au niveau des membres inférieurs et supérieurs, entraînant ensuite des hémorragies cutanées (purpura) qui progressent en lésions nécrotiques. Ceci conduit à une nécrose des membres touchés, nécessitant souvent leur amputation. Du fait de sa progression fulgurante, ces manifestations cliniques redoutables sont également associées à une mortalité importante, même si des traitements pour corriger la coagulopathie (plasma frais congelé) sont instaurés.

De façon intéressante, un purpura fulminans s'observe également dans le cas de déficits sévères en PC, mais pas en AT, démontrant que les manifestations cliniques des déficits sévères en PS et PC sont particulièrement semblables (256). Les

taux plasmatiques de PS peuvent être très variables d'un individu à l'autre, mais on estime qu'environ 0.03 à 0.13 % de la population générale présente un déficit héréditaire en PS (258). Si le déficit en PS est par conséquent rare dans la population générale, il touche 1 à 7 % des patients atteints de maladie thromboembolique veineuse (259–263).



Figure 22 : Lésions causées par un purpura fulminans chez nouveau-né âgé de 5 jours atteint d'un déficit en PC à l'état homozygote. Les déficits congénitaux sévères en PS et en PC présentent des symptômes cliniques très similaires avec l'apparition d'un purpura fulminans quelques jours voire heures après la naissance. Figure tirée de PN Knoebl, *Biologics*, 2008 (264), avec la permission de l'éditeur.

Des déficits dans d'autres anticoagulants naturels de la coagulation que la PS, comme la PC et l'AT, constituent d'autres facteurs de risque de la maladie thromboembolique veineuse. Des déficits en PS, PC, et AT sont ainsi classiquement recherchés en clinique, dans le cadre de bilans de thrombophilie, chez des patients présentant ou ayant présenté un événement thromboembolique veineux (265). L'association entre la thrombose veineuse et le déficit en TFPI n'est pas clarifiée à ce jour, et le TFPI ne fait pas partie des anticoagulants naturels dont le déficit quantitatif ou qualitatif est classiquement recherché dans le cadre de bilans de thrombophilie.

La présence de la mutation G20210A sur le gène de la prothrombine (FII-G20210A) est un autre facteur de risque, génétique, de la maladie thromboembolique veineuse. En effet, cette mutation résulte en une augmentation des taux de prothrombine circulant dans le plasma (266).

Plusieurs mutations dans le gène du FV sont associées à un phénomène de résistance au clivage du FV/FVa par la PCa. En particulier, la mutation FV-Leiden (FV-R506Q) a une prévalence particulièrement forte, puisqu'elle affecte près de 5 % de la population européenne (267). Cette mutation altère le clivage du FV/FVa par la PCa en position Arg506, bien que le clivage en Arg306 soit conservé. La mutation FV-Leiden apparaît donc comme un facteur de risque génétique, fréquent, de la maladie thromboembolique veineuse, particulièrement s'il est associé à d'autres facteurs de risque génétiques comme les déficits en PS, PC, ou la mutation G20210A (268). Actuellement la présence de ces deux mutations FII-G20210A et FV-Leiden est classiquement recherchée en clinique dans le cadre de bilan de thrombophilie (265).

4.1.2. Différents types de déficit congénitaux en PS

Plus de 200 mutations dans le gène codant pour la PS ont été identifiées et impliquées dans les déficits héréditaires en PS. Chez l'homme, le gène codant pour la PS (*PROS1*) est localisé sur le bras long du chromosome 3 en position 11.1 à 11.2 (3q11.1). À proximité, est retrouvé un pseudogène (*PROSP*) qui possède plus de 95 % d'homologie avec le gène *PROS1*, suggérant une duplication récente de ces 2 gènes. Le gène *PROS1* s'étend sur plus de 80 kb et est composé de 15 exons et 14 introns. *PROSP*, contrairement à *PROS1*, n'est pas transcrit en raison de l'absence d'un promoteur et de l'exon 1 (269,270). La présence de ce pseudogène *PROSP* complique toutefois les analyses génétiques chez les patients déficitaires en PS.

Les déficits en PS sont séparés en trois types distincts, selon une classification établie en 1991 (271). Les déficits de type I et III sont quantitatifs, alors que le déficit

de type II est qualitatif (257). Le déficit de type I est caractérisé par une réduction du taux de PS totale et libre, alors que dans le déficit de type III, seul le taux de PS libre est abaissé, en raison d'une augmentation de la proportion de PS complexée avec la C4PB. Les deux types de déficit sont par conséquent associés à une réduction de son activité cofacteur de la PCa. Dans le cas du déficit de type II, les taux de PS totale et libre sont normaux, mais son activité cofacteur de la PCa est diminuée.

Le déficit de type I est le plus fréquent et généralement causé par des mutations faux-sens et non-sens, ainsi que des insertions et délétions, sur toute la longueur du gène *PROS1* (272). Les déficits de type II sont majoritairement causés par des mutations non-sens dans les domaines EGF de *PROS1*. Le déficit de type III est quant à lui souvent associé à la substitution du résidu sérine Ser460 par une proline (PS-S460P ou PS-Heerlen) (272).

4.1.3. Diagnostic d'un déficit congénital en PS

Le diagnostic d'un déficit en PS est réalisé grâce à un test fonctionnel mesurant l'activité cofacteur de la PCa de la PS. L'évaluation de l'activité de la PS est combinée à un dosage immunologique, ce qui permet de confirmer le diagnostic et d'identifier le type (I, II ou III) de déficit (254). De façon importante, seule l'activité cofacteur de la PCa est testée actuellement en clinique.

Comme la PS présente également une activité cofacteur du TFPI α *in vitro*, on peut penser que des mutations sur la PS pourraient affecter spécifiquement cette activité de la PS, sans toucher son activité cofacteur de la PCa. En effet, les domaines et résidus impliqués dans chacune de ces activités sont vraisemblablement distincts (**Parties 2.1.2.4 et 2.2.3.4**). Par exemple, dans le cas d'un déficit de type II, les mutations sont très souvent localisées dans les domaines EGF. Or, les EGFs (notamment l'EGF1 et 2) ont plutôt été décrits comme étant impliqués dans l'interaction de la PS avec la PCa, mais pas avec le TFPI α . En particulier, la mutation Lys196Glu dans l'EGF2 de la PS (PS-K196E ou « PS Tokushima ») conduit à un déficit en PS de type II, et ap-

parait comme un bon exemple illustrant cette spécificité des domaines de la PS dans ses différentes activités cofacteurs. En effet, *in vitro*, la PS-K196E exerce sur la PCa une activité cofacteur réduite, alors que son activité cofacteur du TFPI α est normale (273).

Des patients présentant des mutations sur la PS affectant spécifiquement son activité cofacteur du TFPI α , s'ils existent, ne sont actuellement pas diagnostiqués, car cette activité de la PS n'est pas mesurée en clinique à ce jour (**Partie 4.1.1**). Toutefois, un test de génération de thrombine a été récemment mis au point pour quantifier sélectivement l'activité cofacteur de la PCa et l'activité cofacteur du TFPI α de la PS, dans le plasma de patients (274). De façon complémentaire, un test en système purifié a été développé pour mesurer, sur du plasma de patients, l'effet synergique de la PS et du FV-short dans l'inhibition du FXa par le TFPI α (191). Théoriquement, ces tests devraient ainsi permettre de diagnostiquer des patients présentant un déficit dans l'activité cofacteur du TFPI α de la PS, et ainsi d'identifier des déficits qualitatifs qui passent actuellement inaperçus et pourraient rester non diagnostiqués.

L'identification de ces nouveaux déficits qualitatifs pourrait conduire à établir une nouvelle classification des déficits en PS, afin de tenir compte de cette autre activité anticoagulante potentielle de la PS. Il a ainsi été proposé une nouvelle classification (275), prenant en compte de nouveaux types de déficit qualitatif en PS : un type « II-TFPI » dans lequel la seule activité cofacteur du TFPI α de la PS serait réduite, un type « II-APC » dans lequel la seule activité cofacteur de la PCa de la PS serait réduite, et un type « II-pléiotrope » dans lequel les deux activités cofacteur de la PS seraient réduites (**Tableau 1**).

Néanmoins, à ce jour, la Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase (ISTH) ne recommande pas d'introduire en clinique les tests mesurant l'activité cofacteur du TFPI α de la PS, considérant que le rôle de cette nouvelle activité nécessite encore des études supplémentaires pour démontrer son importance, notamment physiologique (275).

Plasma phenotype		Activity		Protein	
Proposed	(Current)	APC- cofactor	TFPI- cofactor	Total	Free
Type I	(I)	↓	↓	↓	↓
Type II-APC	(II)	↓	N	N	N
Type II-TFPI ^a	(n/a)	N	↓	N	N
Type II-pleiotropic ^a	(n/a)	↓	↓	N	N
Type III	(III)	↓	↓	N	↓

Tableau 1 : Classification actuelle et proposée des déficits en PS. Actuellement, les déficits en PS sont classés en trois catégories. Le déficit de type I (I) est associé à une réduction des taux de PS libre et totale, ainsi qu'à une réduction de son activité cofacteur de la PCa. Le déficit de type II (II) est caractérisé par des taux normaux de PS libre et totale, mais une diminution de l'activité cofacteur de la PCa de la PS. Dans le déficit de type III (III), les taux de PS totale sont normaux, mais les taux de PS libre sont diminués en raison d'une plus forte association avec la C4BP. Dans le déficit de type III également, on observe une réduction de l'activité cofacteur de la PCa de la PS. Bien que l'activité cofacteur du TFPI α de la PS ne soit pas encore testée en clinique, les déficits de type I et III sont également associés à une réduction de l'activité cofacteur du TFPI α de la PS (274). Un ajustement de la classification actuelle serait nécessaire pour identifier d'éventuels patients présentant des taux normaux de PS (libre et totale), mais une activité cofacteur du TFPI α altérée (déficit qualitatif de type II-TFPI) ; ou bien encore des patients présentant des taux normaux de PS (libre et totale), mais une réduction de ses deux activités cofacteurs (déficit qualitatif de type II-pléiotrope). Abréviations : ↓, réduction; APC, Protéine C activée; n/a, non admissible; N, normal; TFPI, inhibiteur de la voie du facteur tissulaire α ; a, pas de cas rapporté. Figure tirée de Brinkman *et al.*, *J Thromb Haemost*, 2021 (275), avec la permission de l'éditeur.

4.1.4. Déficits acquis en PS

4.1.4.1. Déficits acquis auto-immuns

Les déficits en PS peuvent également être acquis, et non plus héréditaires. Un exemple bien connu, même s'il est extrêmement rare, est le déficit sévère en PS qui peut s'observer à la suite d'une varicelle chez les enfants ou les adolescents (276,277). Ce déficit est causé par l'apparition transitoire d'auto-anticorps dirigés spécifique-

ment contre la PS. Ces anticorps peuvent entraîner l'élimination de la PS plasmatique et donc conduire à une chute des taux circulants de PS jusqu'à des niveaux qui peuvent même être indétectables. Ces anticorps peuvent en même temps altérer l'activité cofacteur de la PCa de la PS (276). L'état fortement hypercoagulable qui est associé à la circulation de cet auto-anticorps entraîne la survenue d'un purpura fulminans tout à fait comparable aux purpuras fulminans néo-nataux qui s'observent dans le cas d'un déficit sévère héréditaire en PS. Après traitement (administration de plasma frais congelé et/ou échanges plasmatiques, d'héparines, de corticostéroïdes et d'immunoglobulines), la présence de l'auto-anticorps disparaît progressivement en quelques semaines post infection (276).

De façon plus anecdotique, d'autres infections par des herpèsvirus, comme l'herpèsvirus humain de type 6 ou le cytomégalovirus, peuvent également conduire à un déficit acquis auto-immun en PS (278,279)

Dans certaines pathologies auto-immunes, comme le syndrome des antiphospholipides et le lupus systémique érythémateux, des anticorps anti-PS peuvent également être détectés, mais parmi un ensemble d'autres auto-anticorps (280–283). Les déficits en PS observés sont plus modérés que dans le déficit acquis auto-immun post-varicelle, et dans certains cas, les anticorps anti-PS retrouvés peuvent inhiber l'activité de la PS (280,283).

4.1.4.2. Déficit en PS non spécifique : l'exemple de la drépanocytose

La drépanocytose est un autre exemple de pathologie associée à un déficit acquis en PS, même si celui-ci est moins sévère, n'est pas auto-immun, et s'observe souvent en association avec un déficit concomitant en PC (284,285). Le taux d'apparition d'un déficit acquis en PS dans la population générale est de 0.2 % (286) alors que chez les personnes atteintes de drépanocytose, ce déficit survient plus fréquemment (0.95-1.27 %) (284–286). De plus, le risque d'acquérir un déficit en PS est encore plus augmenté chez les personnes présentant des symptômes cliniques de la drépanocytose

(prévalence de 1.27 %) que chez les personnes asymptomatiques avec un trait drépanocytaire (prévalence de 0.95 %). Une autre étude montre que les taux antigéniques de PS totale et libre sont abaissés à 65 % et 25 %, respectivement, chez les drépanocytaires homozygotes HbSS, contre 95 % et 43 %, respectivement, chez des individus sains (HbAA) (285). Dans une autre étude, réalisée cette fois-ci sur un petit échantillon d'enfants drépanocytaires, il a été montré que l'activité de la PS diminuait de façon significative, de 60 % chez des enfants drépanocytaires n'ayant jamais eu d'AVC, à 47 % chez des enfants drépanocytaires ayant eu un AVC (284). L'ensemble de ces données suggèrent donc une association entre la sévérité de la drépanocytose et l'apparition d'un déficit en PS. De façon intéressante, il y a également une augmentation de la prévalence du déficit en PC chez les patients atteints de drépanocytose, mais les taux de PC semblent moins diminués que les taux de PS (287).

Les mécanismes à la base du déficit en PS dans la drépanocytose sont encore peu connus. Une étude suggère que la PS serait « capturée » en interagissant avec la PtdSer anormalement exposée par les globules rouges falciformes (287). Par ailleurs, il est possible que ce déficit en PS participe à la physiopathologie complexe des événements vaso-occlusifs qui sont la marque de la drépanocytose. En effet, la thrombine a été proposée comme un acteur central et précoce dans l'activation endothéliale à l'origine de l'adhérence des globules rouges falciformes, mais également des neutrophiles et des plaquettes, conduisant aux phénomènes d'obstructions microvasculaires (288). Il est donc possible d'envisager que la PS puisse être un régulateur négatif important du développement des crises vaso-occlusives chez les patients drépanocytaires, et que le déficit acquis en PS puisse contribuer à renforcer ces processus fortement délétères.

Une diminution des taux de PS, non spécifique, peut également s'observer dans d'autres conditions. Parmi celles-ci, nous pouvons donner l'exemple du sepsis, qui est classiquement associé à un état d'hyperactivation de la coagulation, mais également à une dérégulation globale des systèmes anticoagulants. Ainsi, une baisse de

la production, mais aussi une consommation, de certains anticoagulants naturels (AT, PC et PS) est observée au cours du sepsis (289–291).

4.2. Modèles murins de déficit en PS

Pendant longtemps, aucun modèle animal de déficit en PS n'était disponible pour confirmer l'importance physiologique de la PS. Ce n'est qu'en 2009 que l'équipe d'Anne Angelillo-Scherrer a pour la première fois rapporté la génération de souris PS knock-out conditionnelles (*Pros1^{Lox/Lox}*) et complètes (*Pros1^{-/-}*) (292). Juste après, l'équipe de Greg Lemke a confirmé le phénotype fortement thrombotique des souris *Pros1^{-/-}*, mais a également caractérisé plus en détail des lignées de souris dont l'expression de PS a été supprimée spécifiquement dans les hépatocytes, les cellules endothéliales, ou encore les cellules musculaires lisses (67). Ces résultats, et d'autres études ultérieures, permettent de démontrer effectivement un rôle physiologique important de la PS.

4.2.1. Souris knock-out *Pros1^{-/-}* et *Pros1^{+/-}*

Les deux équipes qui ont généré les souris knock-out en PS ont utilisé la même approche, qui a consisté à générer dans un premier temps des souris knock-out « conditionnelles » *Pros1^{Lox/Lox}*. Ces souris ont ensuite été utilisées pour générer des souris *Pros1^{+/-}* hétérozygotes, qui sont croisées ensemble pour générer des souris *Pros1^{-/-}* homozygotes (67,292). Le déficit total en PS chez les souris *Pros1^{-/-}* homozygote entraîne le décès des embryons entre les jours embryonnaires (E) 15.5 et 17.5 (67,292). L'analyse des embryons entre les jours E10.5 et E13.5 montre une proportion normale des embryons à ce stade du développement, et suggère que la PS n'est pas requise aux étapes précoces du développement embryonnaire, mais plus tardivement (67).

Les embryons *Pros1*^{-/-} (E13.5-15.5) présentent des saignements intracrâniens massifs (67,292) (**Figure 23**), et des dépôts de fibrine dans les vaisseaux du foie (292) et du cerveau (67).

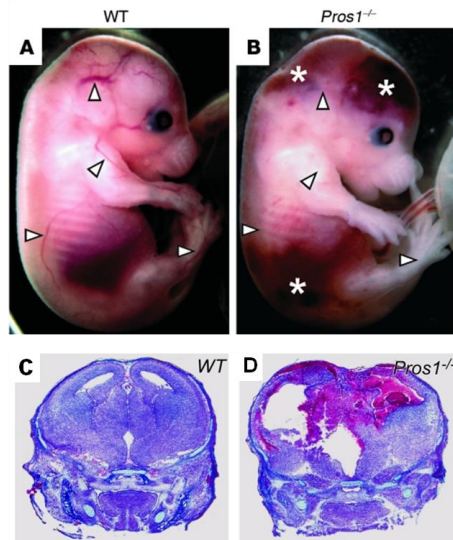


Figure 23 : Embryons et cerveaux des souris *Pros1*^{+/+} (WT) et *Pros1*^{-/-}. Des hémorragies intracrâniennes massives sont visibles chez les embryons (E15.5) *Pros1*^{-/-} (**B**) mais pas chez les embryons *Pros1*^{+/+} (**A**). En particulier, des coupes de cerveau (**E13.5**) montrent la présence de caillots sanguins, ainsi qu'un élargissement des ventricules chez les souris *Pros1*^{-/-} (**D**) mais pas les *Pros1*^{+/+} (WT) (**C**). Figure tirée de Burstyn-Cohen *et al.*, J Clin Invest., 2009 (67). Article en accès libre.

Des défauts dans le développement des vaisseaux sanguins, ainsi que dans la couverture de l' α -actine sur les cellules vasculaire du muscle lisse (SMA) ont été observés chez les souris *Pros1*^{-/-} (67) (**Figure 24**). Par conséquent, le déficit total en PS s'exprime par un phénotype hyperthrombotique, avec des thromboses étendues et une coagulopathie de consommation, associé à une anomalie de formation de certains vaisseaux sanguins (« dysgenèse vasculaire »).

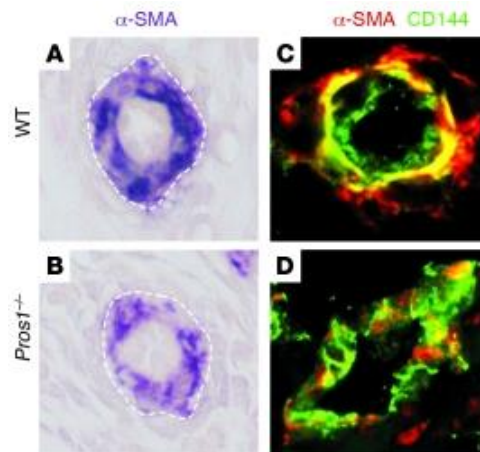


Figure 24 : Dysgenèse vasculaire chez les embryons *Pros1*^{-/-}. L'expression d' α -actine du muscle lisse (α -SMA) a été analysée à l'aide d'un anticorps spécifique sur des vaisseaux d'embryons sauvages (WT, *Pros1*^{+/+}) (A & C) et *Pros1*^{-/-} (B & D). L'expression moins forte et plus dispersée chez les embryons *Pros1*^{-/-} suggère une déstabilisation des vaisseaux chez ces embryons. Figure tirée de Burstyn-Cohen *et al.*, *J Clin Invest.*, 2009 (67). Article en accès libre.

Contrairement aux souris *Pros1*^{-/-} homozygotes, les souris *Pros1*^{+/-} hétérozygotes sont viables et ne présentent aucun signe de thromboses spontanées. Toutefois, ces souris présentent un phénotype thrombotique dans un modèle de thromboembolisme pulmonaire induit par du FT (292). De façon intéressante, un défaut de couverture par des cellules murales α -SMA⁺ sont également observés au niveau de vaisseaux des souris *Pros1*^{+/-}, et ces vaisseaux sont plus perméables (67).

4.2.2. Souris knock-out conditionnelles *Pros1*^{Lox/Lox}

Les souris knockout conditionnelles *Pros1*^{Lox/Lox} ont ensuite été croisées avec des souris Alb-Cre⁺ pour générer des souris dont l'expression de la PS est spécifiquement supprimée dans les hépatocytes (souris *Pros1*^{Lox/Lox} x Alb-Cre⁺). Ces souris sont viables, suggérant que la PS synthétisée par les hépatocytes est dispensable pour le développement embryonnaire. Chez les embryons (E15.5-17.5) *Pros1*^{Lox/Lox} x Alb-Cre⁺, aucune hémorragie intracrânienne n'est détectée et la formation et la structure des

vaisseaux semble normale. Chez 15 % de ces embryons, des dépôts de fibrine ont cependant été observés dans les vaisseaux sanguins du cerveau, mais de façon moins importante que dans les souris *Pros1^{-/-}*, puisque ces dépôts de fibrine ne sont pas occlusifs, comme c'est le cas chez les souris *Pros1^{-/-}* (67). De façon très intéressante, les taux plasmatiques de PS sont réduits de 52 % chez les souris *Pros1^{Lox/Lox} x Alb-Cre+* adultes (67). Ce résultat plutôt inattendu démontre que, chez la souris, seulement la moitié du pool plasmatique de PS provient d'une synthèse par les hépatocytes.

Les souris dont l'expression de la PS est spécifiquement supprimée dans les cellules endothéliales (souris *Pros1^{Lox/Lox} x Tie2-Cre+*) sont également viables (67). Chez les embryons *Pros1^{Lox/Lox} x Tie2-Cre+* (E15.5), une présence de dépôts de fibrine est observée dans les vaisseaux du cerveau, mais de façon moins importante que dans les vaisseaux cérébraux des souris *Pros1^{Lox/Lox} x Alb-Cre+*. De plus, les souris *Pros1^{Lox/Lox} x Tie2-Cre+* présentent une réduction des taux plasmatiques de PS de 42 %, démontrant que l'autre source importante de PS plasmatique (environ 40%) est l'endothélium vasculaire (67).

Comme la PS avait été décrite comme étant synthétisée par les cellules musculaires lisses (243), Burstyn-Cohen et ses collaborateurs ont également généré des souris dont la PS était spécifiquement supprimée dans les cellules musculaires lisses vasculaires (souris *Pros1^{Lox/Lox} x SM22-Cre+*). De façon intéressante, ces souris sont viables, mais un phénotype modéré de dysgénèse vasculaire a également été retrouvé chez ces souris. Cette observation suggère que de la PS provenant des cellules musculaires lisses serait directement impliquée dans la genèse vasculaire ou la stabilisation des vaisseaux, probablement par l'intermédiaire d'un rôle mitogène autocrine sur les cellules musculaires lisses (67). Alternativement, cette PS pourrait jouer un rôle paracrine sur les cellules endothéliales.

4.2.3. Souris *Pros1^{Lox/Lox}* x *PF4-Cre+* déficitaires en PS plaquettaire

Étant donnée la présence de PS dans les plaquettes, l'équipe d'Anne Angelillo-Scherrer a cherché à évaluer l'importance de cette PS plaquettaire dans des modèles d'hémostase et de thrombose. Pour cela, les souris knockout conditionnelles *Pros1^{Lox/Lox}* ont été croisées avec des souris *PF4-Cre+* pour générer des souris dont l'expression de la PS est spécifiquement supprimée des mégacaryocytes (souris *Pros1^{Lox/Lox}* x *PF4-Cre+*) (63). Ces souris effectivement dépourvues de PS plaquettaire sont parfaitement viables et présentent des taux plasmatiques normaux de PS (63).

La caractérisation des plaquettes dépourvues de PS confirme que, chez la souris, la PS plaquettaire n'a aucun effet démontré sur les fonctions plaquettaires évaluées. En effet, l'absence de PS dans les plaquettes n'altère pas leur agrégation *ex vivo*, dans un test d'agrégométrie sur plaquettes lavées (293).

Au cours de cette étude, la caractérisation plus approfondie des souris *Pros1^{Lox/Lox}* x *PF4-Cre+* démontre clairement l'importance particulière de la PS plaquettaire dans la limitation de la formation d'un thrombus, à la suite d'une blessure ou d'une lésion vasculaire. Dans un modèle de thrombose induite au FeCl_3 , les thrombi formés en absence de PS plaquettaire sont plus volumineux et contiennent plus de fibrine, mais seulement au niveau de la veine cave et pas au niveau de l'artère carotidienne (63). Ces résultats suggèrent que la PS libérée par les plaquettes jouerait un rôle important et local pour limiter la génération de thrombine (par ses activités anticoagulantes de cofacteur de la PCa et du TFPI α) au niveau d'un thrombus en croissance, mais seulement dans des conditions de faibles contraintes de cisaillement. L'absence de rôle de la PS plaquettaire à plus fortes contraintes de cisaillement pourrait s'expliquer par le fait que dans ces conditions de flux, les plaquettes s'accumulent beaucoup plus vite au niveau du thrombus en croissance qu'à faibles contraintes de cisaillement, ne sont pas complètement activées, et ne libèrent pas de PS (63).

Même si le plasma contient une forte concentration de PS, cette étude élégante démontre l'importance de la PS libérée localement par les plaquettes. Au sein d'un thrombus en croissance, l'espace entre les plaquettes, appelé « synapse plaquettaire », est très restreint car les plaquettes sont serrées les unes sur les autres. Les médiateurs libérés par les plaquettes au sein de ces synapses, comme la PS mais également le TFPI α et le FV-short, peuvent ainsi s'accumuler et être présents à relativement fortes concentrations. De plus, les synapses plaquettaires sont protégées de la diffusion de protéines à partir du plasma, et la seule source possible de PS au niveau de ces synapses serait très majoritairement les plaquettes activées, et non le plasma.

Les souris dépourvues de PS plaquettaires présentent également un raccourcissement du temps de saignement et une réduction du volume de sang perdu, dans un modèle murin de saignement de type « tail clip » (63). Ceci pourrait avoir des implications thérapeutiques intéressantes dans certaines maladies hémorragiques. Toutefois, le ciblage thérapeutique de la PS plaquettaire est probablement compliqué par le fait que celle-ci est localisée dans des environnements protégés, comme les granules α ou les synapses plaquettaires, et peu accessible à des agents pharmacologiques.

4.2.4. Souris knock-in PS-K196E

Des souris knock-in ont été générées pour exprimer le variant K196E de la PS, qui présente une réduction de son activité cofacteur de la PCa de la PS (294) (**Partie 4.1.3**). Les souris PS-K196E à l'état hétérozygote (*Pros1^{+/E}*) et homozygote (*Pros1^{E/E}*) sont viables, et présentent des taux plasmatiques normaux de PS, comme chez l'homme. Cependant, l'activité cofacteur de la PCa de la PS est réduite de 20 % et 30 % chez les souris *ProS^{+/E}* et *ProS^{E/E}*, respectivement, dans un test de coagulation plasmatique (294).

Les souris *Pros1^{E/E}* sont plus susceptibles que les souris sauvages *Pros1^{+/+}* dans un modèle de thrombose au niveau de la veine cave inférieure (294). Le volume du thrombus est effectivement plus important chez les souris *Pros1^{E/E}*, comparativement aux souris sauvages *Pros1^{+/+}*, et ceci est associé à une plus forte réduction du compte plaquettaire, ainsi qu'à une élévation plus importance des taux de complexes thrombine-antithrombine (TAT) et d'IL-6 (294).

Dans des modèles de thromboembolisme pulmonaire induit par du FT ou des polyphosphates, les poumons des souris *Pros1^{+/E}* et *Pros1^{E/E}* présentent de plus forts défauts de perfusion, comme démontré par une mesure de l'extravasation de Bleu d'Evans, comparativement à des souris sauvages *Pros1^{+/+}* (294). Ces défauts de perfusion sont probablement représentatifs d'une plus forte occlusion des vaisseaux pulmonaires chez les souris *Pros1^{+/E}* et *Pros1^{E/E}*.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que ces souris knock-in constituent un modèle murin de déficit qualitatif en PS, dans lequel l'activité cofacteur de la PCa mais pas du TFPI α est spécifiquement diminuée.

4.2.5. Souris double knock-out *F8^{-/-}Pros1^{-/-}* et *F9^{-/-}Pros1^{-/-}*

Des souris *F8^{-/-}Pros1^{-/-}* et *F9^{-/-}Pros1^{-/-}* ont été générées, à nouveau par l'équipe d'Anne Angelillo-Scherrer, en croisant des souris *Pros1^{+/-}* avec des souris hémophiles A (*F8^{-/-}*) et B (*F9^{-/-}*). De façon très intéressante, ces souris *F8^{-/-}Pros1^{-/-}* et *F9^{-/-}Pros1^{-/-}* sont viables à l'âge adulte, et apparaissent complètement normales (51). Les souris *F8^{-/-}Pros1^{-/-}* et *F9^{-/-}Pros1^{-/-}* ne montrent aucun signe de coagulopathie de consommation, et aucune présence de thrombi ou de fibrine n'a pu être détectée dans les organes de ces souris. Ces observations suggèrent que le phénotype hyperthrombotique associé à l'absence de PS, et conduisant à une létalité embryonnaire chez les souris *Pros1^{-/-}* homozygotes, peut être réversé en limitant l'activité du complexe té-nase intrinsèque. Ceci souligne également qu'une hyperactivation de la coagulation,

plutôt qu'une absence d'activation des récepteurs TAM par la PS, pourrait être à l'origine du phénotype létal des souris *Pros1^{-/-}* (51).

De façon intéressante, l'injection de FVIII chez les souris *F8^{-/-}Pros1^{-/-}* entraîne un état hypercoagulable avec une prolongation du temps de prothrombine, une augmentation des taux de TAT, une réduction des taux de fibrinogène, et la présence de fibrine dans les poumons (51). Cette CIVD et cet état hypercoagulable ne s'accompagnent toutefois pas de manifestations de type purpura fulminans et n'entraînent pas de mortalité.

Une analyse du phénotypique vasculaire chez les souris *F8^{-/-}Pros1^{-/-}* ou *F9^{-/-}Pros1^{-/-}*, comme réalisé chez les souris *Pros1^{-/-}* (67), serait très intéressante pour déterminer si les défauts vasculaires observés chez les souris *Pros1^{-/-}* (couverture des vaisseaux par des cellules murales et perméabilité vasculaire) sont également réversés en restaurant l'hémostase. Ceci permettrait d'évaluer l'impact spécifique de l'absence d'activation des récepteurs TAM par la PS, au niveau de la couverture des vaisseaux par des cellules murales ou au niveau de leur perméabilité.

Bien qu'ils puissent être utilisés pour comprendre l'importance relative des activités anticoagulantes et cellulaires de la PS, les souris double knock-out *F8^{-/-}Pros1^{-/-}* et *F9^{-/-}Pros1^{-/-}* ont aussi été utilisées par Calzavarini et ses collaborateurs pour évaluer l'impact de l'absence de PS sur la restauration de l'hémostase dans l'hémophilie. Pour cela, un premier modèle de thrombose induite par du FeCl₃ sur des artérioles mésentériques, dans lequel la formation du thrombus est mesurée par microscopie intravital, a été utilisé. Dans ce modèle, aucun thrombus ne se forme chez les souris hémophiles *F8^{-/-}Pros1^{+/+}*, mais des thrombi se forment chez les souris *F8^{-/-}Pros1^{-/-}*, même s'ils apparaissent instables et génèrent de nombreux micro-embolies (51). De plus, aucune occlusion des artérioles mésentériques n'est observée sur les souris *F8^{-/-}Pros1^{-/-}*, contrairement à des souris de type sauvage *F8^{+/+}Pros1^{+/+}*, pour lesquelles une occlusion des artérioles est apparente au bout de 20 minutes. Ces observations suggèrent une restauration partielle des processus hémostatiques chez les souris hémophiles, lorsque la PS est absente.

Dans un modèle de saignement à la queue de type « tail-clip », les souris double knock-out $F8^{-/-}Pros1^{-/-}$ présentent une réduction des volumes de sang perdu, comparativement aux souris hémophiles $F8^{-/-}Pros1^{+/+}$, mais là encore, de façon relativement modeste (51). Ainsi, l'absence de PS chez les souris hémophiles ne semble corriger que partiellement les saignements. Une correction partielle similaire est également observée lorsqu'un anticorps bloquant anti-PS est administré à des souris hémophiles $F8^{-/-}Pros1^{+/+}$ (51), suggérant que l'inhibition pharmacologique de la PS permettrait de restaurer, même si partiellement, l'hémostase chez des souris hémophiles.

4.2.6. Importance de la PS dans le développement des hémarthroses hémophiliques

L'hémophilie est associée à des manifestations hémorragiques profondes touchant les muscles et les articulations, et les saignements intra-articulaires (hémarthroses) répétés chez les patients hémophiles sévères entraînent une destruction progressive de l'articulation. Cette « arthropathie hémophilique » est une complication majeure et difficile à traiter de l'hémophilie sévère.

De façon assez spectaculaire, l'absence génétique de PS protège complètement les souris hémophiles vis-à-vis de saignements intra-articulaires, dans un modèle d'hémarthroses aiguës induites par une ponction dans le genou, et dans lequel le gonflement du genou est mesuré (51). Également, l'injection d'un ARN interférant ciblant la PS limite les saignements intra-articulaires dans ce modèle d'hémarthroses aiguës, même si de façon non complète (51). Ces résultats permettent de penser que le blocage de la PS pourrait représenter une stratégie thérapeutique prometteuse pour limiter les saignements intra-articulaires dans l'hémophilie sévère.

Les hémarthroses ont lieu au niveau de la membrane synoviale des articulations, richement vascularisée. Les articulations sont un site privilégié d'hémorragies chez les patients hémophiliques, en partie parce que le FT est très faiblement exprimé

dans la membrane synoviale. De plus, Calzarini *et al.* ont montré que de la PS et du TFPI α peuvent être détectés dans le tissu synovial de souris hémophiles (51). Par ailleurs, la PS et le TFPI α sont présents en plus forte quantité au niveau de la membrane synoviale de patients hémophiles A et B sous traitement substitutif à la demande, comparativement à des patients contrôles atteints d'arthrose (51). De façon intéressante, les patients hémophiles A sous traitement substitutif prophylactique semblent exprimer moins de PS dans la membrane synoviale que les patients sous traitement à la demande (51).

L'ensemble de ces données suggèrent donc une surexpression de PS et de TFPI α dans la membrane synoviale, qui pourrait, en conjonction avec la faible expression de FT, contribuer à créer un environnement très anticoagulant favorisant fortement le développement des hémarthroses. Les auteurs de l'étude ont proposé que les synoviocytes pourraient être à l'origine de cette expression de PS et de TFPI α au niveau de la membrane synoviale, et des synoviocytes murins en culture expriment effectivement de la PS et du TFPI α (51).

Ces résultats soulignent l'intérêt thérapeutique du ciblage pharmacologique de la PS dans le traitement de l'hémophilie sévère. Sur la base des résultats obtenus dans cette étude avec le modèle de saignement de type « tail-clip » (51), il apparaît que ce ciblage de la PS pourrait s'avérer insuffisant pour corriger le phénotype hémorragique chez les patients hémophiles sévères. Toutefois, ce ciblage semble plus prometteur pour limiter très efficacement et spécifiquement le développement des hémarthroses chez les hémophiles sévères.

Modèles murins « knock-out »	Lignée ciblée	Phénotype	Conclusions
<i>Pros1</i> ^{-/-} (67, 292)	Général	- Mort embryonnaire E15.5-17.5 - Saignements intracrâniens - Dépôts de fibrine dans les vaisseaux du foie et du cerveau - Dysgénèse vasculaire	Importance de la PS > Dans les étapes tardives du développement embryonnaire > Dans la limitation de la génération de thrombine > Dans la genèse vasculaire
<i>Pros1</i> ^{+/-} (67, 292)	Général	- Souris viables - Phénotype thrombotique (modèle de thromboembolie pulmonaire) - Dysgénèse vasculaire	
<i>Pros1</i> ^{Lox/Lox} x Alb-Cre+ (292)	Hépatocytes	- Souris viables - Dépôts de fibrine (vaisseaux sanguins/cerveau) - 15% embryons - Moins 52% de PS plasmatique	~50% du pool plasmatique de PS provient d'une synthèse hépatique
<i>Pros1</i> ^{Lox/Lox} x Tie-Cre+ (292)	Cellules endothéliales	- Souris viables - Dépôts de fibrine (vaisseaux du cerveau) - Moins 42% de PS plasmatique	~40% du pool plasmatique de PS provient d'une synthèse hépatique
<i>Pros1</i> ^{Lox/Lox} x SM22-Cre+ (292)	Cellules du muscle lisse	- Souris viables - Dysgénèse vasculaire modérée	Rôle de la PS provenant des cellules musculaires lisses dans la genèse vasculaire
<i>Pros1</i> ^{Lox/Lox} x PF4-Cre+ (63)	Mégacaryocytes Plaquettes	- Souris viables - Formation de thrombi plus volumineux et riche en fibrine (modèle de thrombose au FeCl ₃) seulement à faible contraintes de cisaillements - 5 à 7.5 µg/ml de PS plasmatique	Rôle de la PS libérée des plaquettes dans la limitation du thrombus en formation
<i>Pros1</i> ^{-/-} F8 ^{-/-} & <i>Pros1</i> ^{-/-} F9 ^{-/-} (51)	Général	- Souris viables - Pas de dépôts de fibrine ni de formation spontanée de thrombi	Phénotype hyper thrombotique et léthal lié au déficit total en PS est réversé par l'absence de FVIII ou FIX
		- Formation de thrombi instables (modèle de thrombose au FeCl ₃) - Baisse modérée du volume de sang perdu (modèle de temps de saignement)	Absence de PS restaure partiellement les processus hémostatiques chez les souris hémophiles
Modèle murin « knock-in »	Lignée ciblée	Phénotype	Conclusions
PS-K196E (<i>Pros1</i> ^{+E} & <i>Pros1</i> ^{E/E}) (294)	Général	- Souris viables - Taux plasmatiques de PS normaux - Baisse de 20-30% de l'activité cofacteur de la PCa de la PS	Modèle permettant d'évaluer l'importance relative de l'activité cofacteur de la PCa de la PS
		- Formation de thrombi plus volumineux au niveau de la veine cave inférieure (modèle de thrombose au FeCl ₃) - Baisse du compte plaquettaire - Augmentation des TAT et de l'IL-6 - Occlusion des vaisseaux pulmonaire (modèles de thromboses pulmonaires)	Implication de l'activité cofacteur de la PCa de la PS dans les effets anti thrombotique de la PS

Tableau 2 : Tableau résumant les différents modèles murins de PS ainsi que les principaux phénotypes associés et les conclusions qui en découlent.

Chapitre 5 – Les anticorps à domaine unique (VHHs)

5.1. Immunoglobulines G conventionnelles et les anticorps à chaîne lourde

5.1.1. Les immunoglobulines G conventionnelles

Les immunoglobulines G (IgG) sont des anticorps d'environ 150 kDa, constitués de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères identiques entre elles (**Figure 25**). Des associations par l'intermédiaire de ponts disulfures permettent l'association de ces chaînes entre elles. Les chaînes légères sont composées de deux domaines, le domaine variable de la chaîne légère (VL) et le domaine constant de la chaîne légère (CL). Les chaînes lourdes sont composées de quatre domaines, le domaine variable de la chaîne lourde (VH) et trois domaines constants CH1, CH2 et CH3 (**Figure 25**). Comme leur nom l'indique, les domaines constants sont plutôt conservés. Le fragment composé des domaines CH2 et CH3 présent à l'extrémité C-terminale de chacune des chaînes lourde constitue le « fragment cristallisable » (Fc) de l'immunoglobuline. Ce fragment est plutôt impliqué dans les fonctions effectrices comme la reconnaissance des cellules immunitaires ou la fixation du complément. A l'inverse, les domaines VH et VL sont très variables puisqu'ils sont impliqués dans la reconnaissance de l'antigène. Le fragment composé de la chaîne légère (VL + CL), du domaine VH, ainsi que du domaine CH1, est appelé « fragment de liaison à l'antigène », (Fab) (295).

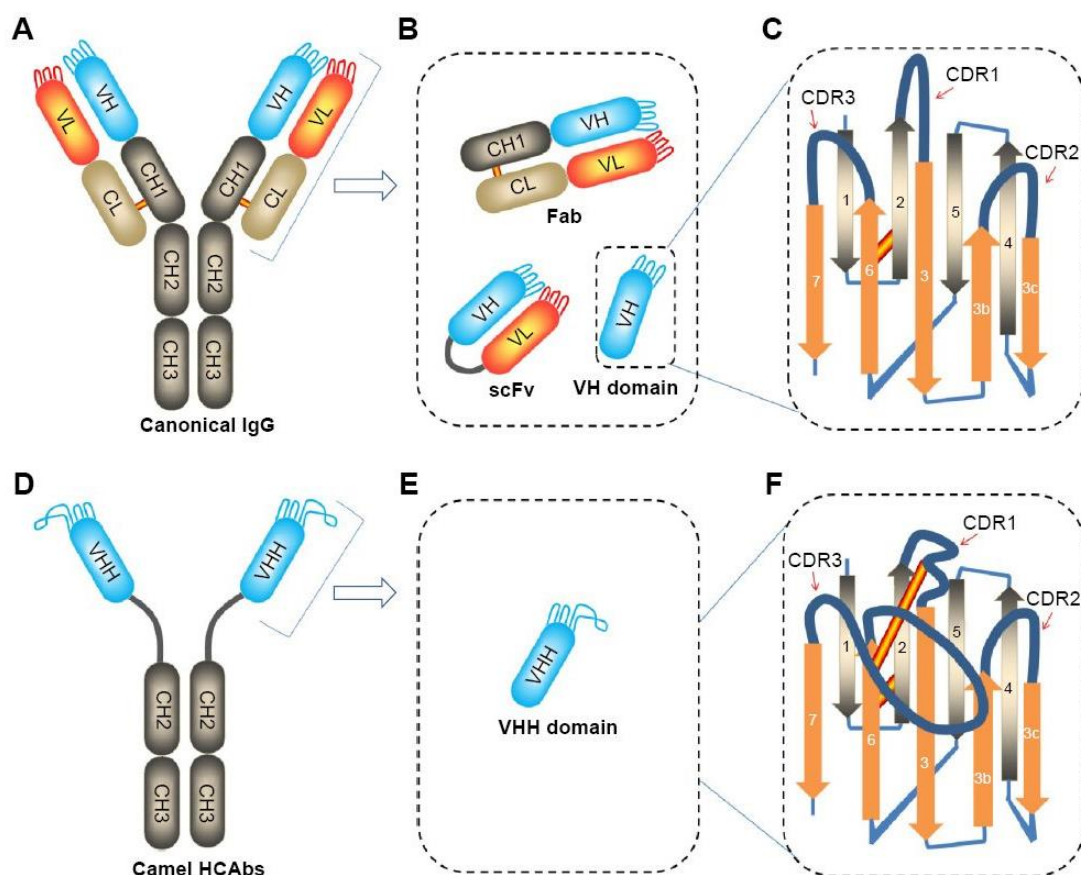


Figure 25 : Immunoglobuline conventionnelle et anticorps à chaîne lourde (HCAb) chez les camélidés. (A) Les IgG1 (« canonical IgG » en anglais) sont composés d'une chaîne lourde comportant les domaines VH, CH1, CH2 et CH3 et d'une chaîne légère avec les domaines VL et CL. En biologie, ils peuvent être utilisés sous leur forme entière **(B)** ou bien sous forme de fragments tels que le fragment variable à chaîne unique (scFv), le fragment de liaison à l'antigène (Fab), ou bien la région variable de la chaîne lourde (VH). **(D)** Chez les camélidés, il existe en plus des anticorps conventionnels, des anticorps à chaîne lourde unique (HCAbs), les IgG2 et IgG3. La région charnière est plus longue dans les IgG2 que dans les IgG3. **(C)** Les VHs **(F)** et VHHs sont composés de façon similaire avec la présence de feuillets β et de boucles. Les feuillets β sont indiqués en 1, 2, 5 et 4 et sont localisés sur une face, et en 7, 6, 3, 3b et 3c sur une autre face. Les régions CDR1, 2 et 3 sont représentées par les boucles reliant les deux feuillets 2 et 3, 3c et 3c ainsi que 6 et 7 entre eux, respectivement. Dans les VHs **(C)** et les VHHs **(F)**, un pont disulfure relie les feuillets 2 et 6. Cependant, dans les VHHs, un pont disulfure supplémentaire peut-être retrouvé entre le CDR1 et CDR3, permettant de stabiliser la longue boucle CDR3 **(F)**. Image tirée de *Wang et al., Int J Nanomedicine, 2016* (296), avec la permission de l'éditeur.

5.1.2. Les anticorps à chaîne lourde unique

Chez certaines espèces comme les camélidés (chameau, lama, dromadaire, alpaga, guanaco, vigogne), ou encore certains poissons cartilagineux (comme le requin), on trouve des immunoglobulines conventionnelles (IgG1), comme chez l'homme ou la souris, mais également des IgG dépourvues de chaînes légères (IgG2 et IgG3) (**Figure 25**) (295). Suite à leur découverte, ces anticorps d'environ 90 kDa ont pour cette raison été appelés « anticorps à chaîne lourde » (HCAbs). Les HCAbs n'expriment pas le domaine CH1 retrouvé sur la chaîne lourde des IgG conventionnelles, et ces anticorps ne sont donc composés que d'un seul domaine variable nommé « domaine variable des anticorps à chaîne lourde » (VHH), et non pas des deux domaines VH et VL (**Figure 25**). Pourtant, la diversité des VHHs est similaire à la diversité obtenue avec la combinaison VH-VL.

En effet, de façon similaire aux anticorps conventionnels, la diversification du répertoire des VHHs est assurée par le réarrangement des gènes de variabilité, de diversité et de jonction. Toutefois, pour augmenter le répertoire des VHHs, des mécanismes d'hypermutation somatique prennent place au cours de la réponse immunitaire et, en particulier, des sites de mutations uniques ont été retrouvés dans la région déterminant la complémentarité 1 (CDR1) des VHHs, mais pas dans le CDR1 des VHs (295). En raison de leur petite taille (environ 15 kDa), les VHHs sont aussi appelés « nanobodies ». De plus, comme il n'y a pas de domaine variable apporté par la chaîne légère, le fragment VHH représente à lui seul l'équivalent du fragment Fab des anticorps conventionnels, et les VHHs sont aussi appelés « anticorps à domaine unique » (sdAbs).

5.2. Propriétés des VHHs

5.2.1. Structure des VHHs

La structure des VHHs est très proche de celle des VHs. Tout comme les VHs, la séquence des VHHs est composée de trois régions hypervariables CDR 1 à 3, et de quatre régions constantes plus conservées FR (région charpente) 1 à 4 (**Figure 25**). Dans les VHHs, comme dans les IgG conventionnelles, les régions CDR constituent la zone de reconnaissance de l'antigène ciblé par le VHH (295). Cependant, dans le cas des VHHs, le CDR3 est majoritairement (jusqu'à 80 %) impliqué dans la reconnaissance de l'épitope, alors que l'implication de chaque CDR est plus homogène dans le cas du couple de fragments VH-VL (297).

Les VHHs sont composés de feuillets β formant 2 faces antiparallèles, l'une composée de 4 feuillets β et l'autre de 5 feuillets β (**Figures 25 et 26**). Les brins sont reliés par des boucles et par un pont disulfure très conservé, entre les Cys23 et Cys94 au sein des régions FR1 et FR3, respectivement (**Figure 25**) (296).

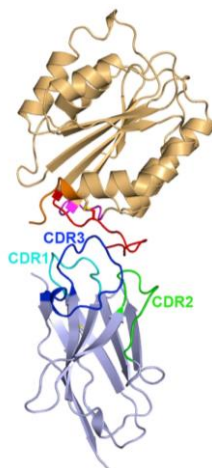


Figure 26 : Structure cristallographique du complexe formé entre le caplacizumab sous forme monovalente et le domaine A1 du VWF. Le caplacizumab est un VHH utilisé en thérapie pour le traitement du purpura thrombotique thrombocytopénique. Ce VHH (bleu clair) est dirigé contre le domaine A1 du VWF (marron). Les boucles CDR1, CDR2 et la longue boucle CDR3 du caplacizumab sont visibles en bleu clair, bleu foncé et vert, respectivement. Figure tirée de Hyun TaeLee *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2021 (298), avec la permission de l'éditeur.

5.2.2. Différences entre les VHs et les VHHs

Dans le domaine variable (VH ou VL) des anticorps conventionnels, les trois régions CDR forment chacune une boucle (**Figures 25 et 26**). La longueur des boucles CDR1 et CDR2 est assez conservée, mais la boucle CDR3 peut avoir une longueur plus variable. Au total, six boucles CDR sont formées par le fragment VH-VL, trois par le domaine VH et trois autres par le domaine VL. Ces boucles sont juxtaposées et peuvent former une cavité, une rainure, ou bien une surface plane de 6000-9000 Ångström², permettant l'insertion d'un antigène (299).

Concernant le domaine VHH des HCAs, l'organisation structurale des régions FR et CDR est globalement similaire à celle des VHs. Néanmoins, il existe quelques différences, notamment dans le FR2 et les CDRs. Dans le domaine FR2 des VHs, des résidus hautement conservés forment une région hydrophobe interagissant avec le domaine VL, mais ces résidus sont remplacés par des résidus hydrophiles dans les VHHs. La présence de ces résidus au sein des VHHs leur confère une meilleure solubilité (300,301).

De plus, contrairement aux six boucles CDR formées par le fragment VH-VL, les VHHs ne forment que trois boucles, en raison de l'absence de la chaîne légère (**Figure 25**). Néanmoins, l'association de ces trois boucles doit permettre la reconnaissance de l'antigène. Pour compenser, les VHHs contiennent ainsi des boucles CDR plus longues afin de pouvoir former une surface de reconnaissance de l'antigène comparable à celle du fragment VH-VL (302). De plus, la boucle CDR3 des VHHs est plus longue et plus flexible que les autres boucles (**Figure 25**). Ces boucles plus longues et très flexibles peuvent néanmoins altérer la reconnaissance des antigènes. Ainsi, certains VHHs comportent un pont disulfure supplémentaire reliant les boucles CDR1 et CDR3, afin de restreindre cette flexibilité (**Figure 25**) (303). Également, un cœur aromatique a été décrit dans le CDR3 et permettrait de stabiliser la conformation de la boucle CDR3 (297,304,305).

5.2.3. Identification et expression de VHHs recombinants

Dans le cas des HCABs, la présence d'un unique fragment variable (le VHH) requis pour la reconnaissance de l'antigène est un atout pour leur identification, ce qui a contribué à la popularité grandissante des VHHs en tant qu'outils utilisés en recherche. Après immunisation d'un lama avec un antigène ou un cocktail d'antigènes, il est possible de récupérer les lymphocytes B contenant le répertoire d'anticorps produits (**Figure 27**). Le répertoire de gènes correspondant aux séquences spécifiques des VHHs peut ensuite être facilement cloné dans une banque, sous format bactérien (**Figure 27**). Pour les banques obtenues de cette façon, et dites « immunes », il est possible d'obtenir une diversité d'environ allant jusqu'à 10^8 transformants. Une alternative consiste à utiliser des banques naïves ne nécessitant pas d'immunisation avec un antigène donnée, ou même des banques synthétiques, ce qui permet d'atteindre des diversités plus importantes au niveau de ces dernières.

Il est ensuite possible de sélectionner des VHHs d'intérêt, notamment par la technique très classique du phage display ou par des techniques plus spécifiques et moins accessibles, comme le yeast display, le bacterial display, ou le ribosome display (**Figure 27**). Brièvement, la technique du phage display consiste à immobiliser un antigène donné, puis à sélectionner une banque de VHHs sur cet antigène immobilisé, par l'intermédiaire de plusieurs tours de sélections (appelés « panning ») qui permettent d'enrichir au fur et à mesure les banques en VHHs d'intérêt (**Figure 27**) (306).

En plus d'être relativement faciles à identifier par des techniques accessibles pour des laboratoires classiques, les VHHs présentent l'avantage de pouvoir s'exprimer dans des micro-organismes comme des bactéries (*Escherichia coli*), des lignées cellulaires de mammifères, des levures, et même des plantes. Dans les bactéries, les VHHs sont généralement produits dans le périplasme car cet environnement oxydatif permet la formation des ponts disulfures, et des rendements élevés peuvent être obtenus suite à la purification de certains VHHs (307–310).

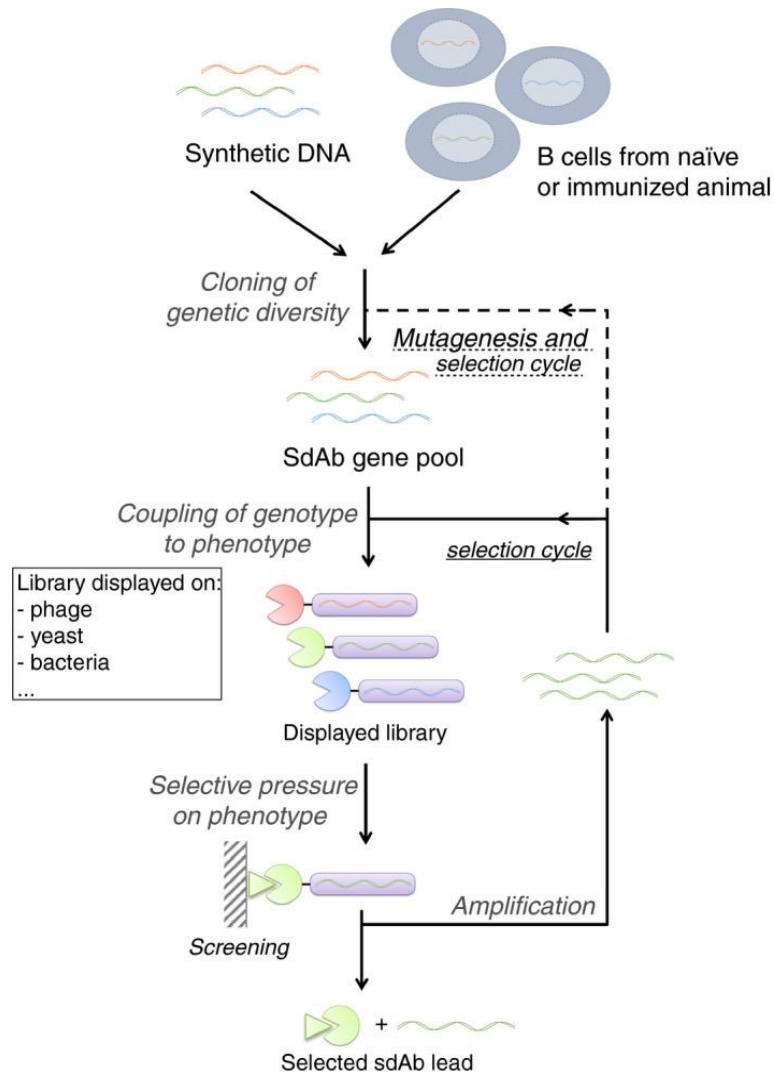


Figure 27 : Résumé des étapes menant à la sélection de VHHs d'intérêts. L'ADN provenant des lymphocytes d'un animal immunisé ou non, ou de l'ADN provenant d'une banque synthétique est utilisé pour obtenir les séquences spécifiques des VHHs, par différentes techniques de biologie moléculaire. Ces séquences sont ensuite clonées et utilisés pour obtenir une banque de VHHs en format bactérien. Cette banque est alors utilisée pour exprimer les VHHs sous différents formats possibles (phages, levures ou bactéries) et les sélectionner sur un antigène donné. Il est possible de réaliser plusieurs cycles de sélection sur un antigène donné, afin d'augmenter la proportion de VHHs d'intérêt sélectionnés. Figure tirée de Peyron *et al.*, Res Pract Thromb Haemost, 2020 (311), avec la permission de l'éditeur.

5.3. Propriétés des VHHs

5.3.1. Stabilité

Les VHHs sont généralement très stables et sont même décrits pour résister à des conditions de pH et de températures extrêmes. A titre d'exemple, la dénaturation des VHHs peut se produire à ~ 2-3 M de chlorure de guanidinium, entre 60-80°C, et jusqu'à 90°C pour certains VHHs (312,313). La stabilité des VHHs peut être augmentée en ajoutant un pont disulfure supplémentaire pour relier deux feuillets β (feuillets 3c et 5 sur la **(Figure 25)** dans la région FR3 (314,315). Cette modification rend les VHHs résistants à une dégradation protéolytique par la pepsine ou à la chymotrypsine, et pourrait même permettre leur administration par voie orale (316). L'utilisation de conditions extrêmes de « panning », en jouant par exemple sur la température, le pH, ou la composition des tampons, peut aussi être un moyen de sélectionner des VHHs avec des propriétés spécifiques comme la résistance à des conditions de pH ou de température extrêmes (317–320).

5.3.2. Immunogénicité

Les VHHs sont décrits pour être très peu immunogènes, en raison de leur faible masse moléculaire (~ 15 kDa) (296), de leur stabilité, de leur clairance rapide, mais surtout en raison de leur homologie avec les VHs humains (302). En effet, les VHHs diffèrent des VHs de seulement quelques aa qui sont répartis sur toute la séquence, et particulièrement au niveau de quatre aa très conservés dans le FR2 (en positions 42, 49, 50 et 52), ainsi que dans le CDR3, qui contient la spécificité pour l'antigène cible. Par ailleurs, l'humanisation des VHHs est un processus facilement réalisable, notamment en substituant les aa conservés dans le FR2 des VHHs par les aa correspondants présents sur les VHs (321).

5.3.3. Reconnaissance de l'antigène

Les VHHs possèdent une forme convexe très favorable pour la reconnaissance d'épitopes cryptiques et/ou non accessibles aux VHs des anticorps conventionnels (299). Cette forme convexe est idéale pour l'insertion au niveau de zones concaves de l'antigène, comme par exemple celles formées par le site catalytique de certaines enzymes (322–326). Ainsi, certains VHHs identifiés à l'heure actuelle inhibent l'activité de l'enzyme qu'ils reconnaissent (327–330), mais certains peuvent au contraire stabiliser la conformation de l'enzyme cible et augmenter son activité (331).

On estime que l'affinité des VHHs pour leur cible est généralement de l'ordre du nanomolaire ou même du picomolaire. La génération de formes bivalentes d'un VHH peut augmenter l'affinité, principalement par l'intermédiaire d'une augmentation de l'avidité des VHHs pour leurs cibles (329,330). Des constructions multivalentes peuvent également être composées de VHHs différents, pour générer des formes dites « multispécifiques ».

5.3.4. Demie-vie

On considère qu'*in vivo*, les VHHs adoptent la demi-vie de leur cible (332–334). Néanmoins, certains VHHs peuvent avoir une demi-vie très faible, de seulement quelques heures ou même quelques minutes (335,336). En effet, l'absence de partie la cristallisable des immunoglobulines Fc empêche leur recyclage et leur petite taille (~ 15 kDa) et entraîne une clairance rénale rapide. Des stratégies ont donc été mise en place pour allonger la demi-vie des VHHs *in vivo*. En particulier, la partie Fc (337–339), un VHH reconnaissant l'albumine (338,340), ou bien l'albumine elle-même (341), peuvent être couplés aux VHHs pour allonger leur demi-vie *in vivo*. Ainsi, bien qu'ils allongent leur demi-vie, l'ajout de ces éléments sur les VHHs entraîne également une augmentation de la taille des VHHs, qui peut potentiellement altérer la structure et l'affinité des VHHs pour leur cible.

5.4. Applications des VHHs

Toutes ces propriétés des VHHs font d'eux d'excellents outils pour la recherche en laboratoire, mais aussi des outils thérapeutiques potentiellement intéressants. Par exemple, les VHHs peuvent être couplés à des molécules fluorescentes, des fluorochromes ou à d'autres molécules de détection et servir d'outils d'imagerie cellulaire ou médicale. Ils peuvent également être employés pour des études structurales. En effet, ils sont décrits pour favoriser la cristallisation de molécules récalcitrantes. De plus, en raison de leur forte affinité pour leur cible, les VHHs sont des outils pertinents pour la purification de protéines par immuno-affinité.

Les VHHs apparaissent également comme de très bons outils de recherche, et certains ont même été utilisés pour décrypter les mécanismes complexes de l'hémostase et de la coagulation. Un VHH dirigé contre le FVIIa a par exemple été développé dans notre unité de recherche, et ce VHH a démontré une inhibition spécifique de l'activité du FVIIa, mais pas du FVIIa lorsqu'il est complexé avec le FT (342). Ce VHH révèle une activité du FVIIa, indépendante de son activité dans le complexe FT/FVIIa, permettant ainsi de mieux comprendre le mécanisme d'action du FVIIa. Des VHHs dirigés contre différentes formes activées du FXIIa existent également et peuvent servir d'outils pour comprendre plus en détail les mécanismes d'activation de la voie intrinsèque (343). Un VHH dirigé contre le domaine A1 du VWF, également généré dans notre unité, a été utilisé dans des modèles d'inflammation *in vivo*, chez la souris, pour confirmer le rôle du VWF dans un contexte inflammatoire (344,345).

Les VHHs peuvent également être utilisés comme des outils diagnostiques. En effet, un VHH permettant de quantifier spécifiquement le taux de FVIIa par rapport au taux de FVII a permis de mettre en évidence une élévation des taux de FVIIa dans un contexte inflammatoire (346). Un VHH anti-fibrinogène a également été développé, et celui-ci permet de doser le fibrinogène dans le plasma à des quantités aussi faibles que 44 µg/L, et pourrait également servir d'outil diagnostique (347).

Au niveau thérapeutique, leur administration est généralement plus facile que pour les anticorps conventionnels. En effet, grâce à leur petite taille, ils présentent une forte pénétration tissulaire et, en plus de pouvoir être administrables par voie intraveineuse ou sous-cutanée, ils pourraient être possiblement administrés par voie topique, orale ou inhalée. De plus, certains VHHs peuvent traverser la BHE, démontrant leur intérêt pour cibler le système nerveux.

À l'heure actuelle, un seul VHH a été approuvé en clinique. Le caplacizumab, un VHH bivalent anti-vWF, (**Figure 26**) est actuellement utilisé dans le traitement du purpura thrombotique thrombocytopénique. Ce VHH cible la région A1 du VWF et altère son interaction avec le récepteur plaquettaire GPIIb/IIIa (332). Des VHHs sont également en cours d'étude pour le traitement de maladies hémorragiques. En particulier, un VHH inhibant l'antithrombine a permis de restaurer la génération de thrombine dans un plasma hémophile A ou B, mais aussi d'abaisser le volume de sang perdu de souris hémophiles A dans un modèle de temps de saignement (333).

Problématique de la thèse

La PS est une protéine anticoagulante naturelle agissant principalement comme cofacteur de la PCa dans l'inactivation du FVa et du FVIIIa, mais également du TFPI α dans l'inhibition du FXa. De façon intéressante, les domaines fonctionnels impliqués dans ces différentes activités anticoagulantes de la PS semblent distincts, même s'ils ne sont pas complètement caractérisés. En revanche, l'importance relative de ces différentes activités n'est pas connue *in vivo*. En effet, chez l'homme, seuls les patients atteints d'un déficit dans l'activité cofacteur de la PCa de la PS sont actuellement identifiés car c'est la seule activité testée en clinique. Concernant l'activité cofacteur du TFPI α , aucun patient ayant un déficit dans cette activité n'a encore été identifié, en raison de l'absence de test diagnostique ciblant spécifiquement cette activité. De la même façon, chez la souris, aucun modèle actuel ne permet à l'heure actuelle d'évaluer les importances relatives des deux activités cofacteur de la PS.

Le but initial de mon projet de thèse était de tenter de générer pour la première fois des VHHs dirigés contre la PS, et qui pourraient cibler et moduler les différentes activités anticoagulantes de la PS. En effet, sachant que les domaines de la PS impliqués dans chacune de ses activités sont distincts, ces activités devraient pouvoir être ciblées de façon sélective par des VHHs reconnaissant des domaines différents de la PS.

Pour identifier ces VHHs, j'ai bénéficié de l'immunisation d'un lama avec de la PS recombinante humaine et de la création d'une banque de VHHs issue de ce lama, quelques années avant mon arrivée au laboratoire. Pour identifier les VHHs, nous avons utilisé une approche « globale », en sélectionnant les VHHs par phage-display, sur de la PS humaine recombinante (rhPS), puis en décrochant de façon non spécifique l'ensemble des VHHs fixés à la rhPS, par une élution à la trypsine. Nous avons choisi cette approche globale pour tenter d'obtenir un maximum de VHHs divers et variés, ciblant des domaines différents de la PS et, potentiellement, des

régions inattendues de la PS. Cette approche nous a effectivement permis d'obtenir un VHH particulièrement intéressant, appelé « PS003 ». Ce VHH semble en effet se lier à la PS avec une forte affinité, et apparait spécifique de la PS. Surtout, ce VHH a démontré un effet potentialisateur inattendu de l'activité cofacteur de la PCa de la PS. Ceci nous a encouragés à caractériser plus en détails le VHH PS003, en générant notamment une forme bivalente appelée « PS003biv ». Les VHHs PS003 et PS003biv nous apparaissaient comme des outils particulièrement intéressants pour tester si la potentialisation de l'activité cofacteur de la PCa de la PS pouvait résulter en un effet antithrombotique *in vivo*, ce qui n'avait jamais été montré auparavant.

Lors de ma thèse, j'ai ainsi pu apporter la preuve de concept que des VHHs anti-PS pouvaient effectivement être identifiés à partir de notre banque immune de VHHs, et que certains VHHs pouvaient même moduler son activité anticoagulante. Ceci nous a encouragés à commencer à tester en parallèle une approche moins globale mais plus « ciblée » pour tenter d'identifier des VHHs avec des propriétés fonctionnelles bien définies. Ainsi, j'ai développé des approches de sélection pour identifier des VHHs qui inhiberaient spécifiquement l'activité cofacteur du TFPI α de la PS. Dans le futur, de tels VHHs nous permettraient de mieux comprendre cette activité et de mieux appréhender l'importance de cette activité anticoagulante de la PS *in vivo*.

Caractérisation fonctionnelle et potentiel antithrombotique d'un VHH potentialisant l'activité cofacteur de la PCa de la PS

Le but initial de ma thèse était d'identifier des VHHs dirigés contre la PS et capables de moduler des activités anticoagulantes de la PS. Les VHHs sont en effet des outils très intéressants pour répondre à cette problématique, notamment parce qu'ils peuvent s'insérer dans des régions cryptiques et non accessibles aux anticorps conventionnels. Ils peuvent ainsi cibler des zones cachées ou non exposées au solvant, et moduler de façon très inattendue les activités de la PS. Les VHHs peuvent aussi être générés par des approches de criblage à haut débit (phage display) et différentes stratégies de sélection peuvent être mise en place. Ceci permettait ainsi d'envisager l'obtention d'un nombre important de VHHs variés au niveau de leur réactivité envers la PS. Également, en raison de leur petite taille (15 kDa sous forme monovalente), les VHHs sont particulièrement adaptés pour des applications thérapeutiques. Finalement, nous avons aussi pu profiter de l'expertise de notre unité de recherche dans l'identification de VHHs dirigés contre des protéines de l'hémostase, pour identifier des VHHs ciblant la PS.

Mon projet de thèse nous a permis d'apporter une preuve de faisabilité en identifiant plusieurs VHHs reconnaissant la PS humaine, à partir d'une banque immune. Dans un premier temps, nous avons fait le choix d'utiliser une approche globale, afin de tester la « qualité » de notre banque immune et d'évaluer notre capacité à identifier des VHHs reconnaissant effectivement la PS. En effet, dans notre unité de recherche, certains facteurs de la coagulation (comme le FX) se sont révélés relativement réfractaires, et d'autres approches plus complexes ont dû être utilisées pour identifier des VHHs contre ces protéines. Également, l'avantage de cette approche globale est qu'elle permet de potentiellement identifier des VHHs reconnaissant une grande diversité d'épitopes sur la PS, avec des effets fonctionnels variés sur l'activité anticoagulante de la PS.

Pour sélectionner les VHHs de notre banque immune, une première stratégie classique de phage-display a été utilisée. Celle-ci a consisté à utiliser des billes magnétiques recouvertes de PS humaine recombinante (rhPS), puis à éluer les VHHs d'intérêt avec de la trypsine (**Figure 28**).

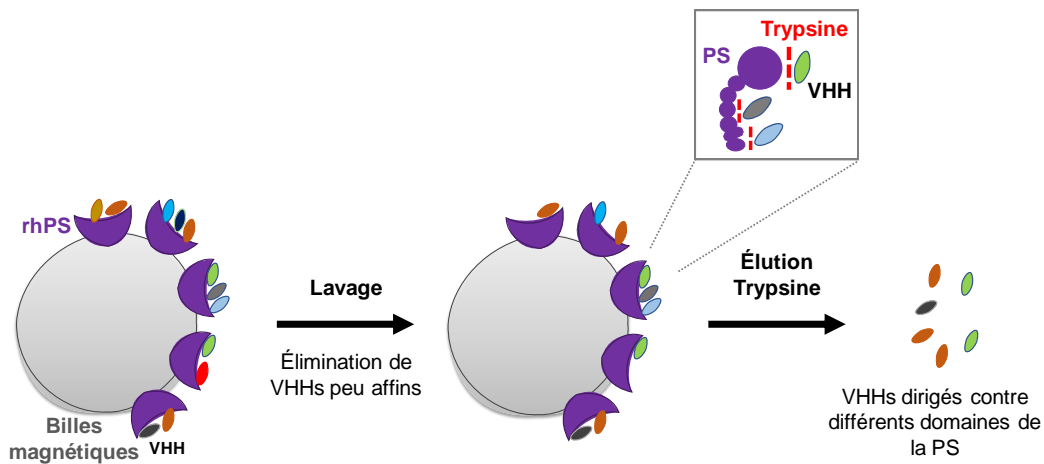


Figure 28 : Stratégie de sélection « non spécifique » de VHHs anti-PS. Dans un premier temps, les VHHs ont été sélectionnés sur de la PS humaine recombinante (rhPS) et élués avec de la trypsine. Cette stratégie a été utilisée pour obtenir des VHHs pouvant interagir avec différentes régions de la PS, et ainsi obtenir de potentiels modulateurs des différentes activités anticoagulantes de la PS.

À la suite d'un premier criblage de 200 VHHs issus du premier tour de sélection, 2 VHHs reconnaissant plutôt faiblement la rhPS ont été identifiés (PS001 et PS002). Malheureusement, une fois exprimés dans les bactéries *E. coli* SHuffles et purifiés, ceux-ci se liaient très peu ou pas du tout à la rhPS, en ELISA, et une liaison non spécifique au fond de puits coatés avec de la BSA a aussi été observée. Pour augmenter la probabilité d'obtenir des VHHs spécifiques de la PS, un deuxième tour a donc été réalisé, et une étape de déplétion des phages non spécifiques sur des billes recouvertes de BSA a été ajoutée. Après incubation sur des billes recouvertes de rhPS, les phages ont été élués avec de la trypsine, comme pour le premier tour. Le criblage de 200 VHHs issus de ce 2^{ème} tour de sélection a permis d'identifier le VHH PS003 qui se liait fortement à la rhPS. Après son expression dans les bactéries SHuffles et sa pu-

rification, ce VHH a démontré une plus forte spécificité et une affinité assez haute pour la rhPS, pour un VHH monovalent (**Figure 1 de l'article**).

Une autre stratégie a été utilisée et a consisté à sélectionner les phages de notre banque immune sur de la rhPS immobilisée au fond de puits de plaque ELISA. Après 3 tours de sélection, un criblage de 200 VHHs a permis d'identifier d'autres VHHs (PS004, PS005, PS006 et PS007) se liant fortement et spécifiquement à la rhPS. Après expression et purification, seul 1 VHH (le PS004) a démontré une liaison à la rhPS, en ELISA direct.

Même si le nombre de VHHs identifiés est relativement faible (entre 2 et 5 VHHs d'intérêt sur 600 clones criblés au total), ces résultats montraient pour la première fois que des VHHs reconnaissant la PS avec affinité pouvaient être générés.

L'ensemble des VHHs identifiés ont été criblés pour leur capacité à moduler l'activité cofacteur de la PCa de la PS, dans un test global de coagulation plasmatique. En effet, cette activité cofacteur de la PCa est la plus reconnue à l'heure actuelle, et le test fonctionnel utilisé est un test robuste, reproductible et utilisé en clinique (STACLOT® PS, Stago). Dans ce test plasmatique est évaluée la capacité de la rhPS à allonger les temps de coagulation mesuré sur un plasma déplété en PS et supplémenté avec de la rhPS, de la PCa et du FVa. L'effet de chaque VHH sur l'allongement du temps de coagulation par la rhPS a été évalué (**Figure 29**). De façon très intéressante mais inattendue, le VHH PS003 a démontré une activité très particulière, en potentialisant l'activité de la PS sur la PCa (**Figure 29**).

De façon intéressante, cette stratégie d'approche globale nous a également permis d'identifier des VHHs exerçant des effets différents sur l'activité cofacteur de la PCa de la PS. En particulier, certains autres VHHs inhibaient l'activité cofacteur de la PCa de la PS, ou n'avaient aucun effet (**Figure 29**). L'identification de tels VHHs avec des effets variés sur l'activité cofacteur de la PCa de la PS montre que leurs effets sont spécifiques et non dus à un effet commun lié à la structure des VHHs, par exemple.

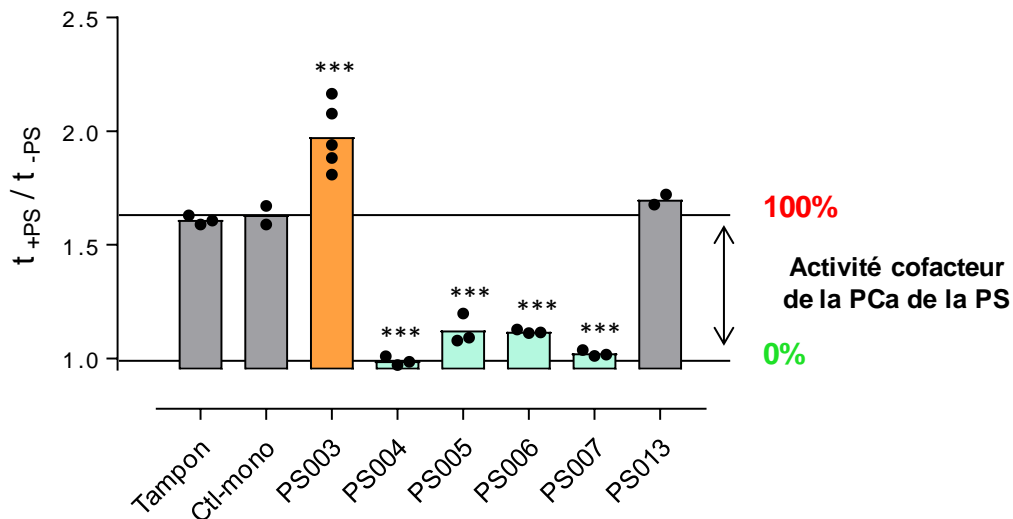


Figure 29 : Effet de VHHs anti-PS sur l'activité cofacteur de la PCa de la PS dans un test commercial du temps de coagulation. Dans ce test, la rhPS a d'abord été pré-incubée ou non avec les VHHs pendant 15 min à température ambiante. Par la suite, un plasma déficient en PS a été supplémenté avec le mélange rhPS/VHHs (concentrations finales de 6 nM et 2 μ M, respectivement), de la PCa, du FVa bovin et un réactif TCA. Après 2 min d'incubation à 37°C, du CaCl_2 a été ajouté et le temps de coagulation a été mesuré. Dans ces conditions expérimentales, la rhPS allonge le temps de coagulation mesuré en présence de PCa seule d'environ 1.6 fois. Le ratio t_{+PS}/t_{-PS} représente l'activité cofacteur de la rhPS, qui est de 1.6. Certains VHHs comme le PS013 n'ont aucun effet sur ce ratio t_{+PS}/t_{-PS} . Cependant, le VHH PS003 augmente ce ratio jusqu'à une valeur de 2.0. Les VHHs PS004 à PS007 semblent inhiber fortement l'activité cofacteur de la PS. Un test Anova et un test Tukey (comparaison par rapport à la condition sans VHHs, tampon) ont été utilisés comme tests statistiques, *** $P < 0.0001$.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur une caractérisation plus poussée du VHH PS003 qui nous apparaissait particulièrement intéressant, notamment en ce qui concernait de potentielles applications thérapeutiques. La caractérisation du VHH PS003 a fait l'objet d'un premier travail qui a abouti à la rédaction d'un manuscrit en cours de soumission.

RÉSULTATS

Article: Potentiel antithrombotique d'un anticorps à domaine unique potentialisant l'activité cofacteur de la PCa de la protéine S (article soumis, en révision)

Antithrombotic potential of a single-domain antibody enhancing the activated protein C-cofactor activity of protein S

Josepha C. Sedzro¹, Frédéric Adam¹, Elsa Bianchini¹, Allan De Carvalho¹, Ivan Peyron¹, Sadyo Daramé¹, Sophie Gandrille^{2,3}, Stella Thomassen⁴, Tilman M. Hackeng³, Olivier D. Christophe¹, Peter J. Lenting¹, Cécile V. Denis¹, Delphine Borgel^{1,5}, François Saller¹

Affiliations:

1. Hémostase, Inflammation, Thrombose (HITh), UMR-S1176, INSERM, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France
2. Innovations Thérapeutiques en Hémostase, UMR-S1140, INSERM, Université de Paris, Paris, France
3. Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France
4. Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM), University Maastricht, Maastricht, The Netherlands
5. Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Necker Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France

Correspondence:

François Saller

HITh, INSERM UMR-S1176

Hôpital Bicêtre, Bâtiment Pincus,

80 rue du Général Leclerc

94276 Le Kremlin-Bicêtre

France

Email: francois.saller@universite-paris-saclay.fr

Word count: 4892 words

ESSENTIALS

1. Protein S (PS) is an important natural anticoagulant acting as a cofactor for both activated protein C (APC) and tissue factor pathway inhibitor α (TFPI α)
2. We demonstrated that llama-derived anti-PS single-domain antibodies (sdAbs) modulating the APC-cofactor activity of PS could be successfully generated
3. We identified one original PS-specific sdAb specifically enhancing the APC- cofactor activity of PS in a plasma clotting assay
4. We evidenced that enhancing the APC-cofactor activity of PS through this sdAb exerted *in vivo* antithrombotic effects in mice while sparing physiological hemostasis, which might constitute a promising and safe antithrombotic strategy

ABSTRACT

Background: Protein S (PS) is a natural anticoagulant acting as a cofactor for activated protein C (APC) in the proteolytic inactivation of activated factor V (FVa) and VIII (FVIIIa), but also for tissue factor pathway inhibitor α (TFPI α) in the inhibition of activated factor X (FXa).

Objective: For therapeutic purposes, we aimed at generating single-domain antibodies (sdAbs) that could specifically modulate the APC-cofactor activity of PS *in vitro* and *in vivo*.

Methods: A llama-derived immune library of sdAbs was generated and was screened on recombinant human PS by phage-display. PS binders were tested in a global plasma-based APC-cofactor activity assay.

Results: A PS-specific sdAb (PS003) was found to enhance the APC-cofactor activity of PS in our plasma-based assay. A bivalent form of PS003 was generated (PS003biv) and exerted a greater enhancing effect on the APC-cofactor activity of PS. Further characterization of PS003biv demonstrated that PS003biv was directed against the sex hormone-binding globulin (SHBG)-like domain of PS but did not inhibit the binding of PS to C4b-binding protein (C4BP) and did not interfere with the TFPI α -cofactor activity of PS. In mice, PS003biv exerted an antithrombotic effect in a ferric chloride-induced thrombosis model, while not affecting physiological hemostasis in a tail-clip bleeding model.

Discussion: Altogether, these results showed that pharmacological enhancement of the APC-cofactor activity of PS through an original anti-PS sdAb might constitute a promising and safe antithrombotic strategy.

Key words: Protein S, Thrombosis, Single-domain antibodies, Protein C, Blood coagulation

INTRODUCTION

Protein S (PS) is a natural vitamin K-dependent anticoagulant protein that limits thrombin generation at multiple levels within the coagulation cascade. Indeed, PS is well known as a non-enzymatic cofactor for activated protein C (APC) in the proteolytic inactivation of activated factor V (FVa) and VIII (FVIIIa), but is also recognized as a cofactor for the α isoform of tissue factor pathway inhibitor (TFPI α) in the inhibition of activated factor X (FXa) (Reviewed in (1)). Besides, PS has been shown to directly inhibit intrinsic tenase (2,3) and prothrombinase (4-6) complexes, or to act as a direct inhibitor of activated factor IX (FIXa) (7,8). However, these APC- and TFPI α -independent anticoagulant activities of PS are far less extensively studied.

As for all vitamin K-dependent proteins, PS is composed of an N-terminal domain rich in γ -carboxyglutamic acids (Gla domain). In PS, this domain is followed by a short PS-specific thrombin-sensitive region (TSR), 4 epidermal growth factor (EGF)-like domains, and a large C-terminal region homologous to sex hormone-binding globulin (SHBG-like domain).

The relative importance of the APC- and TFPI α -cofactor activity of PS *in vivo* is unknown. However, the physiological importance of PS is demonstrated by the increased thrombotic risk in patients with heterozygous PS deficiency and by the dramatic and life-threatening microvascular thrombotic complications, *i.e.* purpura fulminans and disseminated intravascular coagulation, associated with severe deficiency in PS (9,10). In mice, complete loss of PS is embryonically lethal and associated with consumptive coagulopathy, extensive thromboses and hemorrhages (11,12).

One study suggested that enhancing the anticoagulant activity of APC through PS might constitute an antithrombotic strategy. Indeed, in a rabbit model of thrombosis, administration of PS together with APC exerted potent antithrombotic effects, as compared to the administration of APC alone (13). Furthermore, this exogenous administration of PS together with APC was not associated with hemorrhagic side effects. Conversely, in hemophilic mice, the administration of a blocking polyclonal anti-PS antibody improved hemostasis, and the injection of a specific siRNA targeting murine PS led to reduced peripheral and intra-articular bleedings (14). This evidenced that pharmacological inhibition of PS could constitute a therapeutic approach

in hemophilia. Altogether, these studies indicated that pharmacological modulation of the anticoagulant activities of PS might represent a therapeutic approach either in thrombotic or hemorrhagic diseases.

For modulating the anticoagulant activity of PS, we chose to generate single-domain antibodies (sdAbs) targeting PS. These so-called sdAbs are the isolated variable part (VHH) of heavy-chain antibodies found in camelids and are also known as nanobodies (15). In the present study, we reported the generation of a library of sdAbs from a llama immunized with PS. This library was used to select by phage display sdAbs targeting PS, and PS-specific sdAbs were screened in a global plasma-based APC-cofactor activity assay. By using this strategy, we identified an anti-PS sdAb which unexpectedly enhanced the APC-cofactor activity of PS. This sdAb appeared to us as a unique tool to test the functional consequences of enhancing the APC-cofactor activity of PS *in vivo*, in murine thrombosis and bleeding models. Very interestingly, we showed that pharmacological enhancement of the APC-cofactor activity of PS with this sdAb might constitute a novel antithrombotic strategy without hemorrhagic side effects.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and ethics statement

Male mice on a C57BL6/JRccHsd background purchased from Envigo (Gannat, France) were used in the present study. Housing and experiments were performed in accordance with French regulations and the experimental guidelines of the European Community. This project was approved by the ethical committee CEEA26 under the number APAFIS#26123-2020061914436649v1.

Materials

Recombinant human (rhPS) and murine (rmPS) PS were expressed in HEK293 cells in serum-free Dubbelco Modified Eagle's Medium (DMEM) in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vitamin K1 (Roche), and purified by a two-step anion-exchange chromatography, as previously described (16). The expression and purification of recombinant human Gas6 (rhGas6) was previously described (17). Plasma-derived human C4b-binding protein (C4B) containing the β chain was purified as previously described (18). Plasma-derived human APC, FVa, prothrombin, and a specific chromogenic substrate for FXa (pNAPEP-1032) were from Cryopep (Montpellier, France). Human plasma-derived FXa was from Stago BNL (Leiden, The Netherlands). Recombinant human full-length TFPI α (1-276) produced in *E. coli* was kindly provided by T. Lindhout (Cardiovascular Research Institute Maastricht, Maastricht, The Netherlands). Peroxidase-conjugated polyclonal sheep anti-PS antibody (MyBioSource, MBS512137) was purchased from Gentaur (Paris, France). A blocking polyclonal rabbit anti-PS antibody (A0394) was from DAKO (Glostrup, Denmark). Phospholipid vesicles containing 60 % phosphatidylcholine, 20 % phosphatidylserine, and 20 % phosphatidylethanolamine were prepared as described (19).

Isolation of anti-PS single-domain antibodies

Anti-PS single-domain antibodies (sdAbs) were identified essentially as previously described for anti-von Willebrand factor (VWF) sdAbs (20). Briefly, 4 weeks after immunization of a llama with rhPS, peripheral blood lymphocytes were isolated and total mRNA was used for the synthesis of cDNA via reverse transcriptase using a CH2' primer. VHH-encoding DNA fragments were obtained from the cDNA by a nested-

PCR reaction, and fragments were subsequently cloned into the pHEN6 phagemid vector. The ligated material was used to transform competent TG1 *E. coli* cells, allowing the creation of a library of $>10^7$ transformants. Phages exposing each sdAb were rescued by infection of a culture of this library with M13KO7-helper phages (New England Biolabs, Évry, France), and phage particles were incubated with Dynabeads M-450 epoxy magnetic beads (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) chemically coupled with purified rhPS. Beads were washed and captured phages were eluted with trypsin. Eluted phages were used to infect TG1 *E. coli* cells that were then grown overnight to generate a sublibrary of TG1 *E. coli* cells enriched in PS-specific clones. Phages were rescued from this sublibrary, and phage particles were incubated with magnetic beads chemically coupled with BSA, to remove unspecific binders. Unbound phage particles were then used in a second round of biopanning on magnetic beads chemically coupled with rhPS, as described for the first round of biopanning. Eluted phages from this second round of panning were serially diluted to infect TG1 *E. coli* cells and plated on LB Agar plates supplemented with ampicillin. To isolate genuine PS-specific sdAbs, 192 ampicillin-resistant TG1-clones were grown overnight in 96-deep well culture plates in 0.5 mL 2YT-medium, and the expression of individual sdAbs was induced with 1 mM IPTG. Periplasmic extracts containing each sdAb were prepared as described (20) and tested for their binding to immobilized rhPS and BSA in a screening ELISA. One of these sdAbs strongly and specifically bound to rhPS and was named PS003.

Construction, expression and purification of anti-PS single-domain antibodies

The cDNA sequence of PS003 was cloned into the pET28-plasmid and flanked by an N-terminal His6-tag and a C-terminal hemagglutinin (HA)-tag. To potentially increase the affinity and activity of PS003, a bivalent form of PS003 (PS003biv) was constructed by fusing two cDNA sequences of PS003 through a flexible (GGGS)₄ linker. The cDNA sequence of PS003biv was synthesized (ProteoGenix, Schiltigheim, France) and was also cloned into the pET28-plasmid.

The plasmids encoding the sdAbs were used to transform competent T7 SHuffle *E. coli* cells (New England Biolabs). For each sdAb, a single kanamycin-resistant colony was cultured at 30°C in 330 mL of LB medium containing 30 µg/mL kanamycin until $0.4 < OD_{600\text{ nm}} < 0.6$. The cytoplasmic expression of sdAbs was then induced by the addition of 0.1 mM IPTG, and sdAbs were produced for 16 h at 20°C.

Bacterial pellets were resuspended in 50 mM Na₂HPO₄, 0.3 M NaCl pH 7.4 containing 10 µg/mL lysozyme and 25 U/mL benzonase (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Saint-Quentin Fallavier, France) and supplemented with SigmaFAST protease inhibitors (Sigma-Aldrich). The suspension was sonicated and centrifuged at 12000 rpm for 30 min at 4°C. Lysates were frozen at -20°C and sdAbs were then purified through Protein A affinity chromatography (Cytiva, Fisher Scientific, Illkirch, France).

Binding of single-domain antibodies to PS and vitamin K-dependent proteins

Binding of sdAbs to PS was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Recombinant human PS (rhPS) was coated onto the wells of a 96-well, U-bottom microtiter plate (Nunc MaxiSorp, ThermoFisher Scientific) at 2.5 µg/mL in 50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7.4 (TBS buffer) containing 5 mM CaCl₂ for 16 h at 4°C. Wells were blocked for 1 h at room temperature with TBS containing 0.1 % Tween-20, 5 mM CaCl₂ (TBST-Ca²⁺ buffer) and 5 % bovine serum albumin (BSA), and incubated with increasing concentrations of sdAbs (0-100 nM) diluted in TBST-Ca²⁺ containing 2 % BSA for 1 h at room temperature. A peroxidase-conjugated polyclonal anti-His6 tag antibody (Abcam, Paris, France) (0.2 µg/mL in TBST-Ca²⁺ containing 2 % BSA) was incubated for 1 h at room temperature and peroxidase activity was detected via hydrolysis of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). Wells were washed 3 times with TBS containing 5 mM CaCl₂ and 0.1% Tween (TBST-Ca²⁺) between each step. For each sdAb, three individual experiments were done in triplicate, and the results were expressed as percentage of maximal binding for each sdAb.

Binding of sdAbs to various vitamin K-dependent proteins (FIX, FX, protein Z) was evaluated as described above. To this purpose, recombinant human FIX (nonacog alfa, BeneFIX), human plasma-derived FX (Cryopep) and plasma-derived protein Z (Hyphen Biomed, Neuville-sur-Oise, France) were used. The binding of PS003 to immobilized FIX, FX and FX was compared to that of polyclonal anti-FIX, anti-FX and anti-protein Z antibodies.

Binding of PS to single-domain antibodies in sandwich ELISA

Single-domain antibodies (10 µg/mL in TBS) were coated onto 96-well plates and increasing concentrations of rhPS or purified plasma-derived human PS (pdhPS) (0-200 nM) diluted in TBS containing 5 mM CaCl₂ and 1% BSA were incubated and probed with a peroxidase-conjugated polyclonal sheep anti-PS antibodies. The blocking and washings steps were performed as previously described.

Binding of PS to C4b-binding protein (C4BP)

The binding of rhPS (0-200 nM) to immobilized plasma-derived human C4BP (10 µg/mL in 50 mM sodium carbonate, pH 9.6) was assessed with a direct ELISA as previously described. A peroxidase-conjugated polyclonal sheep anti-PS antibody (0.1 µg/mL in TBS containing 5 mM CaCl₂ and 1% BSA) was used to detect PS. In this assay, rhPS dose-dependently bound to immobilized C4BP with an apparent K_d (K_{d app}) value of 2.0 ± 0.1 nM (data not shown). When the effects of anti-PS sdAbs were evaluated in this binding assay, 2 nM rhPS were thus pre-incubated in TBS containing 5 mM CaCl₂ and 1% BSA (Buffer) for 15 min at room temperature with sdAbs (2 µM) or with a blocking polyclonal rabbit anti-PS antibody (DAKO, 0.5 µM) or a control rabbit IgG (DAKO, 0.5 µM), before being added to immobilized C4BP.

APC-cofactor activity of PS in an APTT-based clotting assay

We used a commercial activated partial thromboplastin time (APTT)-based plasma clotting assay (STACLOT® PS) (Stago, Asnières, France) on a KC4 Coagulometer (Stago) to measure the ability of rhPS to act as a cofactor for APC. Briefly, sdAbs (10 µM) were pre-incubated or not with rhPS (25 nM) in TBS containing 0.1 % BSA for 15 min at room temperature, and 25 µL of this mixture of sdAb ± rhPS were added to 25 µL of PS-deficient plasma (R1 Reagent) together with APC (R2 Reagent, 25 µL) and bovine FVa (Reagent R3, 25 µL). After a 2-min incubation at 37°C, clotting was triggered by the addition of 25 µL of 50 mM CaCl₂, and clotting times were recorded. Reagents R1, R2 and R3 were from the STACLOT® PS kit. The final concentrations of rhPS and the sdAbs were 6 nM and 2 µM, respectively. For each sdAb, the results were expressed as ratios of clotting times in the presence of rhPS (t_{+PS}) to the clotting times in the absence of rhPS (t_{-PS}).

TFPIα-cofactor activity of PS

The time course of FXa inhibition by TFPI α , in the absence or presence of rhPS, was measured in a continuous chromogenic assay in TBS containing 10 mM CaCl₂, 0.2% PEG, and 0.2% BSA. Inhibition was initiated by the addition of human FXa (0.2 nM) to a mixture containing human TFPI α (5 nM), phospholipid vesicles (25 μ M), FXa-specific chromogenic substrate (pNAPEP-1032, 400 μ M) and increasing concentrations of rhPS (0-40 nM) or 10 nM rhPS pre-incubated or not for 15 min at room temperature with sdAbs (2 μ M). Hydrolysis of the chromogenic substrate was measured at 405 nm using a microplate reader (MP96, Safas, Monaco). The apparent rate constant (k_{obs}) for the inhibition of FXa by TFPI α was estimated by fitting the progress curves of substrate hydrolysis to the equation for slow-binding inhibition, as previously described (21,22). When indicated, the TFPI α -cofactor activity of PS was expressed as the percentage of the k_{obs} estimated for 10 nM rhPS.

Ferric chloride-induced mouse thrombosis model

Ferric chloride (FeCl₃)-injury was induced in 4- to 5-week-old C57BL6/JRccHsd male mice, as previously described (23). Briefly, anesthetized mice received by intravenous injection a bolus of Rhodamine 6G (3.3 mg/kg) to fluorescently label platelets *in vivo*, and sdAbs (10 mg/kg). Alternatively, to verify that this thrombosis model was sensitive to pharmacological inhibition of coagulation, some mice received a bolus of low-molecular-weight heparin (LMWH, Lovenox, 200 UI/kg) by subcutaneous injection. After 10 min, a topical deposition of FeCl₃ solution (10 %) was applied on the mesenteric vessels. Thrombus growth was monitored in real-time with an inverted epifluorescent microscope (x10) (Nikon Eclipse TE2000-U). One single venule and one single arteriole were analyzed for each mouse, and if no occlusion was observed after 60 min, the occlusion time was recorded as over 60 min.

Mouse tail-clip bleeding model

Anesthetized mice (10-week-old) were intravenously injected with sdAb (10 mg/kg) or subcutaneously injected with LMWH (Lovenox, 200 UI/kg). Tails were then immersed in a saline solution (0.9 % NaCl) maintained at 37°C for 10 min before cutting off the tip of the tail (3 mm from the tip) and immediately immersed again in the saline solution. Bleeding time was defined as the first cessation of bleeding for at least 60 seconds, to ensure that bleeding did not start again, otherwise it was considered as re-bleeding. Blood was collected in the saline solution during 20 min and the volume of

blood lost was evaluated. Briefly, after centrifugation of the tubes (750 g, 15 min, room temperature), lysis of red blood cells was performed by adding distilled water, and hemoglobin concentrations were quantified by reading the absorbance at 416 nm and by comparison with a standard curve obtained from serial dilutions of known volume of blood.

Statistical analysis

One-way ANOVA was used as a statistical test of variance with Tukey's multiple comparison test except for the FeCl₃-induced mouse thrombosis model which statistical analysis was assessed with Kruskal Wallis and Dunn's tests.

RESULTS

Identification of the anti-PS sdAb PS003

A llama was immunized with a recombinant form of PS (rhPS) and a sdAb library of $>10^7$ transformants was constructed. To isolate PS-specific sdAbs, phage-display using rhPS chemically coupled to magnetic beads was used. After 2 rounds of biopanning, one sdAb clone was found to strongly and specifically bind to immobilized rhPS and was designated PS003.

The cDNA encoding PS003 was cloned into a pET28 expression vector in which the sequence of PS003 was flanked by an N-terminal His6 tag and a C-terminal HA tag (**Supplementary Fig 1A**) and PS003 was expressed in SHuffle *E. coli* cells. To purify PS003 (**Supplementary Fig 1B**), we took advantage of its ability to bind to staphylococcal protein A, an intrinsic property conferred by various amino-acid residues within its sequence and which is not shared by all sdAbs (24). In our hands, purification of sdAbs through protein A affinity chromatography led to a high degree of purity.

Purified PS003 was first tested for its capacity to bind to rhPS. In a direct ELISA, PS003 dose-dependently bound to immobilized rhPS (**Supplementary Fig 2**) with an apparent K_d ($K_{d\text{ app}}$) value of 6.7 ± 1.2 nM. To rule out that PS003 only recognized a non-native immobilized form of rhPS, a sandwich ELISA was used to assess the binding of rhPS, in solution, to immobilized PS003. In the same sandwich ELISA, we also tested whether a purified form of plasma-derived human PS (pdhPS) (and not only rhPS) bound to PS003. The results showed that both rhPS and pdhPS effectively bound to PS003 (**Fig 1A**).

The binding of PS003 to several vitamin K-dependent coagulation proteins was then assessed to gain insights into its specificity for PS. Interestingly, PS003 (20 nM) was found to bind to immobilized rhPS but not to immobilized FIX, FX, and protein Z in our direct ELISA (**Fig 1B**).

Construction of a bivalent form of PS003 (PS003biv)

Increasing the valency of some sdAbs can result in increased affinity for their cognate antigen and/or potency (25,26). Thus, we decided to generate a bivalent form of PS003, designated PS003biv, by linking two PS003 subunits through a flexible

(GGGS)₄ linker. Like PS003, PS003biv was also flanked by an N-terminal His6 tag and a C-terminal HA tag and was expressed and purified as for PS003 (**Supplementary Fig 1**). In a direct ELISA, PS003biv still retained its ability to bind to immobilized rhPS (**Supplementary Fig 2**), with a $K_{d\ app}$ value of 2.8 ± 0.6 nM. Thus, PS003biv bound to rhPS with only 2.4-fold higher affinity than PS003, suggesting that the increase in valency had a modest impact on the affinity of PS003 for PS.

Enhancement of the APC-cofactor activity of PS by PS003 and PS003biv

An APTT-based clotting assay was used to measure the APC-cofactor activity of PS. In this assay, rhPS dose-dependently prolonged the clotting times of PS-deficient plasma in the presence of APC (**Supplementary Fig 3A**), and an intermediate concentration of rhPS (6 nM) was chosen to be able to detect any modulatory effects on the APC-cofactor activity of PS. Under these conditions, rhPS did not prolong the clotting times of PS-deficient plasma in the absence of APC (**Supplementary Fig 3B**).

The effects of PS003 and PS003biv on the APC-cofactor activity of rhPS were then assessed and compared to those of control monovalent (Ctl-Mono) and bivalent (Ctl-Biv) sdAbs. When PS-deficient plasma was supplemented with rhPS pre-incubated with no sdAbs (Buffer), Ctl-Mono, and Ctl-Biv, the clotting times were 132.5 ± 7.4 s, 132.8 ± 5.7 s, and 130.7 ± 1.2 s, respectively (**Fig 2A**). This demonstrated that Ctl-Mono and Ctl-Biv did not affect the APC-cofactor activity of rhPS. In contrast, the clotting times were 189.9 ± 3.7 s and 256.5 ± 10.6 s when PS-deficient plasma was supplemented with rhPS pre-incubated with PS003 and PS003biv, respectively (**Fig 2A**). The t_{+PS}/t_{-PS} ratios, reflecting the APC-cofactor activity of rhPS, were 1.85 ± 0.05 and 2.84 ± 0.09 for Ctl-Mono and PS003, respectively, and 1.95 ± 0.01 and 3.52 ± 0.11 for Ctl-Biv and PS003biv, respectively (**Fig 2B**). In the absence of rhPS, clotting times were not prolonged by the addition of PS003 or PS003biv alone (**Fig 2A**), evidencing that their enhancing effect was dependent on the presence of PS.

Collectively, these results demonstrated that PS003 and PS003biv significantly enhanced the APC-cofactor activity of rhPS by 1.5-fold ($p < 0.001$) and 1.8-fold ($p < 0.001$), respectively, as compared to their respective control sdAb (**Fig 2B**). Interestingly, PS003biv had a significant ($p < 0.01$) greater enhancing effect on the APC-

cofactor activity of PS than its monovalent counterpart PS003. Therefore, we chose to further characterize PS003biv.

Recognition of the PS SHBG-like domain by PS003biv

As PS003biv enhanced the APC-cofactor activity of PS, we hypothesized that the epitope for PS003biv was not localized within the N-terminal part of PS (*i.e.* the Gla-TSR-EGF1-EGF2). Indeed, these domains have been largely involved in the APC-cofactor activity of PS and sdAbs targeting these domains would have rather inhibited this activity of PS. To test this hypothesis, we assessed the binding of PS003biv to a recombinant form of the isolated PS SHBG-like domain alone (rSHBG) (27). In a direct ELISA, PS003biv comparably bound to immobilized rSHBG and rhPS (**Fig 3A**), demonstrating that the epitope for PS003biv was localized within the PS SHBG-like domain. This supported the specificity of PS003biv for PS, as the SHBG-like domain is not found in any other coagulation factors. A homologous SHBG-like domain is contained in Gas6 (~ 40 % homology), a vitamin K-dependent protein that shares a high degree of similarity with PS, both in module organization and at the amino-acid level. However, PS003biv did not bind to immobilized recombinant human Gas6 (rhGas6) (**Fig 3A**), further highlighting the specificity of PS003biv for PS.

The SHBG-like domain is well known for its ability to mediate the binding of PS to C4b-binding protein (C4BP). However, in contrast to a blocking polyclonal anti-PS antibody (Anti-PS pAb), PS003biv and its control bivalent sdAb had no inhibitory effects on the binding of PS to immobilized C4BP in a solid-phase assay (**Fig 3B**).

Effect of PS003biv on the TFPI α -cofactor activity of PS

The PS SHBG-like domain has also been involved in the interaction of PS with TFPI α . We thus tested whether PS003biv might affect the TFPI α -cofactor activity of rhPS in the inhibition of FXa. In our functional assay, the amidolytic activity of FXa was monitored in the presence of TFPI α , phospholipid vesicles and Ca²⁺, and a concentration of TFPI α (5 nM) was chosen to slightly inhibit FXa (**Supplementary Fig 4A**). Under these conditions, rhPS dose-dependently stimulated the inhibitory activity of TFPI α towards FXa (**Supplementary Fig 4A and 4B**). An intermediate concentration of rhPS (10 nM) was chosen to detect any inhibitory or potentiating effect on the TFPI α -cofactor activity of rhPS in this assay. Contrary to a blocking polyclonal anti-

PS antibody that abolished the TFPI α -cofactor activity of rhPS, PS003biv had no effect (**Fig 4**), as rhPS retained 94.8 ± 5.4 % ($p=0.17$, $n=3$) of its cofactor activity in the presence of PS003biv.

Antithrombotic effects of PS003biv in a mouse thrombosis model

Collectively, our results suggested that PS003biv enhanced the APC-cofactor activity of PS but did not interfere with the TFPI α -cofactor activity of PS. This prompted us to test whether the pharmacological enhancement of the APC-cofactor of PS with PS003biv would result in antithrombotic effects *in vivo*.

In a direct ELISA, PS003biv efficiently bound to recombinant mouse PS (**Supplementary Fig 5**), and PS003biv could thus be tested in a FeCl₃-induced thrombosis model in mouse mesenteric vessels. This model was sensitive to pharmacological inhibition of coagulation as low-molecular-weight heparin (LMWH, 200 UI/kg SC) resulted in a total absence of occlusion at 60 min in both venules and arterioles (**Fig 5**). Very interestingly, the administration of PS003biv (10 mg/kg IV) led to a significant ($p<0.05$) delay of the occlusion times in venules, but not in arterioles (**Fig 5**). In contrast, the occlusion times in both venules and arterioles were unaffected when mice received a control bivalent sdAb (**Fig 5**). Together, these results suggested that PS003biv exerted antithrombotic effects *in vivo*.

PS003biv did not affect physiological hemostasis in a murine bleeding model

To evidence the therapeutic potential of PS003biv, we tested its effects on physiological hemostasis in a mouse tail-clip bleeding model. For comparison purposes, we used the same doses and routes of administration for PS003biv and LMWH as in the FeCl₃-induced thrombosis model. In the bleeding model, the subcutaneous injection of LMWH (200 UI/kg) slightly but significantly ($p<0.05$) delayed the bleeding times and increased the blood loss volumes (**Fig 6**). A higher dose of LMWH (1000 UI/kg) had a more pronounced effect on the previous parameters, evidencing that this bleeding model was sensitive to pharmacological anticoagulation (data not shown). In contrast, the administration of PS003biv (10 mg/kg IV) had no significant effect on both bleeding times and blood loss volumes (**Fig 6**). Collectively, these results indicated that enhancing the APC-cofactor activity of PS might constitute an original and safe antithrombotic strategy.

DISCUSSION

To generate original llama-derived sdAbs that could modulate the APC-cofactor activity of PS, we used a phage-display approach coupled with a functional screening in a global plasma-based APC-cofactor activity assay. This strategy allowed us to identify a sdAb (PS003/PS003biv) which unexpectedly enhanced the APC-cofactor activity of PS. Thus, PS adds to the growing list of hemostatic proteins that can be targeted by sdAbs (reviewed in (15)). This study also paves the way for the development of other selection and screening strategies for the identification of tailored anti-PS sdAbs aimed at specifically blocking peculiar anticoagulant activities (e.g. APC- or TFPI α -cofactor activity).

How PS003/PS003biv enhances the APC-cofactor activity of PS is currently unknown. The APC-cofactor activity of PS is complex, and its underlying molecular bases are still not completely known. It is noteworthy that physiological modulators can play a prominent role in FVa and FVIIIa inactivation by APC during coagulation. Indeed, when incorporated within the tenase complex, FVIIIa is protected from APC by FIXa and this protecting effect is reversed by PS (28). Similarly, when incorporated within the prothrombinase complex, FVa is protected from APC by both FXa (29,30) and prothrombin (31,32). Again, PS modulates this protection of FVa from APC by counteracting the protective effect of FXa (30,33). Interestingly, PS was found to rather enhance the protective effect of prothrombin on FVa, at physiological but not low concentrations of prothrombin (34). Whether this synergistic effect is caused by a direct interaction between PS and prothrombin is unknown, and to our knowledge PS has not been reported to bind to prothrombin. In this context, our PS003/PS003biv sdAbs might alter the interaction of PS with prothrombin or a plas-matic component functioning as an inhibitor in the inactivation of FVa and/or FVIIIa by APC. Alternatively, PS003/PS003biv could induce a conformational change in PS that favors the expression of its APC-cofactor activity. Further studies will be required to extensively explore these possibilities and to decipher the molecular bases underlying the enhancing effect of our sdAbs on the APC-cofactor activity of PS.

Although the epitope for PS003biv was localized within the C-terminal PS SHBG-like domain, PS003biv did not exert its anticoagulant effects by dissociating the PS-C4BP complex and by increasing the concentration of free PS in our

plasma clotting assay. Indeed, this assay was based on the measurement of clotting times in a PS-deficient plasma reconstituted with rhPS, and C4BP was thus absent. In addition, dissociation of the PS-C4BP complex did not account for the *in vivo* antithrombotic effects of PS003biv, as PS does not form any complex with C4BP and only circulates in its free form in mice (35). Furthermore, the possibility that PS003biv would dissociate the PS-C4BP complex in human plasma was ruled out by the absence of inhibitory effects of PS003biv on the binding of rhPS to C4BP in a solid-phase assay.

The TFPI α -cofactor activity of PS in FXa inhibition is crucially dependent on the binding of the PS SHBG-like domain to TFPI α (36). Although PS003biv was directed against the latter domain, it did not interfere with the TFPI α -cofactor activity of PS. Consequently, we ruled out the possibility that potential *in vivo* anticoagulant effects of PS003biv through enhancement of the APC-cofactor activity of PS would have been counteracted or masked by any procoagulant effect caused by defective TFPI α -cofactor activity of PS.

A key finding of the present study is that PS003biv exerted antithrombotic effects in mice while apparently sparing physiological hemostasis. Although these antithrombotic effects will need to be confirmed in other models of thrombosis, our results suggested that pharmacological enhancement of APC anticoagulant activity might constitute an original and safe antithrombotic strategy. To date, no pharmacological agent has been described to enhance the endogenous anticoagulant activity of APC. Interestingly, in a rabbit thrombosis model, the infusion of bovine PS markedly enhanced the antithrombotic effects of bovine APC, without hemorrhagic side effects or significant systemic anticoagulation (13). In this study, it has been proposed that PS might enable to localize the anticoagulant activity of APC to sites of thrombus formation, thus avoiding systemic dissemination of APC and potential hemorrhagic side effects. Likewise, PS003biv did not directly enhance the anticoagulant activity of APC but its enhancing effect was dependent on PS. Consequently, this sdAb would not systemically enhance the anticoagulant activity of APC but its anticoagulant effect would rather be confined to where PS accumulates. As PS likely accumulates on the surface of activated cells (e.g. platelets and endothelial cells) exposing anionic phospholipids, it is thus possible that the anticoagulant action of our anti-PS sdAb PS003biv might be restricted to the thrombus surface or at the site of

vascular lesion. This might explain why the administration of PS003biv did not impair physiological hemostasis *in vivo* in the present study.

In humans, high plasma levels of free PS and increased APC-cofactor activity have not been regarded as clinically associated with bleedings. Such examples are very scarce but can be observed in patients with deficiency in C4BP (37,38). This suggests that enhancement of PS APC-cofactor activity with our PS003biv sdAb might also be safe in humans.

To conclude, we reported that pharmacological enhancement of the APC-cofactor activity of PS through an original anti-PS sdAb might constitute a promising and safe antithrombotic strategy. This sdAb might be used in various thrombotic diseases or in clinical situations associated with defective protein C activation, APC resistance, or protein C and PS deficiencies, which will have to be addressed in future studies.

Author contributions: J.C.S. performed experiments, analyzed data and wrote the manuscript. F.A., E.B. and I.P. performed experiments, analyzed data, and participated in the writing of the manuscript. A.D.C. and S.D. performed experiments and analyzed data. S.G., S.T. and T.M. performed experiments, analyzed data, and revised the manuscript. O.D.C., P.J.L. and C.V.D. initiated the study, analyzed data and participated in the writing of the manuscript. D.B. and F.S. designed and supervised the study, analyzed data and wrote the manuscript.

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflict of interest with the content of the paper.

REFERENCES

1. Gierula M, Ahnström J. Anticoagulant protein S - New insights on interactions and functions. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(11):2801-11.
2. Koppelman S, Hackeng T, Sixma J, Bouma B. Inhibition of the intrinsic factor X activating complex by protein S: evidence for a specific binding of protein S to factor VIII. *Blood.* 1995;86(3):1062-71.
3. Takeyama M, Nogami K, Saenko EL, Soeda T, Nishiya K, Ogiwara K, et al. Protein S down-regulates factor Xase activity independent of activated protein C: specific binding of factor VIII(a) to protein S inhibits interactions with factor IXa. *Br. J. Haematol.* 2008;143(3):409-20.
4. Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM, Fernández JA, Tans G, Griffin JH. Protein S binds to and inhibits factor Xa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1994;91(7):2728-32.
5. Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J. Biol. Chem.* 1993;268(4):2872-7.
6. Hackeng TM, van 't Veer C, Meijers JC, Bouma BN. Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa. *J. Biol. Chem.* 1994;269(33):21051-8.
7. Chattopadhyay Rima, Sengupta Tanusree, Majumder Rinku. Inhibition of Intrinsic Xase by Protein S. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012;32(10):2387-93.
8. Plautz WE., Pilli VS, Cooley BC, Chattopadhyay R, Westmark PR., Getz T, et al. Anticoagulant Protein S Targets the Factor IXa Heparin-Binding Exosite to Prevent Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2018;38(4):816-28.
9. Kate MKT, Meer JVD. Protein S deficiency: a clinical perspective. *Haemophilia.* 2008;14(6):1222-8.
10. Regnault V, Boehlen F, Ozsahin H, Wahl D, de Groot PG, Lecompte T, et al. Anti-protein S antibodies following a varicella infection: detection, characterization and influence on thrombin generation. *J. Thromb. Haemost.* 2005;3(6):1243-9.
11. Saller F, Brisset AC, Tchaikovski SN, Azevedo M, Chrast R, Fernández JA, et al. Generation and phenotypic analysis of protein S-deficient mice. *Blood.* 2009;114(11):2307-14.
12. Burstyn-Cohen T, Heeb MJ, Lemke G. Lack of protein S in mice causes embryonic lethal coagulopathy and vascular dysgenesis. *J. Clin. Invest.* 2009;119(10):2942-53.
13. Arnlijots B, Dahlbäck B. Protein S as an in vivo cofactor to activated protein C in prevention of microarterial thrombosis in rabbits. *J. Clin. Invest.* 1995;95(5):1987-93.

14. Prince R, Bologna L, Manetti M, Melchiorre D, Rosa I, Dewarrat N, et al. Targeting anticoagulant protein S to improve hemostasis in hemophilia. *Blood*. 2018;131(12):1360-71.
15. Peyron I, Kizlik-Masson C, Dubois M, Atsou S, Ferrière S, Denis CV, et al. Camelid-derived single-chain antibodies in hemostasis: Mechanistic, diagnostic, and therapeutic applications. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2020;4(7):1087-110.
16. Fernández JA, Heeb MJ, Xu X, Singh I, Zlokovic BV, Griffin JH. Species-specific anticoagulant and mitogenic activities of murine protein S. *Haematologica*. 2009;94(12):1721-31.
17. Clauser S, Meilhac O, Bièche I, Raynal P, Bruneval P, Michel J-B, et al. Increased secretion of Gas6 by smooth muscle cells in human atherosclerotic carotid plaques. *Thromb. Haemost.* 2012;107(1):140-9.
18. Morboeuf O, Borgel D, Aiach M, Kaabache T, Gandrille S, Gaussem P. Expression and characterization of recombinant protein S with the Ser 460 Pro mutation. *Thromb. Res.* 2000;100(1):81-8.
19. Thiec F, Cherel 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):10393-9.
20. Aymé G, Adam F, Legendre P, Bazaa A, Proulle V, Denis CV, 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):1736-40.
21. Hackeng TM, Seré KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2006;103(9):3106-11.
22. Ndonwi M, Tuley EA, Broze GJ. The Kunitz-3 domain of TFPI-alpha is required for protein S-dependent enhancement of factor Xa inhibition. *Blood*. 2010;116(8):1344-51.
23. Adam F, Kauskot A, Nurden P, Sulpice E, Hoylaerts MF, Davis RJ, et al. Platelet JNK1 is involved in secretion and thrombus formation. *Blood*. 2010;115(20):4083-92.
24. Henry KA, Sulea T, van Faassen H, Hussack G, Purisima EO, MacKenzie CR, et al. A Rational Engineering Strategy for Designing Protein A-Binding Camelid Single-Domain Antibodies. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163113.
25. Deyev SM, Lebedenko EN. Multivalency: the hallmark of antibodies used for optimization of tumor targeting by design. *Bioessays*. 2008;30(9):904-18.

26. Zhu X, Wang L, Liu R, Flutter B, Li S, Ding J, et al. COMBODY: one-domain antibody multimer with improved avidity. *Immunol. Cell. Biol.* 2010;88(6):667-75.
27. Saposnik B, Borgel D, Aiach M, Gandrille S. Functional properties of the sex-hormone-binding globulin (SHBG)-like domain of the anticoagulant protein S. *Eur. J. Biochem.* 2003;270(3):545-55.
28. Regan LM, Lamphear BJ, Huggins CF, Walker FJ, Fay PJ. Factor IXa protects factor VIIIa from activated protein C. Factor IXa inhibits activated protein C-catalyzed cleavage of factor VIIIa at Arg562. *J. Biol. Chem.* 1994;269(13):9445-52.
29. Nesheim ME, Canfield WM, Kisiel W, Mann KG. Studies of the capacity of factor Xa to protect factor Va from inactivation by activated protein C. *J. Biol. Chem.* 1982;257(3):1443-7.
30. Rosing J, Hoekema L, Nicolaes GA, Thomassen MC, Hemker HC, Varadi K, et al. Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J. Biol. Chem.* 1995;270(46):27852-8.
31. Smirnov MD, Safa O, Esmon NL, Esmon CT. Inhibition of activated protein C anticoagulant activity by prothrombin. *Blood.* 1999;94(11):3839-46.
32. Yegneswaran S, Nguyen PM, Gale AJ, Griffin JH. Prothrombin amino terminal region helps protect coagulation factor Va from proteolytic inactivation by activated protein C. *Thromb. Haemost.* 2009;101(1):55-61.
33. Norstrøm EA, Tran S, Steen M, Dahlbäck B. Effects of Factor Xa and Protein S on the Individual Activated Protein C-mediated Cleavages of Coagulation Factor Va. *J. Biol. Chem.* 2006;281(42):31486-94.
34. Tran S, Norstrøm E, Dahlbäck B. Effects of prothrombin on the individual activated protein C-mediated cleavages of coagulation factor Va. *J. Biol. Chem.* 2008;283(11):6648-55.
35. Rodríguez de Córdoba S, Pérez-Blas M, Ramos-Ruiz R, Sánchez-Corral P, Pardo-Manuel de Villena F, Rey-Campos J. The gene coding for the beta-chain of C4b-binding protein (C4BPB) has become a pseudogene in the mouse. *Genomics.* 1994;21(3):501-9.
36. Reglińska-Matveyev N, Andersson HM, Rezende SM, Dahlbäck B, Crawley JTB, Lane DA, et al. TFPI cofactor function of protein S: essential role of the protein S SHBG-like domain. *Blood.* 2014;123(25):3979-87.
37. Comp P, Forristall J, West C, Trapp R. Free protein S levels are elevated in familial C4b-binding protein deficiency. *Blood.* 1990;76(12):2527-9.
38. Mulder R, de Vries JK, Müskens RPHM, Mulder AB, Lukens MV. High protein S activity due to C4b-binding protein deficiency in a 34-year-old Surinamese female with ischemic retinopathy. *Clin. Case. Rep.* 2018;6(5):935-8.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Binding characteristics of anti-PS sdAb PS003. **A)** A sandwich ELISA was used to measure the binding of rhPS and plasma-derived human PS (pdhPS) to immobilized PS003 (10 µg/mL). **B)** The binding of PS003 to immobilized various vitamin K-dependent proteins (FIX, FX, protein Z) and rhPS was assessed in a direct ELISA, and was compared to that of respective control polyclonal antibodies directed against FIX, FX and protein Z.

Figure 2: Effects of the anti-PS sdAbs PS003 and PS003biv on the APC-cofactor activity of rhPS in an APTT-based plasma clotting assay. **A)** APC together with bovine FVa and APTT reagent were added to a PS-deficient plasma supplemented with TBS, a control monovalent sdAb (Ctl-Mono), PS003, a control bivalent sdAb (Ctl-Biv), and PS003biv, in the absence of recombinant human PS (rhPS). After a 2-min incubation at 37°C, CaCl₂ was added, and clotting times were measured. In addition, APC together with bovine FVa and APTT reagent were added to a PS-deficient plasma supplemented with rhPS pre-incubated for 15 min at room temperature with TBS, Ctl-Mono, PS003, Ctl-Biv, and PS003biv. After a 2-min incubation at 37°C, CaCl₂ was added, and clotting times were measured. The final concentrations of rhPS and sdAbs in the clotting assay were 6 nM and 2 µM, respectively. Three individual experiments were done in triplicate. **B)** For each experiment, a ratio of the clotting times in the presence of rhPS (t_{+PS}) to the clotting times in the absence of rhPS (t_{-PS}) was calculated for TBS or for each sdAb. The results were expressed as mean \pm standard deviation. Ordinary One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison tests were used as statistical test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 3: A) Epitope mapping and specificity of PS003biv for PS. In a direct ELISA, recombinant human PS (rhPS), a recombinant form of the isolated SHBG-like domain of PS (rhSHBG), recombinant human Gas6 (rhGas6) and BSA were immobilized (10 µg/mL) and the binding of PS003biv (0.5 nM) was detected with peroxidase-conjugated anti HA-antibodies. Three individual experiments were done in triplicate. For each experiment, the results were expressed as percentages of the

absorbance measured on rhPS. **B) Effect of PS003biv on the binding of rhPS to immobilized C4BP.** Human C4BP was immobilized (10 µg/mL), and the binding of rhPS (2 nM) pre-incubated for 15 min at room temperature with buffer, PS003biv (2 µM), a bivalent control sdAb (Ctl-Biv, 2 µM), a blocking polyclonal rabbit anti-PS antibody (Anti-PS pAb, 0.5 µM) or control rabbit IgG (0.5 µM) was detected with peroxidase-conjugated polyclonal anti-PS antibodies. Three individual experiments were done in triplicate. For each experiment, the results were expressed as percentages of the absorbance measured when rhPS was pre-incubated with buffer. One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison tests were used as statistical test. *** $p < 0.001$.

Figure 4: Effect of PS003biv on the TFPI α -cofactor activity of PS in the inhibition of FXa. Recombinant human PS (rhPS, 10 nM) was pre-incubated for 15 min at room temperature with PS003biv (10 µM). The ability of the rhPS+PS003biv mixture to enhance the inhibition rate of the amidolytic activity of plasma-derived human FXa (0.2 nM) by recombinant human full-length TFPI α (5 nM) was measured in the presence of phospholipid vesicles (25 µM) and Ca²⁺ ions. To assess the specificity of this assay for PS, rhPS was also pre-incubated for 15 min at room temperature with a blocking polyclonal rabbit anti-PS antibody (Anti-PS pAb, 0.5 µM) or a control rabbit IgG (Rabbit IgG, 0.5 µM). Three individual experiments were done in triplicate, and the figure is representative of one experiment.

Figure 5: Antithrombotic effects of anti-PS sdAb PS003biv in a FeCl₃-induced thrombosis model. C57/BL6 mice (4-5 weeks old) were anesthetized and intravenously injected with PS003biv or a control bivalent sdAb (10 mg/kg), together with Rhodamine 6G (3.3 mg/kg). A group of mice were intravenously injected with Rhodamine 6G only and were used as control mice (Ctl). Another group of mice were subcutaneously injected with low-molecular-weight-heparin (LMWH) (200 UI/kg) and intravenously injected with Rhodamine 6G to ensure that this model was sensitive to pharmacological inhibition of coagulation. After 10 min, 10 % FeCl₃ was applied on mesenteric vessels and real-time imaging of thrombus formation was analyzed by intravital microscopy. For each mouse, the occlusion times in one venule and one arteriole were measured. Kruskal-Wallis test and Dunn's test were used as statistical

analysis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 6: Effect of PS003biv on physiological hemostasis in a mouse tail-clip bleeding model. Anesthetized C57/BL6 mice (10 weeks old) were intravenously injected with PS003biv (10 mg/kg) or subcutaneously injected with low-molecular-weight-heparin (LMWH, 200 UI/kg). Mice not injected were used as control mice (Ctl). Tails were immersed for 10 min in a saline solution kept at 37°C, and 3 mm from the tip of the tail was cut and immediately immersed into the saline solution. Bleeding time was defined as the first cessation of bleeding. Blood was also collected during 20 min and total blood loss volumes were quantified by measuring the optical density of hemoglobin at 416 nm. One-way ANOVA was used as statistical test of variance with Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.05$.

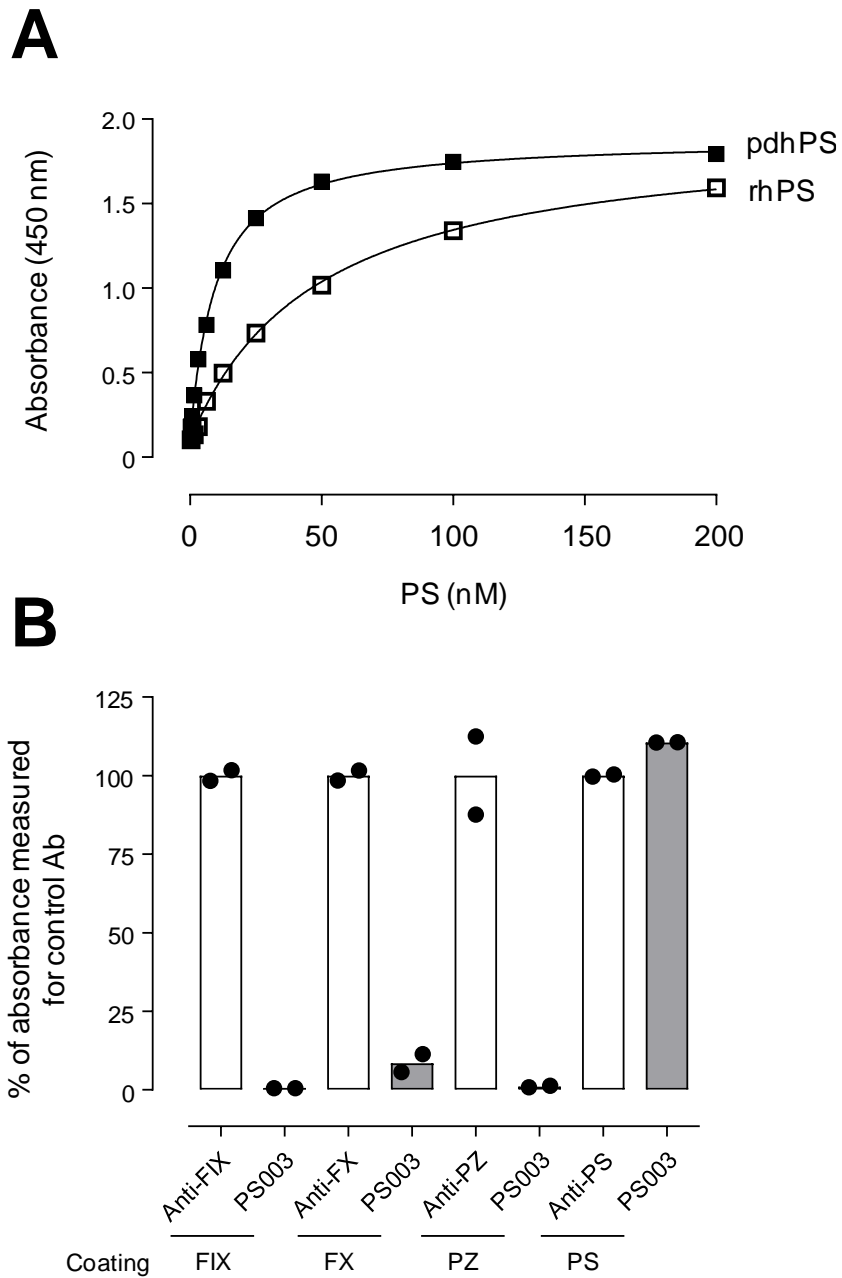
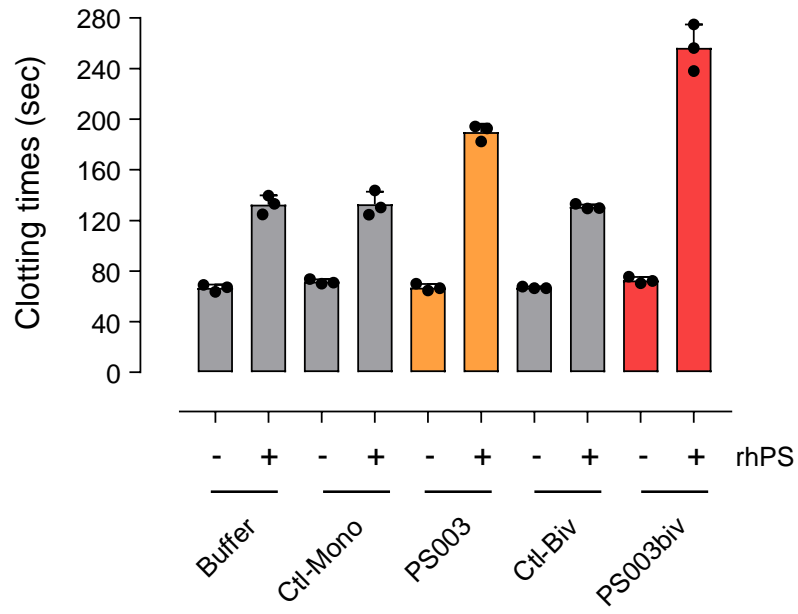
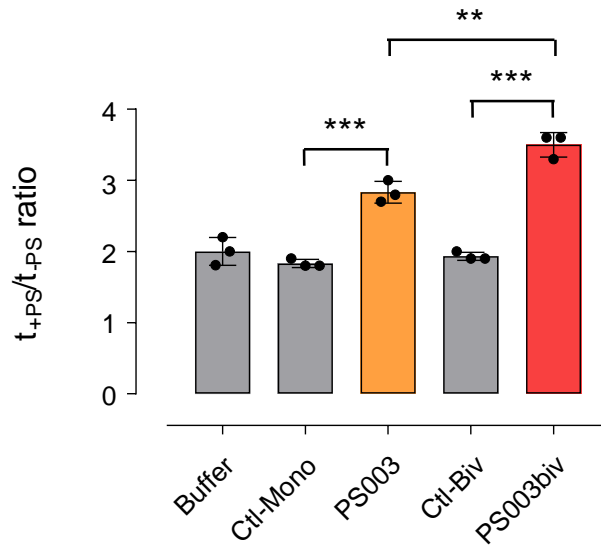
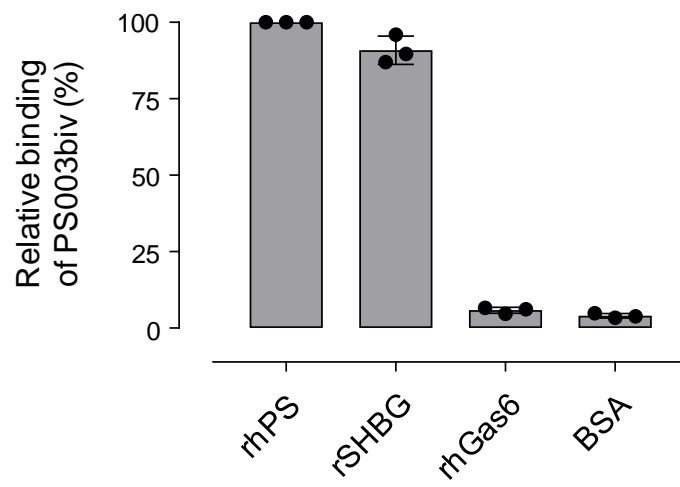
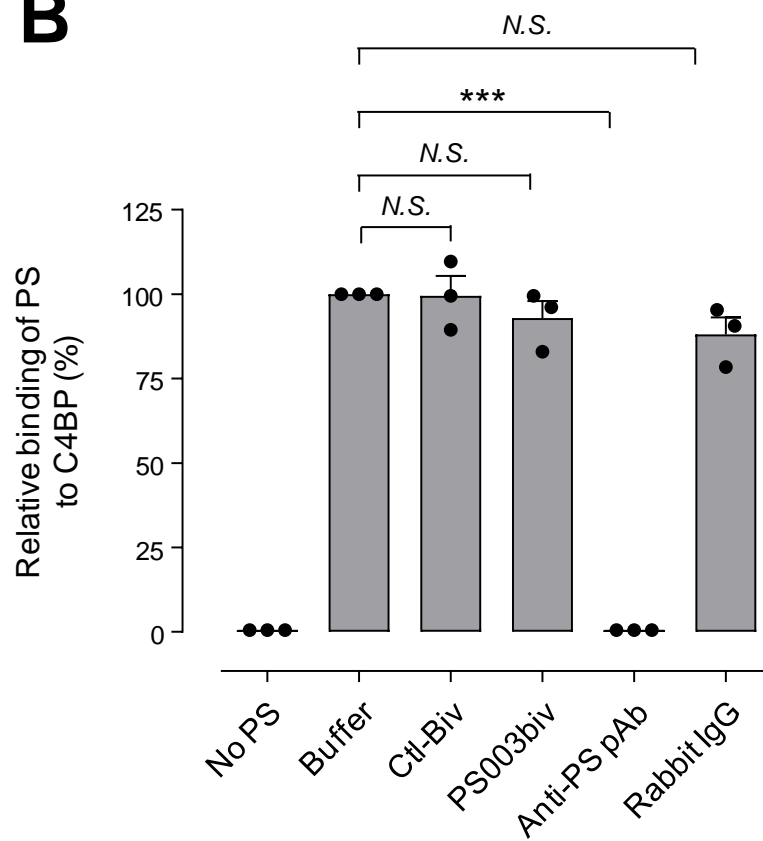


Figure 1

A**B****Figure 2**

A**B****Figure 3**

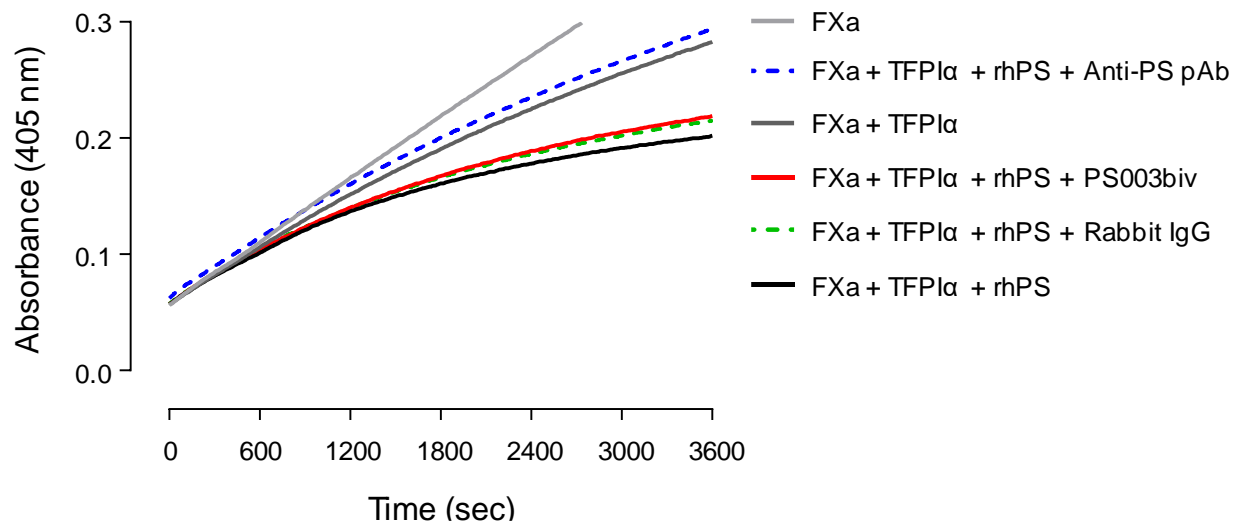


Figure 4

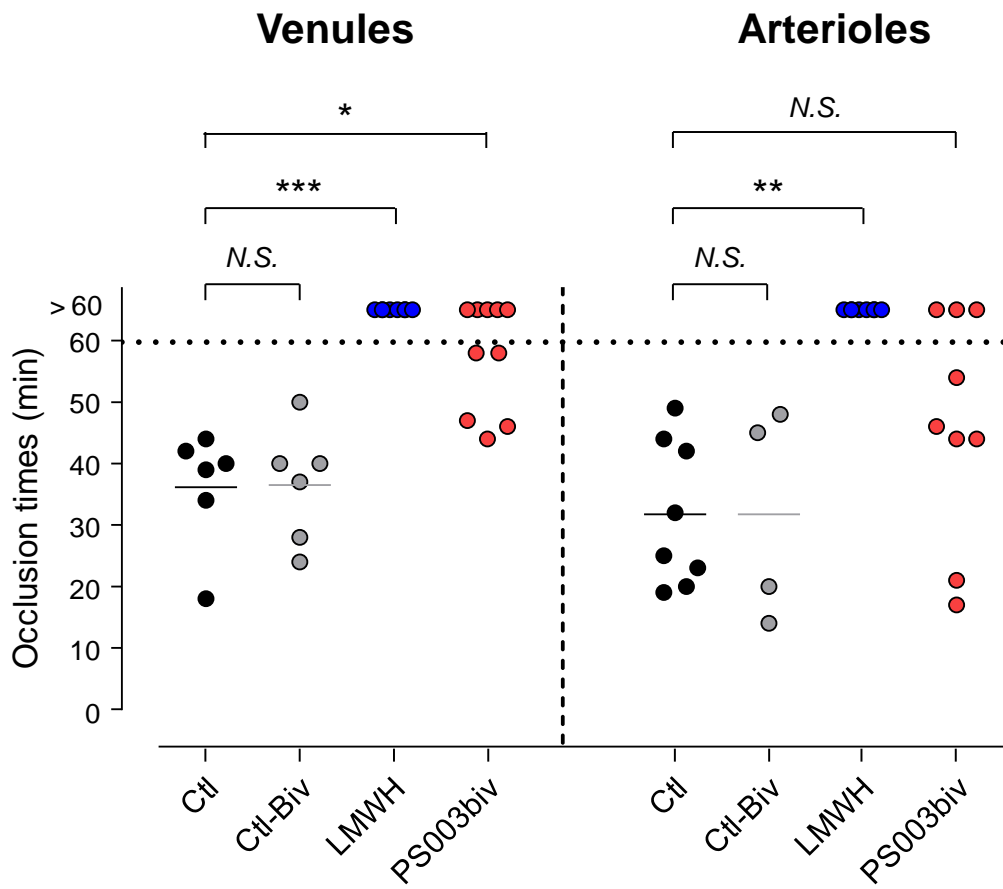


Figure 5

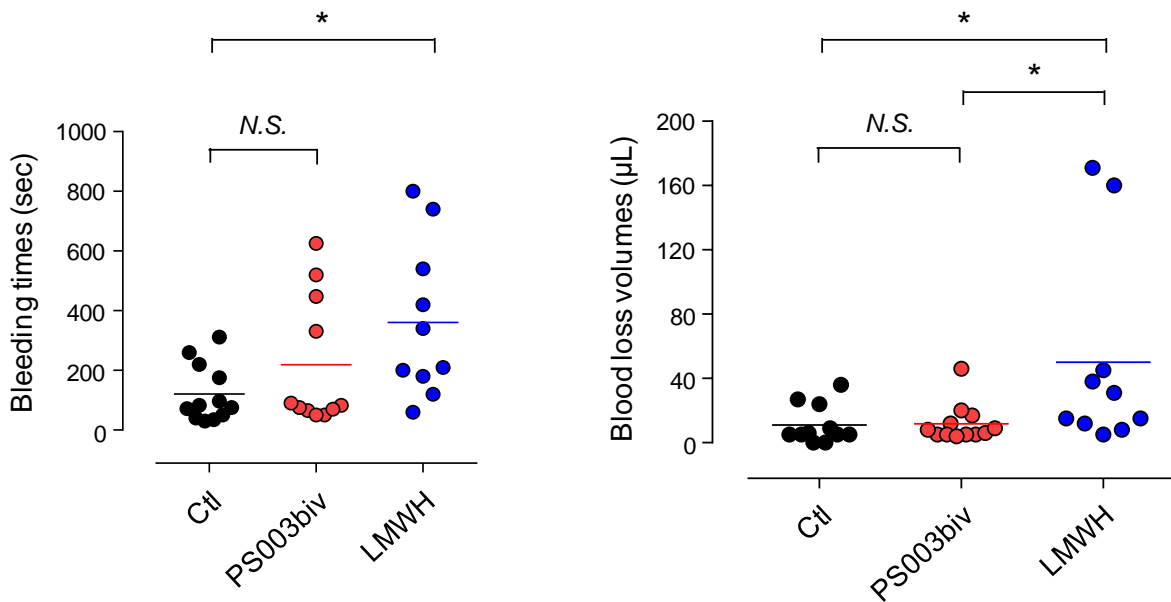


Figure 6

SUPPLEMENTARY FIGURES

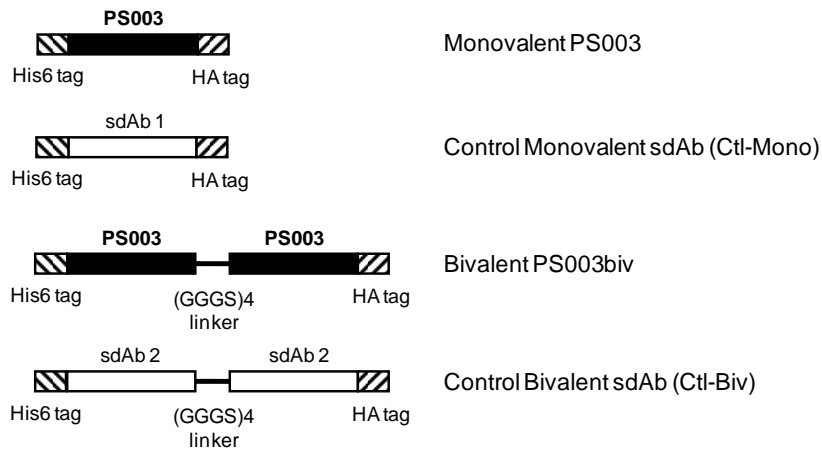
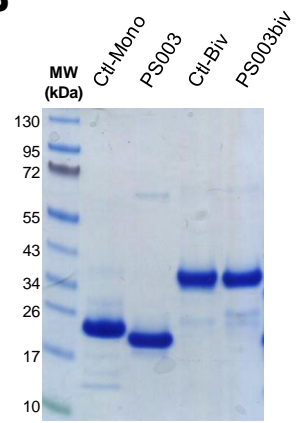
Supplementary Figure 1: PS003, PS003biv and control sdAbs. A) The cDNA sequences of monovalent and bivalent sdAbs were cloned into pET28-plasmid in which the sdAbs are flanked by an N-terminal His6 tag and a C-terminal HA tag. Bivalent sdAbs are composed of two sequences of a sdAb of interest separated by a flexible (GGGS)₄ linker. **B)** SdAbs were purified to homogeneity through Protein A affinity chromatography, as assessed by polyacrylamide gel electrophoresis (NuPAGE 4-12%, Invitrogen) and Coomassie staining.

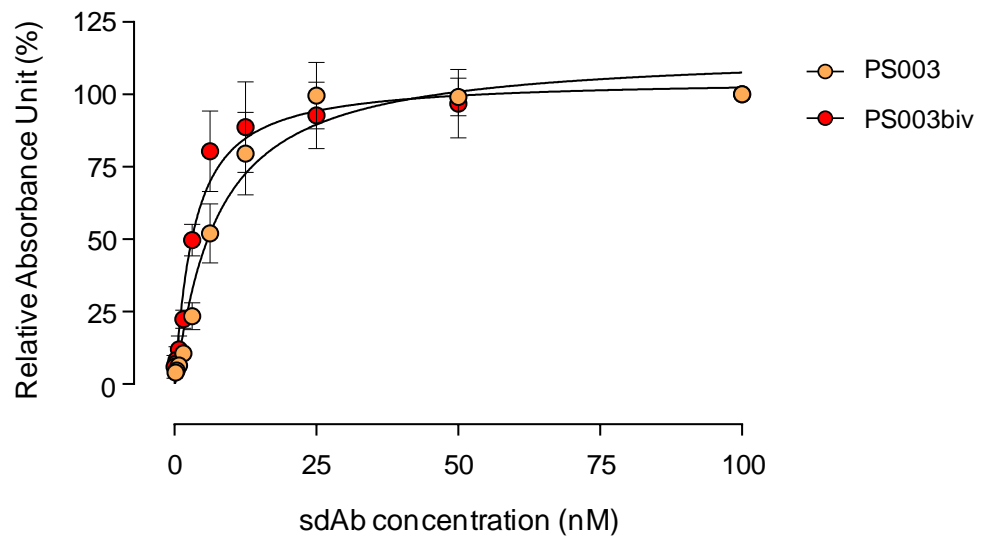
Supplementary Figure 2: Binding of PS003 and PS003biv to recombinant human PS (rhPS) in direct ELISA. A direct ELISA was used to measure the binding of purified PS003 and PS003biv (0-100 nM) to immobilized recombinant human PS (rhPS, 2.5 µg/mL). Three individual experiments were done in triplicate and for each experiment the results were expressed as the percentage of maximal absorbance at 450 nm.

Supplementary Figure 3: APC-cofactor activity of PS in an APTT-based plasma clotting assay. A PS-deficient plasma was supplemented or not with recombinant human PS (rhPS), APC, FVa and an APTT reagent. After a 2-min incubation at 37°C, CaCl₂ was added, and clotting times were measured. **A)** In this assay, rhPS dose-dependently prolonged the clotting times of a PS-deficient plasma measured in the presence of a fixed concentration of APC. **B)** In the present study, an intermediate final concentration of rPS (6 nM) was chosen to be able to detect any modulatory effects of anti-PS sdAbs. The results were expressed as a ratio between the clotting times in the presence of rhPS+APC (t_{+PS}) and the clotting times in the presence of APC alone (t_{-PS}). This ratio t_{+PS}/t_{-PS} reflected the APC-cofactor activity of rhPS in this assay and was ~ 2. Under these conditions, rhPS did not prolong the clotting times in the absence of APC.

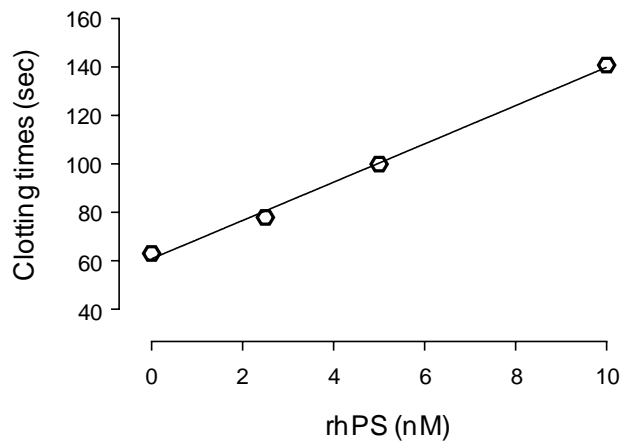
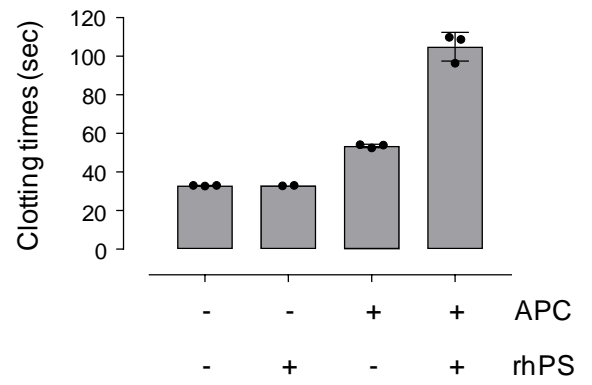
Supplementary Figure 4: TFPI α -cofactor activity of rhPS in a FXa inhibition assay. The amidolytic activity of plasma-derived human FXa (0.2 nM) was inhibited by recombinant human TFPI α (5 nM) in the presence of phospholipid vesicles (25 μ M), Ca²⁺ ions and increasing concentrations of rhPS (5-40 nM). Progress curves showed that rhPS dose-dependently enhanced the inhibition of FXa by TFPI α (**A**). For each rhPS concentration, the apparent rate constant (k_{obs}) for FXa inhibition by TFPI α was estimated by fitting the progress curves of substrate hydrolysis to the equation for slow-binding inhibition. The results were expressed as the relative percentage of the k_{obs} estimated for 10 nM rhPS (**B**).

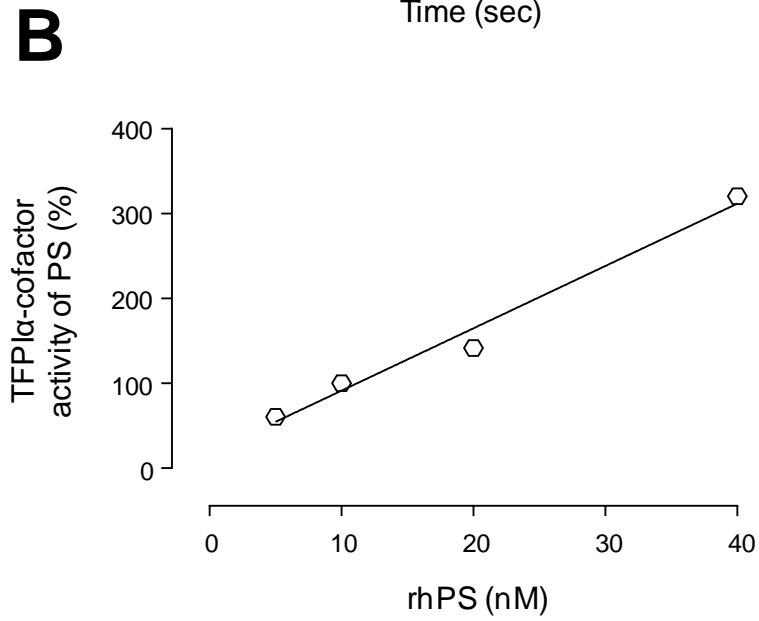
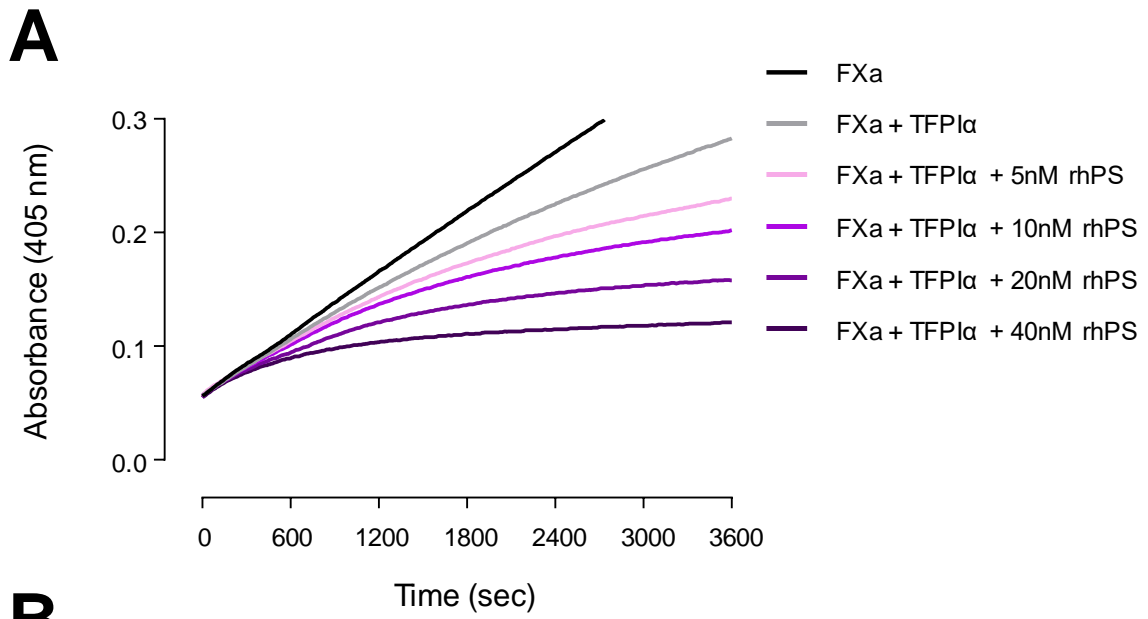
Supplementary Figure 5: Binding of PS003biv to recombinant murine PS (rmPS) in direct ELISA. The binding of PS003biv to immobilized rmPS (10 μ g/mL) was analyzed in a direct ELISA, as described for the binding of PS003biv to rhPS.

A**B****Supplementary Figure 1**

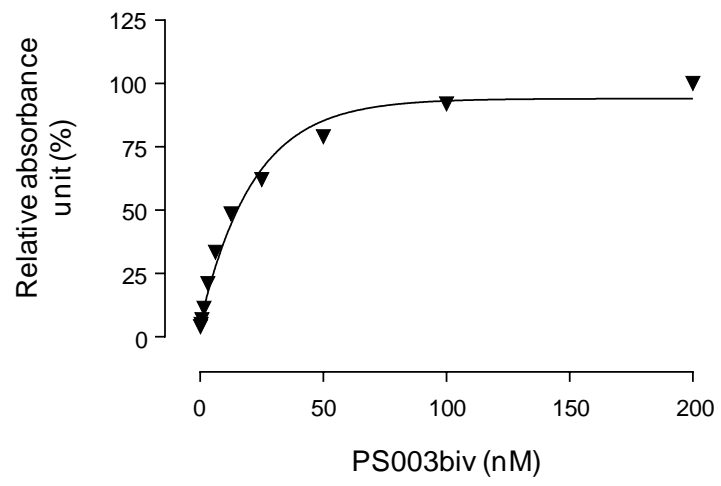


Supplementary Figure 2

A**B****Supplementary Figure 3**



Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5

DISCUSSION

Reconnaissance de la PS plasmatique par le VHH PS003

À la suite de l'identification du VHH PS003, nous avons montré que ce VHH était aussi capable de reconnaître la PS humaine d'origine plasmatique, et non pas seulement de la PS recombinante humaine (rhPS) (**Figure 1B de l'article**). Ceci était important car le lama avait été immunisé avec de la rhPS, et notre banque immune avait aussi été sélectionnée sur de la rhPS. Les résultats de notre test de liaison en ELISA semblent même montrer que le VHH PS003 se lie à la PS plasmatique purifiée avec une meilleure affinité, même si ce résultat serait à confirmer. La reconnaissance par le VHH PS003 de la PS d'origine plasmatique concorde avec l'observation que ce VHH présente un effet fonctionnel dans notre test plasmatique.

Bivalentisation du VHH PS003

Dans certains cas, la multivalentisation d'un VHH est connue pour entraîner une augmentation de l'affinité du VHH pour sa cible, principalement par augmentation de l'avidité. Parfois, cette multivalentisation peut également conduire à une augmentation des effets fonctionnels du VHH. Ainsi, une construction bivalente de PS003 a été réalisée (PS003biv), pour potentiellement augmenter son affinité pour la PS et/ou son effet de potentialisation sur la PS. Les résultats ont montré que le VHH bivalent PS003biv exerce une potentialisation de l'activité cofacteur de la PCa de la PS encore plus forte que le VHH monovalent PS003. Pourtant, son affinité pour la rhPS ($K_D \sim 13.8 \pm 5.7$ nM) n'est que modestement augmentée, comparativement à la forme monovalente ($K_D \sim 26.8 \pm 2.7$ nM) dans notre test de liaison. La méthode utilisée pour évaluer l'affinité des VHHs PS003 et PS003biv a été publiée pour des anticorps monoclonaux, et l'affinité estimée par cette méthode se rapproche de l'affinité mesurée en résonance plasmonique de surface (SPR). Toutefois, il pourrait être intéressant de mesurer l'affinité des VHHs PS003 et PS003biv pour la PS, en SPR. Ceci nous permettrait

d'évaluer le gain d'affinité/avidité obtenu en bivalentisant le VHH PS003. L'effet de la bivalentisation de PS003 est également visible sur son effet fonctionnel. En effet, le VHH PS003biv potentialise encore plus l'activité cofacteur de la PCa de la PS, dans notre test de coagulation plasmatique (**Figures 2A et 2B de l'article**). Afin de limiter le nombre de souris qui seront utilisées dans nos modèles animaux de thrombose et de saignement, nous avons choisi de nous focaliser sur la caractérisation de ce VHH bivalent.

Reconnaissance par le VHH PS003biv d'un épitope localisé dans le domaine SHBG

Même si, expérimentalement, nous n'avons pas localisé de façon précise l'épitope du VHH PS003/PS003biv, nous avons montré que cet épitope était contenu dans le domaine SHBG de la PS (**Figure 3A de l'article**). Cependant, cet épitope n'est vraisemblablement pas localisé dans la région nécessaire pour l'interaction entre la PS et la C4BP, puisque le VHH PS00biv n'empêche pas la liaison de la rhPS sur de la C4BP immobilisée sur une plaque ELISA (**Figure 3B de l'article**). De plus, étant donné que les VHHs PS003/PS003biv n'interfèrent pas avec l'activité cofacteur du TFPI α de la rhPS, il est peu probable que ceux-ci soient dirigés contre la zone d'interaction du TFPI α sur la PS. Toutefois, il n'est pas encore possible de connaître avec précision les résidus contenus dans le domaine LG1 du SHBG et qui sont impliqués dans l'interaction de la PS avec le TFPI α . Le VHH PS003biv reconnaît également la PS murine recombinante (**Figure Supplémentaire 5 de l'article**), mais ne reconnaît pas la protéine Gas6 humaine (**Figure 3A de l'article**). Ainsi, par des analyses *in silico*, il pourrait être envisageable de prédire de potentielles zones d'interaction entre la PS et les VHHs PS003 et PS003biv. Pour cela, nous pourrions comparer les résidus qui sont conservés entre la PS humaine et murine, mais qui sont différents sur Gas6, et exclure les résidus qui ont été impliqués dans les interactions avec la C4BP ou le TFPI α . Des mutants de PS au niveau de ces résidus permettraient ensuite de confirmer ces prédictions.

Mécanismes d'action potentiels du VHH PS003/PS003biv

Les résultats obtenus dans le test d'activité cofacteur de la PCa (plasmatique) suggèrent que les VHHs PS003 et PS003biv potentialisent spécifiquement l'activité cofacteur de la PCa de la PS. En effet, dans ce test, les VHHs n'ont que très peu d'effets sur les temps de coagulation en absence de PS (**Figure 2A de l'article**). Des variants de PS dépourvus d'activité cofacteur de la PCa (PS-E36A ou PS-D95A) pourraient être utilisés à la place de la PS pour confirmer que les VHHs PS003 et PS003biv potentialisent spécifiquement l'activité cofacteur de la PCa de la PS, et n'interfèrent pas avec une autre activité anticoagulante de la PS, dans ce test.

En particulier dans ce test, le temps de coagulation d'un plasma déficient en PS, supplémenté avec de la rhPS, de la PCa et du FVa est mesuré. Comme du FVa est ajouté, ce test mesure vraisemblablement l'inactivation du FVa par la PCa, et beaucoup moins l'inactivation du FVIIIa par la PCa. Ce test fonctionnel a également été choisi car c'est un test « global » qui, contrairement au test d'inactivation du FVa en système purifié, prend en compte de potentiels modulateurs physiologiques de l'activité cofacteur de la PS dans l'inactivation du FVa. L'absence d'effet de potentialisation du VHH PS003/PS003biv dans le test d'inactivation du FVa en système purifié (**Figure 2C de l'article**) pourrait indiquer que ce VHH interfère avec un de ces modulateurs physiologiques de l'activité cofacteur de la PS dans l'inactivation du FVa.

Le mécanisme d'action des VHHs PS003 et PS003biv reste donc inconnu. Etant donné l'absence d'effet dans l'inactivation du FVa en système purifié, nous avons néanmoins cherché à évaluer si le VHH PS003biv augmentait l'effet cofacteur de la PS dans l'inactivation du FVIIIa par la PCa. Pour cela, j'ai développé un test d'inactivation protéolytique du FVIIIa par la PCa/PS au cours de ma thèse. Ce test ne repose pas sur un test enzymatique, car l'inactivation du FVIIIa par la PCa dans ce genre de tests enzymatiques est particulièrement difficile, mais repose sur une évaluation en Western Blot des fragments de FVIIIa générés par la PCa, en présence de rhPS. Les données

préliminaires obtenues (**Figure 30**) suggèrent que le VHH PS003biv ne potentialise pas non plus l'inactivation protéolytique du FVIIIa par la PCa.

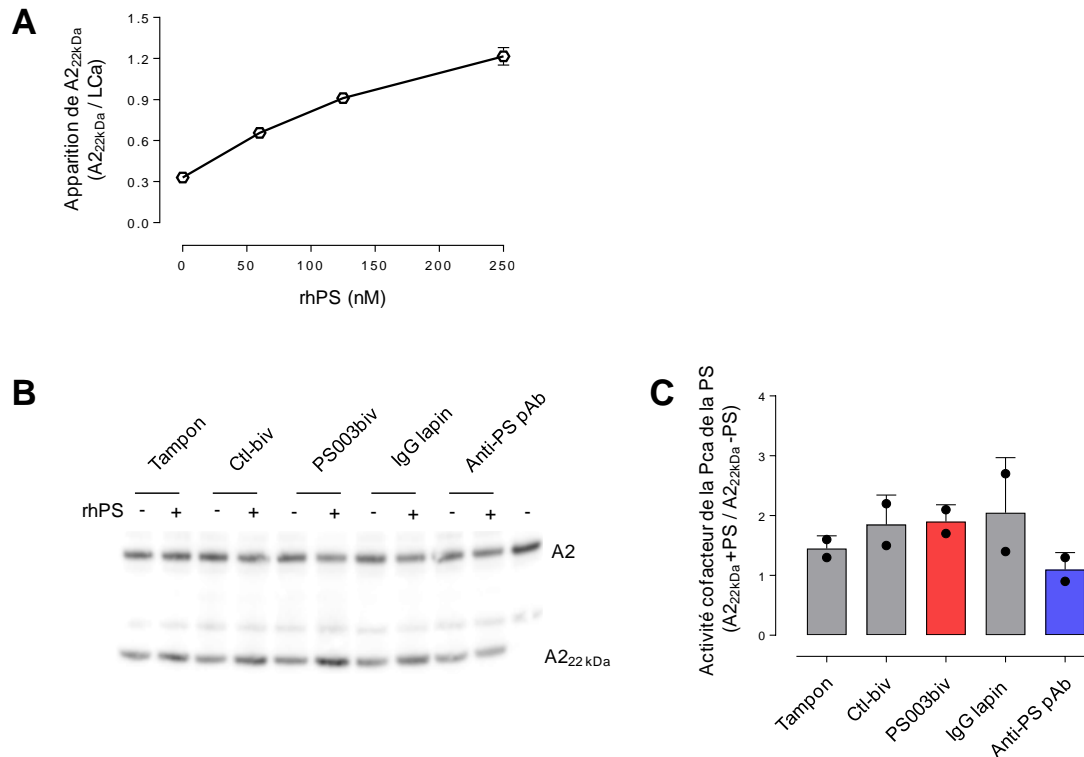


Figure 30 : Effet des VHHs sur l'activité cofacteur de la PCa de la PS lors du clivage du FVIIIa en système purifié. (A) Le clivage du FVIIIa (200 nM) par la PCa (80 nM) a été réalisé en présence de diverses concentrations de rhPS (0-250 nM) et de 100 μ M de vésicules de phospholipides PC/PE/PS. Les protéines ont été visualisées sur un gel SDS-PAGE après une coloration fluorescente (SYPRO™ Ruby). La quantification des bandes a été réalisée avec le logiciel ImageJ et la chaîne légère du FVIIIa (LCa) a été utilisée comme contrôle de charge pour la normalisation de l'apparition du fragment A2_{22kDa}. **(B) & (C)** Pour identifier l'effet de VHHs sur le clivage du FVIIIa, les VHHs ont d'abord été pré-incubés pendant 15 min avec la rhPS seule. L'anticorps polyclonal bloquant anti-PS (Anti-PS pAb) et l'anticorps contrôle (IgG lapin) ont également été incubé avec la rhPS pour évaluer leur effet sur la rhPS. Ensuite, les complexes PS/VHHs (3,5 μ M final pour les VHHs) et PS/anticorps (260 nM final pour les anticorps) ont été utilisés pour le clivage du FVIIIa selon les mêmes conditions que décrites plus haut. Deux expériences indépendantes ont été réalisées en simplicate et environ 230 μ g de FVIIIa clivé ont été migré sur un gel SDS-PAGE de 4-12%, puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. Un anticorps thérapeutique humain anti-FVIII (BOIIB2) a été utilisé pour identifier la chaîne A2 et les fragments résultants du clivage du FVIIIa. La quantification des bandes a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ. Le ratio de la quantification de la bande A2 à 22kDa (A2_{22kDa}) en présence de PS et A2_{22kDa} en absence de PS (A2_{22kDa} +PS/A2_{22kDa} -PS) a été définie comme étant l'activité cofacteur de la PCa de la PS.

Ces derniers résultats doivent toutefois être interprétés avec précaution. En effet, physiologiquement, le clivage du FVIIIa par la PCa fait également intervenir le FV. Ainsi, l'absence de ce cofacteur synergique de la PS ne permet pas d'explorer toutes les interactions protéines/protéines mises en jeu, et potentiellement modifiées par la présence du VHH PS003biv. Un test d'inactivation du FVIIIa par la PCa/PS, en présence de FV, reste néanmoins un test très difficile à mettre au point expérimentalement.

Les VHHs PS003 et PS003biv pourraient avoir une action sur l'effet protecteur du FXa envers le FVa, en augmentant la levée de l'effet protecteur du FXa par la PS. De façon similaire au FXa, la prothrombine exerce également un effet protecteur sur le clivage du FVa. Néanmoins dans ce cas-ci, la PS ne semble pas lever l'effet de protection de la prothrombine, mais au contraire apparait augmenter cet effet. Le mécanisme d'action de ces effets de la PS n'a cependant pas été décrit, et à l'heure actuelle, aucune interaction entre la PS et la prothrombine n'a été décrite. Toutefois, il est possible de proposer que le VHH PS003 et PS003biv inhibe cet effet synergique entre la PS et la prothrombine, avec comme conséquence fonctionnelle une potentialisation de l'inactivation du FVa par la PCa. Ces hypothèses pourraient être testées dans le futur, mais il nous faudra pour cela développer des tests en système purifiés qui peuvent s'avérer complexes.

La PS interagissant avec un nombre varié de partenaires autres que la PCa et le FVa (comme le FV, le FXa, le FVIIIa ou le FIXa), une approche pourrait consister à tester l'effet des VHHs PS003 et PS003biv sur l'interaction de la PS avec chacun de ces partenaires. De façon intéressante, certaines de ces interactions (avec le FV, le FXa, le FVIIIa) peuvent être mesurées dans des tests de liaison directe, notamment en ELISA, et ceci pourrait être testé relativement facilement.

D'autres hypothèses sont envisageables pour expliquer le mécanisme d'action des VHHs PS003 et PS003biv. Ainsi, la liaison des VHHs PS003 ou PS003biv au niveau du domaine SHBG de la PS pourrait entraîner un changement de conformation sur la PS, favorisant ainsi son activité cofacteur sur la PCa. En particulier, une telle liaison

pourrait induire un changement conformationnel au niveau de domaines de la PS importants pour son activité cofacteur de la PCa. Des mécanismes similaires ont effectivement été décrits et seraient envisageables dans le cas de nos VHHs. En effet, la mutation d'un résidu normalement β -hydroxylé dans l'EGF4 de la PS (Asn217Ser) cause un changement conformationnel dans l'EGF1, comme démontré par une perte d'interaction avec les ions Ca^{2+} (31). Ce résultat suggère qu'une modification sur une région donnée de la PS pourrait avoir des répercussions à distance sur une autre région de la PS, et met également l'accent sur le fait que la PS serait une protéine flexible et relativement sensible d'un point de vue conformationnel. Toutefois, les changements conformationnels possiblement induits par la liaison de PS003/PS003biv n'affecteraient pas la capacité de la PS à interagir avec la PCa ou le FVa, puisque les VHHs n'augmentent pas l'activité cofacteur de la PS dans l'inactivation du FVa. Ces changements conformationnels affecteraient ainsi plutôt l'interaction de la PS avec un autre partenaire.

La majorité de la PS plasmatique circule sous forme complexée à la C4BP (~ 60 %). De façon intéressante, c'est le domaine SHBG de la PS qui permet son interaction avec la C4BP. Etant donné que les VHHs PS003 et PS003biv interagissent également avec la PS via son domaine SHBG, il était possible de suggérer que les VHHs PS003 et PS003biv se lient au niveau du site d'interaction de la PS avec la C4BP. Ainsi, ces VHHs auraient pu dissocier le complexe PS/C4BP et avoir un effet de potentialisation en augmentant la quantité de PS libre dans notre test plasmatique. Néanmoins, nos résultats montrent que les VHHs PS003 et PS003biv (**Figure 3B de l'article**) n'inhibent pas l'interaction de la rhPS sur de la C4BP immobilisée, en ELISA. De plus, le fait que le VHH PS003biv exerce un effet antithrombotique *in vivo* chez la souris conforte la notion que ce VHH n'agit probablement pas en dissociant le complexe PS/C4BP, puisque chez la souris, la PS ne forme pas de complexe avec la C4BP et ne circule que sous forme libre. Les VHHs pourraient cependant agir en augmentant le pool de PS libre active par un autre mécanisme. Même si ceci est controversé, des formes multimériques de PS pourraient circuler dans le plasma, et ces formes multi-

mériques se forment par l'intermédiaire d'interactions intermoléculaires au niveau du domaine SHBG. Ainsi, les VHHs pourraient dissocier ces formes multimériques de PS, ce qui résulterait en une augmentation des taux de PS non multimérique et active en tant que cofacteur de la PCa.

Effet antithrombotique de PS003biv *in vivo* chez la souris

Étant donné que les VHHs PS003 et PS003biv augmentent l'une des activités anticoagulantes de la PS, à savoir son activité de cofacteur de la PCa, le potentiel effet antithrombotique de cette augmentation a été évalué chez la souris, dans un modèle de thrombose induite au FeCl₃. Dans ce modèle, seul le VHH sous forme bivalente (PS003biv) a été évalué en raison de son effet de potentialisation plus fort que celui de la forme monovalente (PS003). Dans ce modèle, le VHH PS003biv exerce effectivement un effet antithrombotique, comme démontré par un allongement des temps d'occlusion au niveau de microvaisseaux du mésentère, et particulièrement dans les veinules (**Figure 5 de l'article**). D'autres modèles de thrombose pourraient être utilisés pour confirmer cet effet du VHH PS003biv. Par exemple un modèle de thrombose induite par un laser au niveau des microvaisseaux du crémaster, toujours en microscopie intravitale. Dans ce modèle, il est possible de suivre l'accumulation de plaquettes, mais également de fibrine. Dans le modèle de thrombose induite au FeCl₃ utilisé dans notre étude, seule l'accumulation des plaquettes est détectée, même si celle-ci est vraisemblablement dépendante de la coagulation et de la génération de thrombine au niveau du thrombus en croissance (**Figure 5B de l'article**).

De façon intéressante, le fait que PS003biv exerce un effet antithrombotique *in vivo*, chez la souris, suggère que la potentialisation de l'activité anticoagulante de la PCa est associée à des effets antithrombotiques, ce qui concorde avec certaines études de la littérature. En effet, l'administration de PS bovine (0.1 mg/kg ou 0.5 mg/kg) en combinaison avec de la PCa bovine (0.1 mg/kg) permet de diminuer la formation de thrombus, dans un modèle de thrombose chez le lapin (348,349). L'administration de la même faible dose de PCa bovine seule (0.1 mg/kg) n'est asso-

ciée qu'à de faibles effets antithrombotiques, démontrant que la PS est un déterminant très important de l'activité anticoagulante de la PCa *in vivo*. L'administration de PS bovine seule n'exerce aucun effet antithrombotique, de même que la co-administration de PCa bovine et de PS clivée par la thrombine (349). De façon rassurante, ces effets n'ont pas été associés à un risque hémorragique (348,349).

Ces effets antithrombotiques de la potentialisation de l'activité anticoagulante de la PCa par la PS ont été obtenus avec de la PS et de la PCa exogènes. En revanche, notre étude est la première à montrer que stimuler l'activité anticoagulante de la PCa endogène par un agent pharmacologique, et de façon dépendante de la PS, est associé à des effets antithrombotiques *in vivo*. De plus, notre approche originale est différente d'une approche qui consiste à augmenter l'activité anticoagulante de la PCa en augmentant son activation (350,351). Dans cette approche, un variant de thrombine dépourvu d'activité procoagulante (thrombine WE ou AB002) a été développé et permet d'activer la PC en PCa à la surface du thrombus, potentialisant ainsi l'activité anticoagulante de la PCa au niveau du thrombus en croissance. Cette activation très locale de la PC en PCa permet à la PCa d'exercer ses activités anticoagulantes au niveau du thrombus en croissance, et empêche la dissémination systémique de la PCa. Par conséquent, l'administration de cet agent (AB002) a démontré des effets antithrombotiques dans un modèle de thrombose chez le babouin (350,351), sans risque hémorragique.

L'administration de PS003biv n'est pas associée à un risque hémorragique *in vivo*

L'administration du VHH PS003biv n'affecte pas l'hémostase physiologique lorsqu'il est évalué dans un modèle de temps de saignement chez la souris (**Figure 6 de l'article**). Comme mentionné dans les études précédentes, l'administration de PCa et de PS bovines chez le lapin, ou l'activation de la PC en PCa avec l'agent pharmacologique AB002 chez le babouin, ne sont pas associées à un risque hémorragique (348,349). Dans ces études, la potentialisation de l'activité anticoagulante de la PCa

est soit dépendante de la PS, soit causée par une augmentation de son activation. Il a été proposé que l'action de la PCa serait localisée au niveau du thrombus en croissance, par l'intermédiaire de la PS ou de l'activateur AB002. Au contraire, l'administration systémique de PCa ou bien son activation systémique chez un patient présentant des taux plasmatiques élevés de TM soluble majorent ce risque de saignements (352).

De la même façon, notre VHH PS003biv ne semble pas avoir d'effet sur l'activité anticoagulante de la PCa en absence de PS. Ainsi, ce VHH fonctionnerait aux endroits où la PS et la PCa interagissent ensemble, comme c'est probablement le cas à la surface des plaquettes ou des cellules endothéliales activées. Dans ce scénario, la PS permettrait à nouveau de localiser l'action pharmacologique anticoagulante du VHH PS003biv, expliquant pourquoi l'administration de PS003biv n'est pas associée à une majoration des saignements.

Chez l'homme, il est difficile de prévoir si la potentialisation de l'activité cofacteur de la PCa de la PS sera associée à une augmentation du risque hémorragique. Toutefois, l'élévation des taux de PS plasmatique libre d'un facteur 3-4, comme il est observé chez des patients atteints d'un déficit en C4BP, ne semble pas être associé à des complications hémorragiques, bien que cette PS « supplémentaire » puisse potentiellement augmenter l'activité anticoagulante de la PCa (353).

Potentiel thérapeutique de PS003biv

Les travaux de recherche réalisés au cours de ma thèse indiquent que le VHH PS003biv pourrait représenter un traitement antithrombotique intéressant et supérieur aux traitements actuellement disponibles, puisqu'il ne semble pas causer de saignements anormaux. En particulier, ce VHH pourrait avoir un intérêt thérapeutique dans des pathologies dans lesquelles des défauts du système de la PCa et de la PS sont observés. C'est notamment le cas de la drépanocytose, qui est souvent associée à un déficit combiné (et complexe) en PS et en PC, et une résistance à la PCa (354–357). Ces défauts pourraient majorer le risque thrombotique chez les patients drépa-

nocytaires, mais pourraient aussi être impliqués dans le développement des crises vaso-occlusives dans la drépanocytose. En effet, il a été proposé que la thrombine pourrait jouer un rôle majeur dans le développement des crises vaso-occlusives, par sa capacité à activer l'endothélium vasculaire et à stimuler l'adhérence de globules rouges falciformes et de polynucléaires neutrophiles (358). De façon intéressante, l'inhibition du FT ou l'inhibition pharmacologique de PAR-1, le récepteur principal de la thrombine, atténuent les phénomènes de stase micro-vasculaire, dans un modèle murin de crises vaso-occlusives (358). Les auteurs ont ainsi suggéré qu'un traitement anticoagulant en prophylaxie pourrait atténuer l'incidence des crises vaso-occlusives. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'augmentation de l'activité anticoagulante de la PCa chez les patients drépanocytaires, par l'usage du VHH PS003biv, pourrait constituer une stratégie intéressante pour limiter le nombre ou la durée des événements vaso-occlusifs.

Dans le futur, des études supplémentaires seront clairement requises pour mieux comprendre le mécanisme d'action des VHHs PS003 et PS003biv, et pour tenter de définir dans quelles situations pathologiques pourrait être utilisés ces VHHs. Également, un travail approfondi sur les propriétés pharmacologiques des VHHs PS003 et PS003biv devra être réalisé si des applications thérapeutiques sont envisagées, notamment pour allonger la demi-vie de ces VHHs, par leur couplage au fragment Fc des immunoglobulines ou à un VHH reconnaissant l'albumine.

Perspectives : Identification de VHHs ciblant spécifiquement l'activité cofacteur du TFPI α de la PS

Au cours de ma thèse, j'ai également tenté de mettre en place une stratégie de sélection plus ciblée pour trouver des VHHs inhibiteurs spécifiques de chacune des activités de la PS, et notamment des inhibiteurs de l'activité cofacteur du TFPI α de la PS. Ce choix a été motivé notamment par le fait que la PS peut interagir avec le TFPI α dans des tests de liaison directe, et ne nécessite pas la présence de PLs. Au contraire, l'activité cofacteur de la PCa requiert la présence de PLs et des tests plus compliqués et moins adaptés au phage-display doivent être utilisés pour mettre en évidence cette interaction (106). De plus, des stratégies complémentaires de la nôtre sont en cours dans notre unité pour identifier des VHHs dirigés contre le TFPI α et qui inhiberaient l'interaction entre le TFPI α et la PS.

Lors du phage-display « ciblé », nous avons également choisi de sélectionner les phages sur de la PS murine immobilisée (rmPS) et non sur de la rhPS humaine. Ceci faciliterait l'identification de VHHs potentiellement exploitable dans des modèles murins. En effet, sur 6 VHHs anti-PS identifiés et testé sur la rmPS (PS003 à PS008), seuls 3 d'entre eux reconnaissent la PS d'origine murine. L'approche ciblée que nous avons choisie repose sur le principe d'éluion compétitive, qui consiste à décrocher les phages liés à la PS immobilisée avec du TFPI α et non de la trypsine. Ceci permettrait en théorie de n'éluer que les phages qui entrent en compétition avec le(s) site(s) de liaison au TFPI α sur la PS, et augmenterait les chances d'identifier des VHHs anti-PS inhibiteurs de l'interaction PS/TFPI α et ainsi de l'activité cofacteur du TFPI α de la PS (**Figure 31**).

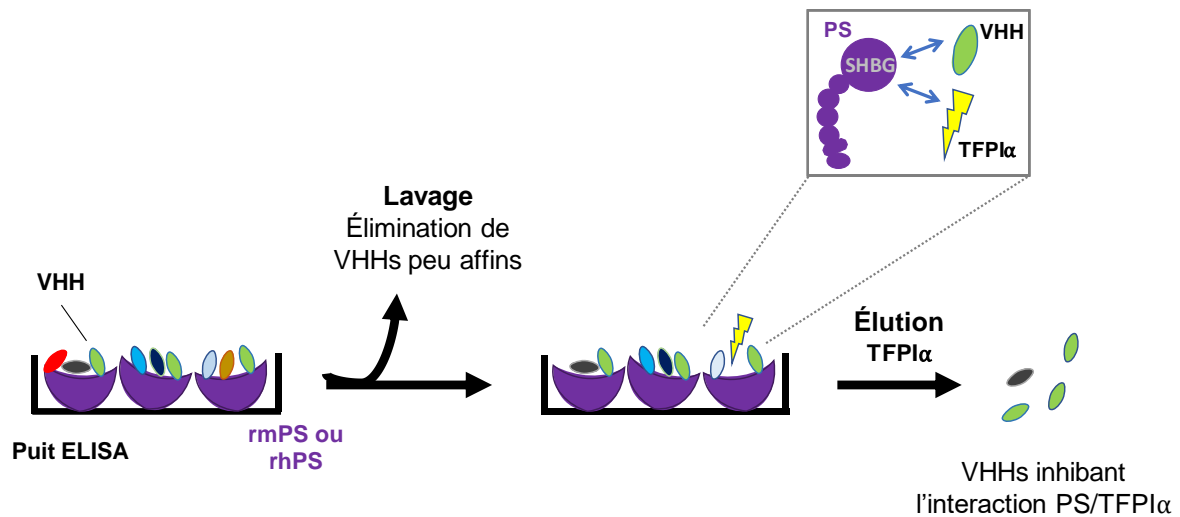


Figure 31 : Sélection ciblée de VHHs inhibant l'interaction PS/TFPI α par une élution compétitive. Lors de la sélection de VHHs anti-PS, des VHHs potentiellement inhibiteurs de l'interaction PS/TFPI α peuvent être identifiés par une élution compétitive avec du TFPI α et non avec de la trypsine. Cette approche pourrait effectivement permettre d'identifier des VHHs inhibiteurs de l'activité cofacteur du TFPI α de la PS.

Cette stratégie a effectivement été testée, avec de la PS murine recombinante immobilisée sur une plaque ELISA. Le criblage d'une centaine de clones a permis d'identifier 4 VHHs qui se liaient spécifiquement à la PS, même si relativement faiblement. Sur ces 4 VHHs, un VHH présentait une séquence tronquée et 2 autres n'ont pas pu être produits en grandes quantités. Finalement, lorsque le dernier VHH candidat a été évalué dans un test d'inactivation du FXa en présence de TFPI α et de rhPS, il n'a pas démontré d'effet modulateur de l'activité cofacteur de la PS sur le TFPI α . Pour affiner cette stratégie de criblage, nous prévoyons de réaliser une élution compétitive en utilisant cette fois-ci directement le domaine K3 du TFPI α , et non le « TFPI α entier ». Le TFPI α est en effet une protéine chargée, notamment au niveau de son extrémité C-terminale, et il est possible que l'ajout de TFPI α lors de la phase d'élution compétitive conduise à une élution de phages dépendante de la charge et non spécifique. Dans notre équipe, le domaine K3 du TFPI α humain a été exprimé et purifié à forte concentration sous la forme d'une protéine de fusion avec la protéine bactérienne MBP (maltose-binding protein). De façon intéressante, la rhPS est capable de

se lier à la protéine de fusion MBP-TFPI α -hK3, suggérant que le domaine K3 du TFPI α exprimé dans notre système est capable d'adopter une conformation qui lui permet d'interagir avec la rhPS. Cette protéine de fusion MBP-TFPI α -hK3 pourra donc être utilisée pour éluer des phages liés à de la rhPS, d'autant que des concentrations élevées de MBP-TFPI α -hK3 purifiées (de l'ordre de 10 mg/mL) peuvent être obtenues, contrairement au TFPI α .

Si ces travaux de thèse ont permis d'apporter une preuve de concept que des VHHs anti-PS modulant les activités anticoagulantes de la PS pouvaient être identifiés, ils ont aussi révélé que cette approche de génération/caractérisation de VHHs anti-PS n'était pas si simple que ça. Un travail expérimental et technique, de fond, a dû être réalisé pour mettre au point les conditions de sélection et de criblage des phages, mais également d'expression et de purification des VHHs. La purification et la caractérisation de VHHs restent des tâches relativement longues et fastidieuses, limitant ainsi l'intérêt de stratégies globales. Les approches ciblées semblent plus attrayantes car elles sont destinées à répondre à une question scientifique donnée, et des tests de criblage fonctionnels peuvent être mis en place de façon précoce pour cribler les VHHs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Jackson SP, Darbousset R, Schoenwaelder SM. Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood*. 2019;133(9):906-18.
2. Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate: A Novel Modulator of Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(6):1298-305.
3. Norström E, Escolar G. CHAPTER 36 - Natural anticoagulants and thrombophilia. In: Porwit A, McCullough J, Erber WN, éditeurs. *Blood and Bone Marrow Pathology (Second Edition)*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2011 p. 583-95.
4. Adams RLC, Bird RJ. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology*. 2009;14(5):462-70.
5. Bereczky Z, Katona Ę, Muszbek L. Fibrin Stabilization (Factor XIII), Fibrin Structure and Thrombosis. *Pathophysiol Haemos Thromb*. 2003;33(5-6):430-7.
6. Di Scipio RG, Hermodson MA, Yates SG, Davie EW. A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry*. 1977;16(4):698-706.
7. Walker FJ. Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. *J Biol Chem*. 1980;255(12):5521-4.
8. Dahlback B, Stenflo J. High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(4):2512-6.
9. Nelsestuen GL, Kisiel W, Di Scipio RG. Interaction of vitamin K dependent proteins with membranes. *Biochemistry*. 1978;17(11):2134-8.
10. Stenflo J, Jönsson M. Protein S, a new vitamin K-dependent protein from bovine plasma. *FEBS Lett*. 1979;101(2):377-81.
11. 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*. 1988;82(4):1236-43.
12. Takeyama M, Nogami K, Saenko EL, Soeda T, Nishiya K, Ogiwara K, et al. Protein S down-regulates factor Xase activity independent of activated protein C: specific binding of factor VIII(a) to protein S inhibits interactions with factor IXa. *Br J Haematol*. 2008;143(3):409-20.

13. Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J Biol Chem.* 1993;268(4):2872-7.
14. Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM, Fernandez JA, Tans G, Griffin JH. Protein S binds to and inhibits factor Xa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(7):2728-32.
15. Hackeng TM, van 't Veer C, Meijers JC, Bouma BN. Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa. *J Biol Chem.* 1994;269(33):21051-8.
16. Seré KM, Rosing J, Hackeng TM. Inhibition of thrombin generation by protein S at low procoagulant stimuli: implications for maintenance of the hemostatic balance. *Blood.* 2004;104(12):3624-30.
17. Pilli V, Plautz W, Majumder R. The Journey of Protein S from an Anticoagulant to a Signaling Molecule. *JSM Biochem Mol Biol.* 2016;3(1).
18. PROS1 - Vitamin K-dependent protein S precursor - Homo sapiens (Human) - PROS1 gene & protein [Internet]. Disponible sur: <https://www.uniprot.org/uniprot/P07225>
19. van de Poel RHL, Meijers JCM, Bouma BN. The Interaction between Anticoagulant Protein S and Complement Regulatory C4b-binding Protein (C4BP). *Trends Cardiovasc Med.* 2000;10(2):71-6.
20. Nelsestuen GL. Role of gamma-carboxyglutamic acid. An unusual protein transition required for the calcium-dependent binding of prothrombin to phospholipid. *J Biol Chem.* 1976;251(18):5648-56.
21. Nelsestuen GL. Enhancement of Vitamin-K-Dependent Protein Function by Modification of the γ -Carboxyglutamic Acid Domain: Studies of Protein C and Factor VII. *Trends Cardiovasc Med.* 1999;9(6):162-7.
22. Nelsestuen GL, Broderius M, Martin G. Role of gamma-carboxyglutamic acid. Cation specificity of prothrombin and factor X-phospholipid binding. *J Biol Chem.* 1976;251(22):6886-93.
23. Pieters M, Wolberg AS. Fibrinogen and fibrin: An illustrated review. *Res Pract Thromb Haemost.* 2019;3(2):161-72.
24. McDonald JF, Shah AM, Schwalbe RA, Kisiel W, Dahlbäck B, Nelsestuen GL. Comparison of Naturally Occurring Vitamin K-Dependent Proteins: Correlation of Amino Acid Sequences and Membrane Binding Properties Suggests a Membrane Contact Site. *Biochemistry.* 1997;36(17):5120-7.
25. Villoutreix BO, Teleman O, Dahlbäck B. A theoretical model for the Gla-TSR-EGF-1 region of the anticoagulant cofactor protein S: from biostructural pathology to species-specific cofactor activity. *J Comput Aided Mol Des.* 1997;11(3):293-304.

26. Hansson K, Stenflo J. Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation. *J Thromb Haemost.* 2005;3(12):2633-48.
27. Heeb MJ, Griffin JH. Activated Protein C-Dependent and -Independent Anticoagulant Activities of Protein S Have Different Structural Requirements. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;29(2):190-9.
28. Brinkman HJM, Mertens K, Mourik J a. V. Proteolytic cleavage of protein S during the hemostatic response. *J Thromb Haemost.* 2005;3(12):2712-20.
29. Stenberg Y, Julenius K, Dahlqvist I, Drakenberg T, Stenflo J. Calcium-binding properties of the third and fourth epidermal-growth-factor-like modules in vitamin-K-dependent protein S. *Eur J Biochem.* 1997;248(1):163-70.
30. Stenberg Y, Drakenberg T, Dahlbäck B, Stenflo J. Characterization of recombinant epidermal growth factor (EGF)-like modules from vitamin-K-dependent protein S expressed in *Spodoptera* cells--the cofactor activity depends on the N-terminal EGF module in human protein S. *Eur J Biochem.* 1998;251(3):558-64.
31. Persson KEM, Stenflo J, Linse S, Stenberg Y, Preston RJS, Lane DA, et al. Binding of calcium to anticoagulant protein S: role of the fourth EGF module. *Biochemistry.* 2006;45(35):10682-9.
32. Stenflo J, Lundwall A, Dahlbäck B. beta-Hydroxyasparagine in domains homologous to the epidermal growth factor precursor in vitamin K-dependent protein S. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(2):368-72.
33. Dahlbäck B, Lundwall A, Stenflo J. Primary structure of bovine vitamin K-dependent protein S. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(12):4199-203.
34. Saposnik B, Borgel D, Aiach M, Gandrille S. Functional properties of the sex-hormone-binding globulin (SHBG)-like domain of the anticoagulant protein S. *European Journal of Biochemistry.* 2003;270(3):545-55.
35. Hillarp A, Dahlbäck B. Novel subunit in C4b-binding protein required for protein S binding. *J Biol Chem.* 1988;263(25):12759-64.
36. Reglińska-Matveyev N, Andersson HM, Rezende SM, Dahlbäck B, Crawley JTB, Lane DA, et al. TFPI cofactor function of protein S: essential role of the protein S SHBG-like domain. *Blood.* 2014;123(25):3979-87.
37. Heeb MJ, Kojima Y, Rosing J, Tans G, Griffin JH. C-terminal residues 621-635 of protein S are essential for binding to factor Va. *J Biol Chem.* 1999;274(51):36187-92.
38. He X, Shen L, Malmberg AC, Smith KJ, Dahlback B, Linse S. Binding site for C4b-binding protein in vitamin K-dependent protein S fully contained in carboxy-terminal laminin-G-type repeats. A study using recombinant factor IX-protein S chimeras and surface plasmon resonance. *Biochemistry.* 1997;36(12):3745-54.

39. King SL, Joshi HJ, Schjoldager KT, Halim A, Madsen TD, Dziegiel MH, et al. Characterizing the O-glycosylation landscape of human plasma, platelets, and endothelial cells. *Blood Adv.* 2017;1(7):429-42.
40. Liu T-A, Yasuda S, Williams FE, Liu M-Y, Suiko M, Sakakibara Y, et al. A Target-specific Approach for the Identification of Tyrosine-sulfated Hemostatic Proteins. *Anal Biochem.* 2009;390(1):88-90.
41. Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol.* 1993;13(8):4976-85.
42. Hoskins J, Norman DK, Beckmann RJ, Long GL. Cloning and characterization of human liver cDNA encoding a protein S precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(2):349-53.
43. Ogura M, Tanabe N, Nishioka J, Suzuki K, Saito H. Biosynthesis and secretion of functional protein S by a human megakaryoblastic cell line (MEG-01). *Blood.* 1987;70(1):301-6.
44. Fair DS, Marlar RA, Levin EG. Human endothelial cells synthesize protein S. *Blood.* 1986;67(4):1168-71.
45. Stern D, Brett J, Harris K, Nawroth P. Participation of endothelial cells in the protein C-protein S anticoagulant pathway: the synthesis and release of protein S. *J Cell Biol.* 1986;102(5):1971-8.
46. Kanthou C, Benzakour O. Cellular effects and signalling pathways activated by the anti-coagulant factor, protein S, in vascular cells protein S cellular effects. *Adv Exp Med Biol.* 2000;476:155-66.
47. FitzGerald ES, Chen Y, Fitzgerald KA, Jamieson AM. Lung Epithelial Cell Transcriptional Regulation as a Factor in COVID-19-associated Coagulopathies. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2021;64(6):687-97.
48. Malm J, He XH, Bjartell A, Shen L, Abrahamsson PA, Dahlbäck B. Vitamin K-dependent protein S in Leydig cells of human testis. *Biochem J.* 1994;302:845-50.
49. Burstyn-Cohen T, Lew ED, Través PG, Burrola PG, Hash JC, Lemke G. Genetic dissection of TAM receptor-ligand interaction in retinal pigment epithelial cell phagocytosis. *Neuron.* 2012;76(6):1123-32.
50. Maillard C, Berruyer M, Serre CM, Dechavanne M, Delmas PD. Protein-S, a vitamin K-dependent protein, is a bone matrix component synthesized and secreted by osteoblasts. *Endocrinology.* 1992;130(3):1599-604.
51. Prince R, Bologna L, Manetti M, Melchiorre D, Rosa I, Dewarrat N, et al. Targeting anticoagulant protein S to improve hemostasis in hemophilia. *Blood.* 2018;131(12):1360-71.

52. Zelentsova K, Talmi Z, Abboud-Jarrous G, Sapir T, Capucha T, Nassar M, et al. Protein S Regulates Neural Stem Cell Quiescence and Neurogenesis. *Stem Cells*. 2017;35(3):679-93.
53. Zelentsova-Levytskyi K, Talmi Z, Abboud-Jarrous G, Capucha T, Sapir T, Burstyn-Cohen T. Protein S Negatively Regulates Neural Stem Cell Self-Renewal through Bmi-1 Signaling. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2017;10:124.
54. Lumbroso D, Soboh S, Maimon A, Schif-Zuck S, Ariel A, Burstyn-Cohen T. Macrophage-Derived Protein S Facilitates Apoptotic Polymorphonuclear Cell Clearance by Resolution Phase Macrophages and Supports Their Reprogramming. *Front Immunol* 2018;9:358
55. Carrera Silva EA, Chan PY, Joannas L, Errasti AE, Gagliani N, Bosurgi L, et al. T cell-derived Protein S engages TAM signaling in Dendritic Cells to control the magnitude of the immune response. *Immunity*. 2013;39(1):160-70.
56. Peeters MJW, Dulkeviciute D, Draghi A, Ritter C, Rahbech A, Skadborg SK, et al. MERTK Acts as a Costimulatory Receptor on Human CD8+ T Cells. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(9):1472-84.
57. Walker FJ. Characterization of a synthetic peptide that inhibits the interaction between protein S and C4b-binding protein. *J Biol Chem*. 1989;264(30):17645-8.
58. Fernández JA, Heeb MJ, Griffin JH. Identification of residues 413-433 of plasma protein S as essential for binding to C4b-binding protein. *J Biol Chem*. 1993;268(22):16788-94.
59. Linse S, Härdig Y, Schultz DA, Dahlbäck B. A Region of Vitamin K-dependent Protein S That Binds to C4b Binding Protein (C4BP) Identified Using Bacteriophage Peptide Display Libraries. *J Biol Chem*. 1997;272(23):14658-65.
60. Fernández JA, Griffin JH, Chang GT, Stam J, Reitsma PH, Bertina RM, et al. Involvement of amino acid residues 423-429 of human protein S in binding to C4b-binding protein. *Blood Cells Mol Dis*. 1998;24(2):101-12
61. Okrój M, Blom AM. Chapter 24 - C4b-Binding Protein. In: Barnum S, Schein T, éditeurs. *The Complement FactsBook (Second Edition)*. Academic Press; 2018. p. 251-9.
62. Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S–C4b binding protein complex. *Blood*. 2004;103(4):1192-201.
63. Calzavarini S, Prince-Eladnani R, Saller F, Bologna L, Burnier L, Brisset AC, et al. Platelet protein S limits venous but not arterial thrombosis propensity by controlling coagulation in the thrombus. *Blood*. 2020;135(22):1969-82.
64. Morbœuf O, Borgel D, Gaussem P, Vincenot A, Pittet J-L, Aiach M, et al. Characterization of Cleaved Plasma Protein S with a Monoclonal Antibody-based Assay. *Thromb Haemost*. 2000;84(10):604-10.

65. Borgel D, Reny J-L, Fischelis D, Gandrille S, Emmerich J, Fiessinger J-N, et al. Cleaved protein S (PS), total PS, free PS, and activated protein C cofactor activity as risk factors for venous thromboembolism. *Clin Chem*. 2003;49(4):575-80.
66. Dienava-Verdoold I, Marchetti MR, te Boome LCJ, Russo L, Falanga A, Koene HR, et al. Platelet-mediated proteolytic down regulation of the anticoagulant activity of protein S in individuals with haematological malignancies. *Thromb Haemost*. 2012;107(3):468-76.
67. Burstyn-Cohen T, Heeb MJ, Lemke G. Lack of protein S in mice causes embryonic lethal coagulopathy and vascular dysgenesis. *J Clin Invest*. 2009;119(10):2942-53.
68. Mitchell CA, Salem HH. Cleavage of protein S by a platelet membrane protease. *J Clin Invest*. 1987;79(2):374-9.
69. Pitkänen H, Jouppila A, Mowinckel M-C, Lemponen M, Patiwaël S, Sandset PM, et al. Enhanced thrombin generation and reduced intact protein S in processed solvent detergent plasma. *Thromb Res*. 2015;135(1):167-74.
70. BORGEL D, GAUSSEM P, GARBAY C, BACHELOT-LOZA C, KAABACHE T, LIU W-Q, et al. Implication of protein S thrombin-sensitive region with membrane binding via conformational changes in the γ -carboxyglutamic acid-rich domain. *Biochem J*. 2001;360(2):499-506.
71. Sugo T, Dahlbäck B, Holmgren A, Stenflo J. Calcium binding of bovine protein S. Effect of thrombin cleavage and removal of the gamma-carboxyglutamic acid-containing region. *J Biol Chem*. 1986;261(11):5116-20.
72. Schwarz H, Heeb M, Wencel-Drake J, Griffin J. Identification and quantitation of protein S in human platelets. *Blood*. 1985;66(6):1452-5.
73. Vélez P, Izquierdo I, Rosa I, García Á. A 2D-DIGE-based proteomic analysis reveals differences in the platelet releasate composition when comparing thrombin and collagen stimulations. *Sci Rep*. 2015;5:8198.
74. Esmon NL, Owen WG, Esmon CT. Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem*. 1982;257(2):859-64.
75. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(19):10212-6.
76. Sarangi PP, Lee H, Kim M. Activated Protein C action in inflammation. *Br J Haematol*. 2010;148(6):817-33.
77. Griffin JH, Fernández JA, Gale AJ, Mosnier LO. Activated protein C. *J Thromb Haemost*. 2007;5(s1):73-80.
78. Gierula M, Ahnström J. Anticoagulant protein S-New insights on interactions and functions. *J Thromb Haemost*. 2020;18(11):2801-11.

79. Shen L, Dahlbäck B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem.* 1994;269(29):18735-8.
80. Váradi K, Rosing J, Tans G, Pabinger I, Keil B, Schwarz HP. Factor V enhances the cofactor function of protein S in the APC-mediated inactivation of factor VIII: influence of the factor VR506Q mutation. *Thromb Haemost.* 1996;76(2):208-14.
81. Thorelli E, Kaufman RJ, Dahlbäck B. Cleavage of factor V at Arg 506 by activated protein C and the expression of anticoagulant activity of factor V. *Blood.* 1999;93(8):2552-8.
82. Jenny RJ, Pittman DD, Toole JJ, Kriz RW, Aldape RA, Hewick RM, et al. Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(14):4846-50.
83. Zhu H, Toso R, Camire RM. Inhibitory Sequences within the B-domain Stabilize Circulating Factor V in an Inactive State. *J Biol Chem.* 2007;282(20):15033-9.
84. Bos MHA, Camire RM. A bipartite autoinhibitory region within the B-domain suppresses function in factor V. *J Biol Chem.* 2012;287(31):26342-51.
85. Nesheim ME, Nichols WL, Cole TL, Houston JG, Schenk RB, Mann KG, et al. Isolation and study of an acquired inhibitor of human coagulation factor V. *J Clin Invest.* 1986;77(2):405-15.
86. Osterud B, Rapaport SI, Lavine KK. Factor V activity of platelets: evidence for an activated factor V molecule and for a platelet activator. *Blood.* 1977;49(5):819-34.
87. Monković DD, Tracy PB. Functional characterization of human platelet-released factor V and its activation by factor Xa and thrombin. *J Biol Chem.* 1990;265(28):17132-40.
88. Fager AM, Wood JP, Bouchard BA, Feng P, Tracy PB. PROPERTIES OF PROCOAGULANT PLATELETS: DEFINING AND CHARACTERIZING THE SUBPOPULATION BINDING A FUNCTIONAL PROTHROMBINASE. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2400-7.
89. Monkovic DD, Tracy PB. Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. *Biochemistry.* 1990;29(5):1118-28.
90. Nesheim ME, Taswell JB, Mann KG. The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase. *J Biol Chem.* 1979;254(21):10952-62.
91. Weinreb GE, Mukhopadhyay K, Majumder R, Lentz BR. Cooperative roles of factor V(a) and phosphatidylserine-containing membranes as cofactors in prothrombin activation. *J Biol Chem.* 2003;278(8):5679-84.
92. Kisiel W, Canfield WM, Ericsson LH, Davie EW. Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin. *Biochemistry.* 1977;16(26):5824-31.
93. Rosing J, Hoekema L, Nicolaes GA, Thomassen MC, Hemker HC, Varadi K, et al. Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J Biol Chem.* 1995;270(46):27852-8.

94. Norström EA, Tran S, Steen M, Dahlbäck B. Effects of Factor Xa and Protein S on the Individual Activated Protein C-mediated Cleavages of Coagulation Factor Va. *J Biol Chem.* 2006;281(42):31486-94.
95. Comp P, Esmon C. Activated protein C inhibits platelet prothrombin-converting activity. *Blood.* 1979;54(6):1272-81.
96. Walker FJ, Sexton PW, Esmon CT. The inhibition of blood coagulation by activated Protein C through the selective inactivation of activated Factor V. *Biochim Biophys Acta.* 1979;571(2):333-42.
97. Nesheim ME, Canfield WM, Kisiel W, Mann KG. Studies of the capacity of factor Xa to protect factor Va from inactivation by activated protein C. *J Biol Chem.* 1982;257(3):1443-7.
98. Suzuki K, Stenflo J, Dahlbäck B, Teodorsson B. Inactivation of human coagulation factor V by activated protein C. *J Biol Chem.* 1983;258(3):1914-20.
99. Tran S, Norström E, Dahlbäck B. Effects of prothrombin on the individual activated protein C-mediated cleavages of coagulation factor Va. *J Biol Chem.* 2008;283(11):6648-55.
100. Yegneswaran S, Nguyen PM, Gale AJ, Griffin JH. Prothrombin amino terminal region helps protect coagulation factor Va from proteolytic inactivation by activated protein C. *Thromb Haemost.* 2009;101(1):55-61.
101. Yegneswaran S, Wood GM, Esmon CT, Johnson AE. Protein S alters the active site location of activated protein C above the membrane surface. A fluorescence resonance energy transfer study of topography. *J Biol Chem.* 1997;272(40):25013-21.
102. Yegneswaran S, Smirnov MD, Safa O, Esmon NL, Esmon CT, Johnson AE. Relocating the Active Site of Activated Protein C Eliminates the Need for Its Protein S Cofactor A FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER STUDY. *J Biol Chem.* 1999;274(9):5462-8.
103. Walker FJ. Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation. *J Biol Chem.* 1981;256(21):11128-31.
104. Harris KW, Esmon CT. Protein S is required for bovine platelets to support activated protein C binding and activity. *J Biol Chem.* 1985;260(4):2007-10.
105. Stern DM, Nawroth PP, Harris K, Esmon CT. Cultured bovine aortic endothelial cells promote activated protein C-protein S-mediated inactivation of factor Va. *J Biol Chem.* 1986;261(2):713-8.
106. Gierula M, Salles-Crawley II, Santamaria S, Teraz-Orosz A, Crawley JTB, Lane DA, et al. The roles of factor Va and protein S in formation of the activated protein C/protein S/factor Va inactivation complex. *J Thromb Haemost.* 2019;17(12):2056-68.

107. Preston RJS, Ajzner E, Razzari C, Karageorgi S, Dua S, Dahlbäck B, et al. Multifunctional specificity of the protein C/activated protein C Gla domain. *J Biol Chem.* 2006;281(39):28850-7.
108. Ahnström J, Andersson HM, Canis K, Norström E, Yu Y, Dahlbäck B, et al. Activated protein C cofactor function of protein S: a novel role for a γ -carboxyglutamic acid residue. *Blood.* 2011;117(24):6685-93.
109. Harmon S, Preston RJS, Ni Ainle F, Johnson JA, Cunningham MS, Smith OP, et al. Dissociation of activated protein C functions by elimination of protein S cofactor enhancement. *J Biol Chem.* 2008;283(45):30531-9.
110. Rezende SM, Lane DA, Mille-Baker B, Samama MM, Conard J, Simmonds RE. Protein S Gla-domain mutations causing impaired Ca^{2+} -induced phospholipid binding and severe functional protein S deficiency. *Blood.* 2002;100(8):2812-9.
111. Rezende SM, Lane DA, Mille-Baker B, Samama MM, Conard J, Simmonds RE. Protein S Gla-domain mutations causing impaired Ca^{2+} -induced phospholipid binding and severe functional protein S deficiency. *Blood.* 2002;100(8):2812-9.
112. Saller F, Villoutreix BO, Amelot A, Kaabache T, Le Bonniec BF, Aiach M, et al. The γ -carboxyglutamic acid domain of anticoagulant protein S is involved in activated protein C cofactor activity, independently of phospholipid binding. *Blood.* 2005;105(1):122-30.
113. Heeb MJ, Mesters RM, Fernández JA, Hackeng TM, Nakasone RK, Griffin JH. Plasma protein S residues 37-50 mediate its binding to factor Va and inhibition of blood coagulation. *Thromb Haemost.* 2013;110(2):275-82.
114. Dahlbäck B, Hildebrand B, Malm J. Characterization of functionally important domains in human vitamin K-dependent protein S using monoclonal antibodies. *Journal of Biological Chemistry.* 1990;265(14):8127-35.
115. Andersson HM, Arantes MJ, Crawley JTB, Luken BM, Tran S, Dahlbäck B, et al. Activated protein C cofactor function of protein S: a critical role for Asp95 in the EGF1-like domain. *Blood.* 2010;115(23):4878-85.
116. He X, Shen L, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Amino Acid Residues in Thrombin-sensitive Region and First Epidermal Growth Factor Domain of Vitamin K-dependent Protein S Determining Specificity of the Activated Protein C Cofactor Function*. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273(42):27449-58.
117. Mille-Baker B, Rezende SM, Simmonds RE, Mason PJ, Lane DA, Laffan MA. Deletion or replacement of the second EGF-like domain of protein S results in loss of APC cofactor activity. *Blood.* 2003;101(4):1416-8.
118. Van Wijnen M, Stam JG, Chang GT, Meijers JC, Reitsma PH, Bertina RM, et al. Characterization of mini-protein S, a recombinant variant of protein S that lacks the sex hormone binding globulin-like domain. *Biochem J.* 1998;330:389-96.

119. Maurissen LFA, Thomassen MCLGD, Nicolaes GAF, Dahlbäck B, Tans G, Rosing J, et al. Re-evaluation of the role of the protein S-C4b binding protein complex in activated protein C-catalyzed factor Va-inactivation. *Blood*. 2008;111(6):3034-41.
120. van de Poel RHL, Meijers JCM, Rosing J, Tans G, Bouma BN. C4b-Binding Protein Protects Coagulation Factor Va from Inactivation by Activated Protein C. *Biochemistry*. 2000;39(47):14543-8.
121. Nishioka J, Suzuki K. Inhibition of cofactor activity of protein S by a complex of protein S and C4b-binding protein. Evidence for inactive ternary complex formation between protein S, C4b-binding protein, and activated protein C. *J Biol Chem*. 1990;265(16):9072-6.
122. Kaufman RJ, Wasley LC, Dorner AJ. Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J Biol Chem*. 1988;263(13):6352-62.
123. Fulcher CA, Zimmerman TS. Characterization of the human factor VIII procoagulant protein with a heterologous precipitating antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(5):1648-52.
124. Rotblat F, O'Brien DP, O'Brien FJ, Goodall AH, Tuddenham EGD. Purification of human factor VIII:C and its characterization by Western blotting using monoclonal antibodies. *Biochemistry*. 1985;24(16):4294-300.
125. Andersson LO, Forsman N, Huang K, Larsen K, Lundin A, Pavlu B, et al. Isolation and characterization of human factor VIII: molecular forms in commercial factor VIII concentrate, cryoprecipitate, and plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(9):2979-83.
126. Butenas S, Parhami-Seren B, Undas A, Fass DN, Mann KG. The "normal" factor VIII concentration in plasma. *Thromb Res*. 2010;126(2):119-23.
127. Vlot AJ, Koppelman SJ, van den Berg MH, Bouma BN, Sixma JJ. The affinity and stoichiometry of binding of human factor VIII to von Willebrand factor. *Blood*. 1995;85(11):3150-7.
128. Leyte A, Verbeet MP, Brodniewicz-Proba T, Van Mourik JA, Mertens K. The interaction between human blood-coagulation factor VIII and von Willebrand factor. Characterization of a high-affinity binding site on factor VIII. *Biochem J*. 1989;257(3):679-83.
129. 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*. 2016;128(16):2007-16.
130. Turecek PL, Johnsen JM, Pipe SW, O'Donnell JS. Biological mechanisms underlying inter-individual variation in factor VIII clearance in haemophilia. *Haemophilia*. 2020;26(4):575-83.

131. Fay PJ, Anderson MT, Chavin SI, Marder. The size of human factor VIII heterodimers and the effects produced by thrombin . *Biochim Biophys Acta* 1986;871:268-78
132. Saenko EL, Shima M, Sarafanov AG. Role of Activation of the Coagulation Factor VIII in Interaction with vWf, Phospholipid, and Functioning within the Factor Xase Complex. *Trends Cardiovasc Med*. 1999;9(7):185-92.
133. Fay PJ. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Rev*. 2004;18(1):1-15.
134. van Dieijen G, Tans G, Rosing J, Hemker HC. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J Biol Chem*. 1981;256(7):3433-42.
135. 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):17006-11.
136. Lollar P, Parker ET, Curtis JE, Helgerson SL, Hoyer LW, Scott ME, et al. Inhibition of human factor VIIIa by anti-A2 subunit antibodies. *J Clin Invest*. 1994;93(6):2497-504.
137. Griffiths AE, Rydkin I, Fay PJ. Factor VIIIa A2 Subunit Shows a High Affinity Interaction with Factor IXa. *J Biol Chem*. 2013;288(21):15057-64.
138. Lollar P, Parker ET, Fay PJ. Coagulant properties of hybrid human/porcine factor VIII molecules. *J Biol Chem*. 1992;267(33):23652-7.
139. Fay PJ, Beattie T, Huggins CF, Regan LM. Factor VIIIa A2 subunit residues 558-565 represent a factor IXa interactive site. *J Biol Chem*. 1994;269(32):20522-7.
140. Lollar P, Knutson GJ, Fass DN. Stabilization of Thrombin-Activated Porcine Factor VIII:C by Factor IXa and Phospholipid. *Blood*. 1984;63(6):1303-8.
141. 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(2):505-12.
142. 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*. 1991;266(30):20139-45.
143. Gale AJ, Cramer TJ, Rozenshteyn D, Cruz JR. Detailed Mechanisms of the Inactivation of Factor VIIIa by Activated Protein C in the Presence of Its Cofactors, Protein S and Factor V. *J Biol Chem*. 2008;283(24):16355-62.
144. Bertina RM, Cupers R, van Wijngaarden A. Factor IXa protects activated factor VIII against inactivation by activated protein C. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1984;125(1):177-83.

145. Regan LM, Lamphear BJ, Huggins CF, Walker FJ, Fay PJ. Factor IXa protects factor VIIIa from activated protein C. Factor IXa inhibits activated protein C-catalyzed cleavage of factor VIIIa at Arg562. *J Biol Chem.* 1994;269(13):9445-52.
146. Wilhelm AR, Parsons NA, Samelson-Jones BJ, Davidson RJ, Esmon CT, Camire RM, et al. Activated protein C has a regulatory role in factor VIII function. *Blood.* 2021;137(18):2532-43.
147. Plautz William E., Sekhar Pilli Vijaya Satish, Cooley Brian C., Chattopadhyay Rima, Westmark Pamela R., Getz Todd, et al. Anticoagulant Protein S Targets the Factor IXa Heparin-Binding Exosite to Prevent Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(4):816-28.
148. Walker FJ, Chavin SI, Fay PJ. Inactivation of factor VIII by activated protein C and protein S. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1987;252(1):322-8.
149. Thorelli E, Kaufman RJ, Dahlbäck B. The C-terminal Region of the Factor V B-domain Is Crucial for the Anticoagulant Activity of Factor V. *J Biol Chem.* 1998;273(26):16140-5.
150. Cramer TJ, Griffin JH, Gale AJ. Factor V Is an Anticoagulant Cofactor for Activated Protein C during Inactivation of Factor Va. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2010;37(1):17-23.
151. Nyberg P, Dahlbäck B, García de Frutos P. The SHBG-like region of protein S is crucial for factor V-dependent APC-cofactor function. *FEBS Lett.* 1998;433(1-2):28-32.
152. Evenäs P, García de Frutos P, Nicolaes GA, Dahlbäck B. The second laminin G-type domain of protein S is indispensable for expression of full cofactor activity in activated protein C-catalysed inactivation of factor Va and factor VIIIa. *Thromb Haemost.* 2000;84(2):271-7.
153. Broze GJ. The rediscovery and isolation of TFPI. *J Thromb Haemost.* 2003;1(8):1671-5.
154. Lwaleed BA, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol.* 2006;208(3):327-39.
155. Piro O, Broze GJ. Comparison of cell-surface TFPI α and β . *J Thromb Haemost.* 2005;3(12):2677-83.
156. Hackeng TM, Maurissen LFA, Castoldi E, Rosing J. Regulation of TFPI function by protein S. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1:165-8.
157. TFPI - Tissue factor pathway inhibitor precursor - Homo sapiens (Human) - TFPI gene & protein. Disponible sur: <https://www.uniprot.org/uniprot/P10646>
158. Girard TJ, Tuley E, Broze GJ. TFPI β is the GPI-anchored TFPI isoform on human endothelial cells and placental microsomes. *Blood.* 2012;119(5):1256-62.
159. Novotny W, Brown S, Miletich J, Rader D, Broze GJ. Plasma antigen levels of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor in patient samples. *Blood.* 1991;78(2):387-93.

160. Ariëns RA, Alberio G, Moia M, Mannucci PM. Low levels of heparin-releasable tissue factor pathway inhibitor in young patients with thrombosis. *Thromb Haemost.* 1999;81(2):203-7.
161. Sandset PM, Abildgaard U, Larsen ML. Heparin induces release of extrinsic coagulation pathway inhibitor (EPI). *Thromb Res.* 1988;50(6):803-13.
162. Bara L, Bloch MF, Zitoun D, Samama M, Collignon F, Frydman A, et al. Comparative effects of enoxaparin and unfractionated heparin in healthy volunteers on prothrombin consumption in whole blood during coagulation, and release of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Res.* 1993;69(5):443-52.
163. Lupu C, Poulsen E, Roquefeuil S, Westmuckett AD, Kakkar VV, Lupu F. Cellular effects of heparin on the production and release of tissue factor pathway inhibitor in human endothelial cells in culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(9):2251-62.
164. Hansen JB, Svensson B, Olsen R, Ezban M, Osterud B, Paulssen RH. Heparin induces synthesis and secretion of tissue factor pathway inhibitor from endothelial cells in vitro. *Thromb Haemost.* 2000;83(6):937-43.
165. Lupu C, Lupu F, Dennehy U, Kakkar VV, Scully MF. Thrombin Induces the Redistribution and Acute Release of Tissue Factor Pathway Inhibitor From Specific Granules Within Human Endothelial Cells in Culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(11):2055-62.
166. Gu J-M, Patel C, Kauser K. Plasma Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) Levels in Healthy Subjects and Patients with Hemophilia A and B. *Blood.* 2015;126(23):4672.
167. Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ. Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Blood.* 1988;72(6):2020-5.
168. Maroney SA, Cooley BC, Sood R, Weiler H, Mast AE. Combined tissue factor pathway inhibitor and thrombomodulin deficiency produces an augmented hypercoagulable state with tissue-specific fibrin deposition. *J Thromb Haemost.* 2008;6(1):111-7.
169. Broze GJ, Lange GW, Duffin KL, MacPhail L. Heterogeneity of plasma tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1994;5(4):551-9.
170. Peterson JA, Maroney SA, Martinez ND, Mast AE. Major Reservoir for Heparin-Releasable TFPI α (Tissue Factor Pathway Inhibitor α) Is Extracellular Matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(6):1942-55.
171. Broze GJ, Miletich JP. Characterization of the inhibition of tissue factor in serum. *Blood.* 1987;69(1):150-5.
172. Hjort PF. Intermediate reactions in the coagulation of blood with tissue thromboplastin; convertin, accelerin, prothrombinase. *Scand J Clin Lab Invest. Suppl* 27:1-183.

173. Sanders NL, Bajaj SP, Zivelin A, Rapaport SI. Inhibition of tissue factor/factor VIIa activity in plasma requires factor X and an additional plasma component. *Blood*. 1985;66(1):204-12.
174. Baugh RJ, Broze GJ, Krishnaswamy S. Regulation of Extrinsic Pathway Factor Xa Formation by Tissue Factor Pathway Inhibitor. *J Biol Chem*. 1998;273(8):4378-86.
175. Broze GJ, Warren LA, Novotny WF, Higuchi DA, Girard JJ, Miletich JP. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood*. 1988;71(2):335-43.
176. Girard TJ, Warren LA, Novotny WF, Likert KM, Brown SG, Miletich JP, et al. Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature*. 1989;338(6215):518-20.
177. Huang ZF, Wun TC, Broze GJ. Kinetics of factor Xa inhibition by tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem*. 1993;268(36):26950-5.
178. Hackeng TM, Seré KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(9):3106-11.
179. Santamaria S, Reglińska-Matveyev N, Gierula M, Camire RM, Crawley JTB, Lane DA, et al. Factor V has an anticoagulant cofactor activity that targets the early phase of coagulation. *J Biol Chem*. 2017;292(22):9335-44.
180. Thomassen MCLGD, Heinzmann ACA, Herfs L, Hartmann R, Dockal M, Scheifflinger F, et al. Tissue factor-independent inhibition of thrombin generation by tissue factor pathway inhibitor- α . *J Thromb Haemost*. 2015;13(1):92-100.
181. Ndonwi M, Tuley EA, Broze GJ. The Kunitz-3 domain of TFPI-alpha is required for protein S-dependent enhancement of factor Xa inhibition. *Blood*. 2010;116(8):1344-51.
182. Wesselschmidt R, Likert K, Huang Z, MacPhail L, Broze GJ Jr. Structural requirements for tissue factor pathway inhibitor interactions with factor Xa and heparin. *Blood Coag Fibrinolysis*. 1993;4(5):661-9.
183. Peraramelli S, Thomassen S, Heinzmann A, Hackeng TM, Hartmann R, Scheifflinger F, et al. Role of exosite binding modulators in the inhibition of Fxa by TFPI. *Thromb Haemost*. 2016;115(3):580-90.
184. Wood JP, Ellery PER, Maroney SA, Mast AE. Protein S is a cofactor for platelet and endothelial tissue factor pathway inhibitor- α but not for cell surface-associated tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(1):169-76.
185. Vincent LM, Tran S, Livaja R, Benseid TA, Milewicz DM, Dahlbäck B. Coagulation factor VA2440G causes east Texas bleeding disorder via TFPI α . *J Clin Invest*. 2013;123(9):3777-87.

186. Broze GJ, Girard TJ. Factor V, tissue factor pathway inhibitor, and east Texas bleeding disorder. *J Clin Invest.* 2013;123(9):3710-2.
187. Dahlbäck B. Novel insights into the regulation of coagulation by factor V isoforms, tissue factor pathway inhibitor α , and protein S. *J Thromb Haemost.* 2017;15(7):1241-50.
188. Petrillo T, Ayombil F, van't Veer C, Camire RM. Regulation of factor V and factor V-short by TFPI α : Relationship between B-domain proteolysis and binding. *J Biol Chem.* 2021;296:100234.
189. 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):17838-43.
190. Dahlbäck B, Guo LJ, Livaja-Koshlar R, Tran S. Factor V-short and protein S as synergistic tissue factor pathway inhibitor (TFPI α) cofactors. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018;2(1):114-24.
191. Dahlbäck B, Guo LJ, Zöller B, Tran S. New functional test for the TFPI α cofactor activity of Protein S working in synergy with FV-Short. *J Thromb Haemost.* 2019;17(4):585-95.
192. Somajo S, Ahnström J, Fernandez-Recio J, Gierula M, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Amino acid residues in the laminin G domains of protein S involved in tissue factor pathway inhibitor interaction. *Thromb Haemost.* 2015;113(5):976-87.
193. Ahnström J, Andersson HM, Hockey V, Meng Y, McKinnon TAJ, Hamuro T, et al. Identification of functionally important residues in TFPI Kunitz domain 3 required for the enhancement of its activity by protein S. *Blood.* 2012;120(25):5059-62.
194. Ndonwi M, Burlingame OO, Miller AS, Tollefsen DM, Broze GJ, Goldberg DE. Inhibition of antithrombin by *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein II. *Blood.* 2011;117(23):6347-54.
195. Duckers C, Simioni P, Spiezia L, Radu C, Gavasso S, Rosing J, et al. Low plasma levels of tissue factor pathway inhibitor in patients with congenital factor V deficiency. *Blood.* 2008;112(9):3615-23.
196. Castoldi E, Simioni P, Tormene D, Rosing J, Hackeng TM. Hereditary and acquired protein S deficiencies are associated with low TFPI levels in plasma. *J Thromb Haemost.* 2010;8(2):294-300.
197. Dahm AEA, Sandset PM, Rosendaal FR. The association between protein S levels and anticoagulant activity of tissue factor pathway inhibitor type 1. *J Thromb Haemost.* 2008;6(2):393-5.
198. van Wijnen M, Stam JG, van't Veer C, Meijers JC, Reitsma PH, Bertina RM, et al. The interaction of protein S with the phospholipid surface is essential for the activated protein C-independent activity of protein S. *Thromb Haemost.* 1996;76(3):397-403.

199. Seré Kristin M, Janssen MP, Willems GM, Tans G, Rosing J, Hackeng TM. Purified Protein S Contains Multimeric Forms with Increased APC-Independent Anticoagulant Activity. *Biochemistry*. 2001;40(30):8852-60.
200. Heeb MJ, Radtke K-P, Fernández JA, Tonnu L. Plasma contains protein S monomers and multimers with similar direct anticoagulant activity. *J Thromb Haemost*. 2006;4(10):2215-22.
201. Heeb MJ, Schuck P, Xu X. Protein S multimers and monomers each have direct anticoagulant activity. *J Thromb Haemost*. 2006;4(2):385-91.
202. Koppelman S, Hackeng T, Sixma J, Bouma B. Inhibition of the intrinsic factor X activating complex by protein S: evidence for a specific binding of protein S to factor VIII. *Blood*. 1995;86(3):1062-71.
203. Chattopadhyay Rima, Sengupta Tanusree, Majumder Rinku. Inhibition of Intrinsic Xase by Protein S. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(10):2387-93.
204. Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO. Activated protein C: biased for translation. *Blood*. 2015;125(19):2898-907.
205. Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, et al. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*. 1995;80(4):661-70.
206. Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):327-36.
207. Lu Q, Gore M, Zhang Q, Camenisch T, Boast S, Casagrande F, et al. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature*. 1999;398(6729):723-8.
208. D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, et al. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet*. 2000;9(4):645-51.
209. Tabib Y, Jaber NS, Nassar M, Capucha T, Mizraji G, Nir T, et al. Cell-intrinsic regulation of murine epidermal Langerhans cells by protein S. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(25):E5736-45.
210. Nakamura YS, Hakeda Y, Takakura N, Kameda T, Hamaguchi I, Miyamoto T, et al. Tyro 3 receptor tyrosine kinase and its ligand, Gas6, stimulate the function of osteoclasts. *Stem Cells*. 1998;16(3):229-38.
211. Katagiri M, Hakeda Y, Chikazu D, Ogasawara T, Takato T, Kumegawa M, et al. Mechanism of stimulation of osteoclastic bone resorption through Gas6/Tyro 3, a receptor tyrosine kinase signaling, in mouse osteoclasts. *J Biol Chem*. 2001;276(10):7376-82.

212. Seitz HM, Camenisch TD, Lemke G, Earp HS, Matsushima GK. Macrophages and Dendritic Cells Use Different Axl/Mertk/Tyro3 Receptors in Clearance of Apoptotic Cells. *J Immunol.* 2007;178(9):5635-42.
213. Zagórska A, Través PG, Lew ED, Dransfield I, Lemke G. Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nat Immunol.* 2014;15(10):920-8.
214. Chirino LM, Kumar S, Okumura M, Sterner DE, Mattern M, Butt TR, et al. TAM receptors attenuate murine NK-cell responses via E3 ubiquitin ligase Cbl-b. *Eur J Immunol.* 2020;50(1):48-55.
215. Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, Savi P, DeMol M, Schaeffer P, et al. Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J Clin Invest.* 2005;115(2):237-46.
216. Branchford BR, Stalker TJ, Law L, Acevedo G, Sather S, Brzezinski C, et al. The small molecule MERTK inhibitor UNC2025 decreases platelet activation and prevents thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2018;16(2):352-63.
217. Barth ND, Marwick JA, Heeb MJ, Gale AJ, Rossi AG, Dransfield I. Augmentation of human monocyte responses to LPS by the Protein S and Mer/Tyro3 receptor tyrosine kinase axis. *J Immunol.* 2018;201(9):2602-11.
218. Charo N, Scharrig E, Ferrer MF, Sanjuan N, Carrera Silva EA, Schattner M, et al. *Leptospira* species promote a pro-inflammatory phenotype in human neutrophils. *Cell Microbiol.* 2019;21(2):e12990.
219. Happonen KE, Tran S, Mörgelin M, Prince R, Calzavarini S, Angelillo-Scherrer A, et al. The Gas6-Axl Protein Interaction Mediates Endothelial Uptake of Platelet Microparticles *. *J Biol Chem.* 2016;291(20):10586-601.
220. Zhu D, Wang Y, Singh I, Bell RD, Deane R, Zhong Z, et al. Protein S controls hypoxic/ischemic blood-brain barrier disruption through the TAM receptor Tyro3 and sphingosine 1-phosphate receptor. *Blood.* 2010;115(23):4963-72.
221. Miner JJ, Daniels BP, Shrestha B, Proenca-Modena JL, Lew ED, Lazear HM, et al. The TAM receptor Mertk protects against neuroinvasive viral infection by maintaining blood-brain barrier integrity. *Nat Med.* 2015;21(12):1464-72.
222. O'Donnell K, Harkes IC, Dougherty L, Wicks IP. Expression of receptor tyrosine kinase Axl and its ligand Gas6 in rheumatoid arthritis: evidence for a novel endothelial cell survival pathway. *Am J Pathol.* 1999;154(4):1171-80.
223. Melaragno MG, Wuthrich DA, Poppa V, Gill D, Lindner V, Berk BC, et al. Increased expression of Axl tyrosine kinase after vascular injury and regulation by G protein-coupled receptor agonists in rats. *Circ Res.* 1998;83(7):697-704.

224. Geng K. Chapter Three - Post-translational modifications of the ligands: Requirement for TAM receptor activation. In: Davra V, Galluzzi L, éditeurs. *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press; 2020. p. 35-55. (TAM Receptors in Health and Disease; vol. 357).
225. Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science*. 2001;293(5528):306-11.
226. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MBA, Lemke G. TAM Receptors Are Pleiotropic Inhibitors of the Innate Immune Response. *Cell*. 2007;131(6):1124-36.
227. Poon IKH, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):166-80.
228. Bedoui S, Herold MJ, Strasser A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(11):678-95.
229. Barth ND, Marwick JA, Vendrell M, Rossi AG, Dransfield I. The "Phagocytic Synapse" and Clearance of Apoptotic Cells. *Front Immunol*. 2017;8:1708.
230. Sather S, Kenyon KD, Lefkowitz JB, Liang X, Varnum BC, Henson PM, et al. A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. *Blood*. 2006;109(3):1026-33.
231. Rothlin CV, Lemke G. TAM receptor signaling and autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(6):740-6.
232. Tsou W-I, Nguyen K-QN, Calarese DA, Garforth SJ, Antes AL, Smirnov SV, et al. Receptor tyrosine kinases, TYRO3, AXL, and MER, demonstrate distinct patterns and complex regulation of ligand-induced activation. *J Biol Chem*. 2014;289(37):25750-63.
233. Evenäs P, Dahlbäck B, García de Frutos P. The first laminin G-type domain in the SHBG-like region of protein S contains residues essential for activation of the receptor tyrosine kinase sky. *Biol Chem*. 2000;381(3):199-209.
234. Geng K, Kumar S, Kimani SG, Kholodovych V, Kasikara C, Mizuno K, et al. Requirement of Gamma-Carboxyglutamic Acid Modification and Phosphatidylserine Binding for the Activation of Tyro3, Axl, and Mertk Receptors by Growth Arrest-Specific 6. *Front Immunol*. 2017;8:1521.
235. Lew ED, Oh J, Burrola PG, Lax I, Zagórska A, Través PG, et al. Differential TAM receptor–ligand–phospholipid interactions delimit differential TAM bioactivities. *eLife*. 2014;3:e03385.
236. Nishi C, Toda S, Segawa K, Nagata S. Tim4- and MerTK-Mediated Engulfment of Apoptotic Cells by Mouse Resident Peritoneal Macrophages. *Mol Cell Biol*. 2014;34(8):1512-20.

237. Cai B, Kasikara C, Doran AC, Ramakrishnan R, Birge RB, Tabas I. MerTK signaling in macrophages promotes the synthesis of inflammation resolution mediators by suppressing CaMKII activity. *Sci Signal*. 2018;11(549):eaar3721.
238. Rothlin CV, Carrera-Silva EA, Bosurgi L, Ghosh S. TAM receptor signaling in immune homeostasis. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:355-91.
239. van der Meer JHM, van der Poll T, van 't Veer C. TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis. *Blood*. 2014;123(16):2460-9.
240. Li Y, Wittchen ES, Monaghan-Benson E, Hahn C, Earp HS, Doerschuk CM, et al. The role of endothelial MERTK during the inflammatory response in lungs. *PLoS One*. 2019;14(12):e0225051.
241. McShane L, Tabas I, Lemke G, Kurowska-Stolarska M, Maffia P. TAM receptors in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2019;115(8):1286-95.
242. Batchu SN, Korshunov VA. Novel tyrosine kinase signaling pathways: Implications in vascular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012;21(2):122-7.
243. Benzakour O, Kanthou C. The anticoagulant factor, protein S, is produced by cultured human vascular smooth muscle cells and its expression is up-regulated by thrombin. *Blood*. 2000;95(6):2008-14.
244. Gasic GP, Arenas CP, Gasic TB, Gasic GJ. Coagulation factors X, Xa, and protein S as potent mitogens of cultured aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(6):2317-20.
245. Fernández JA, Heeb MJ, Xu X, Singh I, Zlokovic BV, Griffin JH. Species-specific anticoagulant and mitogenic activities of murine protein S. *Haematologica*. 2009;94(12):1721-31.
246. Benzakour O, Formstone C, Rahman S, Kanthou C, Dennehy U, Scully MF, et al. Evidence for a protein S receptor(s) on human vascular smooth muscle cells. Analysis of the binding characteristics and mitogenic properties of protein S on human vascular smooth muscle cells. *Biochem J*. 1995;308(Pt 2):481-5.
247. Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, et al. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med*. 2001;7(2):215-21.
248. Cosemans JMEM, Van Kruchten R, Olieslagers S, Schurgers LJ, Verheyen FK, Munnix ICA, et al. Potentiating role of Gas6 and Tyro3, Axl and Mer (TAM) receptors in human and murine platelet activation and thrombus stabilization. *J Thromb Haemost*. 2010;8(8):1797-808.
249. Balogh I, Hafizi S, Stenhoff J, Hansson K, Dahlbäck B. Analysis of Gas6 in Human Platelets and Plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(6):1280-6.

250. Borgel D, Clauser S, Bornstain C, Bièche I, Bissery A, Remones V, et al. Elevated growth-arrest-specific protein 6 plasma levels in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2006;34(1):219-22.
251. Chen C, Li Q-M, Darrow A, Wang Y, Derian C, Yang J, et al. Mer Receptor Tyrosine Kinase Signaling Participates in Platelet Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(6):1118-23
252. Lemke G. Phosphatidylserine is the signal for TAM receptors and their ligands. *Trends Biochem Sci*. 2017;42(9):738-48.
253. Uehara H, Shacter E. Auto-Oxidation and Oligomerization of Protein S on the Apoptotic Cell Surface Is Required for Mer Tyrosine Kinase-Mediated Phagocytosis of Apoptotic Cells. *J Immunol*. 2008;180(4):2522-30.
254. Kate MKT, Meer JVD. Protein S deficiency: a clinical perspective. *Haemophilia*. 2008;14(6):1222-8.
255. Mahasandana C, Suvatte V, Marlar RichardA, Manco-Johnson MarilynJ, Jacobson LindaJ, Hathaway WilliamE. Neonatal purpura fulminans associated with homozygous protein S deficiency. *The Lancet*. 1990;335(8680):61-2.
256. Marlar RA, Neumann A. Neonatal purpura fulminans due to homozygous protein C or protein S deficiencies. *Semin Thromb Hemost*. 1990;16(4):299-309.
257. Marlar RA, Gausman JN, Tsuda H, Rollins-Raval MA, Brinkman HJM. Recommendations for clinical laboratory testing for protein S deficiency: Communication from the SSC committee plasma coagulation inhibitors of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2021;19(1):68-74.
258. Dykes AC, Walker ID, McMahan AD, Islam SI a. M, Tait RC. A study of Protein S antigen levels in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *Br J Haematol*. 2001;113(3):636-41.
259. Broekmans AW, Linden IK van der, Jansen-Koeter Y, Bertina RM. Prevalence of protein C (PC) and protein S (PS) deficiency in patients with thrombotic disease. *Thromb Res*. 1986;41:135.
260. Gladson CL, Scharrer I, Hach V, Beck KH, Griffin JH. The frequency of type I heterozygous protein S and protein C deficiency in 141 unrelated young patients with venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 1988;59(1):18-22.
261. Ben-Tal O, Zivelin A, Seligsohn U. The relative frequency of hereditary thrombotic disorders among 107 patients with thrombophilia in Israel. *Thromb Haemost*. 1989;61(1):50-4.
262. Heijboer H, Brandjes DPM, Büller HR, Sturk A, ten Cate JW. Deficiencies of Coagulation-Inhibiting and Fibrinolytic Proteins in Outpatients with Deep-Vein Thrombosis. *N Engl J Med*. 1990;323(22):1512-6.

263. Pabinger I, Brücker S, Kyrle PA, Schneider B, Korninger HC, Niessner H, et al. Hereditary deficiency of antithrombin III, protein C and protein S: prevalence in patients with a history of venous thrombosis and criteria for rational patient screening. *Blood Coag Fibrinolysis*. 1992;3(5):547-54.
264. Knoebl PN. Severe congenital protein C deficiency: the use of protein C concentrates (human) as replacement therapy for life-threatening blood-clotting complications. *Biologics*. 2008;2(2):285-96.
265. Connors JM. Thrombophilia Testing and Venous Thrombosis. *N Engl J Med*. 2017;377(12):1177-87.
266. Esmon CT. Basic Mechanisms and Pathogenesis of Venous Thrombosis. *Blood Rev*. 2009;23(5):225-9.
267. Rees DC. The Population Genetics of Factor V Leiden (Arg506Gln). *Br J Haematol*. 1996;95(4):579-86.
268. Castoldi E, Rosing J. APC resistance: biological basis and acquired influences. *J Thromb Haemost*. 2010;8(3):445-53.
269. Schmidel DK, Tatro AV, Phelps LG, Tomczak JA, Long GL. Organization of the human protein S genes. *Biochemistry*. 1990;29(34):7845-52.
270. Wolf CJF de, Cupers RMJ, Bertina RM, Vos HL. The Constitutive Expression of Anticoagulant Protein S Is Regulated through Multiple Binding Sites for Sp1 and Sp3 Transcription Factors in the Protein S Gene Promoter. *J Biol Chem*. 2006;281(26):17635-43.
271. García de Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, Sala N. Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb Haemost*. 2007;98(3):543-56.
272. Borgel D, Duchemin J, Alhenc-Gelas M, Matheron C, Aiach M, Gandrille S, et al. Molecular basis for protein S hereditary deficiency: Genetic defects observed in 118 patients with type I and type IIa deficiencies. *J Lab Clin Med*. 1996;128(2):218-27.
273. Maruyama K, Akiyama M, Miyata T, Kokame K. Protein S K196E mutation reduces its cofactor activity for APC but not for TFPI. *Res Pract Thromb Haemost*. 2018;2(4):751-6.
274. Alshaiikh NA, Rosing J, Thomassen MCLGD, Castoldi E, Simioni P, Hackeng TM. New functional assays to selectively quantify the activated protein C- and tissue factor pathway inhibitor-cofactor activities of protein S in plasma. *J Thromb Haemost*. 2017;15(5):950-60.
275. Brinkman HJM, Ahnström J, Castoldi E, Dahlbäck B, Marlar RA. Pleiotropic anticoagulant functions of protein S, consequences for the clinical laboratory. Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2021;19(1):281-6.

276. Regnault V, Boehlen F, Ozsahin H, Wahl D, de Groot PG, Lecompte T, et al. Anti-protein S antibodies following a varicella infection: detection, characterization and influence on thrombin generation. *J Thromb Haemost.* 2005;3(6):1243-9.
277. Domergue S, Rodiere M, Bigorre M, Guye E, Captier G. Prise en charge d'un purpura fulminans varicelleux : à propos d'un cas pédiatrique. *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique.* 2006;51(3):243-8.
278. Fonkoua LK, Zhang S, Canty E, Fairfull A, Benich S, Knab A, et al. Purpura fulminans from reduced protein S following cytomegalovirus and varicella infection. *Am J Hematol.* 2019;94(4):491-5.
279. Boccara O, Lesage F, Regnault V, Lasne D, Dupic L, Bourdon-Lanoy E, et al. Nonbacterial purpura fulminans and severe autoimmune acquired protein S deficiency associated with human herpesvirus-6 active replication. *Br J Dermatol.* 2009;161(1):181-3.
280. Sorice M, Circella A, Griggi T, Garofalo T, Nicodemo G, Pittoni V, et al. Anticardiolipin and anti-beta 2-GPI are two distinct populations of autoantibodies. *Thromb Haemost.* 1996;75(2):303-8.
281. Morange PE, Alessi MC, Barthet MC, Aillaud MF, Harlé JR, Piquet P, et al. Acquired protein S deficiency, likely due to anti-PS autoantibodies, following a thrombotic event in a patient with a systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost.* 1997;78(5):1416-7.
282. Song X-Y, Zeng L, Jin W, Pilo CM, Frank ME, Wahl SM. Suppression of streptococcal cell wall-induced arthritis by human chorionic gonadotropin. *Arthritis Rheum.* 2000;43(9):2064-72.
283. Guermazi S, Regnault V, Gorgi Y, Ayed K, Lecompte T, Dellagi K. Further evidence for the presence of anti-protein S autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2000;11(5):491-8.
284. Tam DA. Protein C and protein S activity in sickle cell disease and stroke. *J Child Neurol.* 1997;12(1):19-21.
285. Schnog JB, Mac Gillavry MR, van Zanten AP, Meijers JCM, Rojer RA, Duits AJ, et al. Protein C and S and inflammation in sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2004;76(1):26-32.
286. Balakrishnan R, Hu S, Gil MR. Increased Incidence of Acquired Protein S Deficiency in Sickle Cell Disease. *Am J Clinl Pathol.* 2018;150(suppl 1):S161-S161.
287. Whelihan MF, Lim MY, Mooberry MJ, Piegore MG, Ilich A, Wogu A, et al. Thrombin generation and cell-dependent hypercoagulability in sickle cell disease. *J Thromb Haemost.* 2016;14(10):1941-52.
288. Sparkenbaugh EM, Chantrathammachart P, Mickelson J, van Ryn J, Hebbel RP, Monroe DM, et al. Differential contribution of FXa and thrombin to vascular inflammation in a mouse model of sickle cell disease. *Blood.* 2014;123(11):1747-56.

289. Levi M. The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hamostaseologie*. 2010;30(1):10-2, 14-6.
290. Shaw AD, Vail GM, Haney DJ, Xie J, Williams MD. Severe protein C deficiency is associated with organ dysfunction in patients with severe sepsis. *J Crit Care*. 2011;26(6):539-45.
291. Brunkhorst F, Sakr Y, Hagel S, Reinhart K. Protein C concentrations correlate with organ dysfunction and predict outcome independent of the presence of sepsis. *Anesthesiology*. 2007;107(1):15-23.
292. Saller F, Brisset AC, Tchaikovski SN, Azevedo M, Chrast R, Fernández JA, et al. Generation and phenotypic analysis of protein S-deficient mice. *Blood*. 2009;114(11):2307-14.
293. Stavenuiter F, Davis NF, Duan E, Gale AJ, Heeb MJ. Platelet protein S directly inhibits procoagulant activity on platelets and microparticles. *Thromb Haemost*. 2013;109(2):229-37.
294. Banno F, Kita T, Fernández JA, Yanamoto H, Tashima Y, Kokame K, et al. Exacerbated venous thromboembolism in mice carrying a protein S K196E mutation. *Blood*. 2015;126(19):2247-53.
295. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:775-97.
296. Wang Y, Fan Z, Shao L, Kong X, Hou X, Tian D, et al. Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:3287-303.
297. Harmsen MM, Ruuls RC, Nijman IJ, Niewold TA, Frenken LG, de Geus B. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol Immunol*. 2000;37(10):579-90.
298. Lee HT, Park UB, Jeong TJ, Gu N, Lee SH, Kim Y, et al. High-resolution structure of the vWF A1 domain in complex with caplacizumab, the first nanobody-based medicine for treating acquired TTP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;567:49-55.
299. De Genst E, 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 U S A*. 2006;103(12):4586-91.
300. Davies J, Riechmann L. « Camelising » human antibody fragments: NMR studies on VH domains. *FEBS Lett*. 1994;339(3):285-90.
301. Conrath K, Vincke C, Stijlemans B, Schymkowitz J, Decanniere K, Wyns L, et al. Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH. *J Mol Biol*. 2005;350(1):112-25.

302. 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.* 2000;19(5):921-30.
303. Govaert J, Pellis M, Deschacht N, Vincke C, Conrath K, Muyldermans S, et al. Dual Beneficial Effect of Interloop Disulfide Bond for Single Domain Antibody Fragments. *J Biol Chem.* 2012;287(3):1970-9.
304. Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L, Muyldermans S. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol.* 1997;34(16):1121-31.
305. 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.* 2007;324(1-2):13-25.
306. Bratkovič T. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(5):749-67.
307. Thomassen YE, Verkleij AJ, Boonstra J, Verrips CT. Specific production rate of VHH antibody fragments by *Saccharomyces cerevisiae* is correlated with growth rate, independent of nutrient limitation. *J Biotechnol.* 2005;118(3):270-7.
308. Rahbarizadeh F, Rasaee MJ, Forouzandeh M, Allameh A-A. Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Immunol.* 2006;43(5):426-35.
309. de Marco A. Co-expression and co-purification of antigen-antibody complexes in bacterial cytoplasm and periplasm. *Methods Mol Biol.* 2014;1129:125-35.
310. Schumacher D, Helma J, Schneider AFL, Leonhardt H, Hackenberger CPR. Nanobodies: Chemical Functionalization Strategies and Intracellular Applications. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2018;57(9):2314-33.
311. Peyron I, Kizlik-Masson C, Dubois M, Atsou S, Ferrière S, Denis CV, et al. Camelid-derived single-chain antibodies in hemostasis: Mechanistic, diagnostic, and therapeutic applications. *Res Pract Thromb Haemost.* 2020;4(7):1087-110.
312. van der Linden RH, Frenken LG, 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.* 1999;1431(1):37-46.
313. 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.* 2001;40(1):74-83.
314. Hagihara Y, Mine S, Uegaki K. Stabilization of an immunoglobulin fold domain by an engineered disulfide bond at the buried hydrophobic region. *J Biol Chem.* 2007;282(50):36489-95.

315. Saerens D, Conrath K, Govaert J, Muyldermans S. Disulfide bond introduction for general stabilization of immunoglobulin heavy-chain variable domains. *J Mol Biol.* 2008;377(2):478-88.
316. Hussack G, Hirama T, Ding W, Mackenzie R, Tanha J. Engineered single-domain antibodies with high protease resistance and thermal stability. *PLoS One.* 2011;6(11):e28218.
317. Dolk E, van der Vaart M, Lutje Hulsik D, Vriend G, de Haard H, Spinelli S, et al. Isolation of Llama Antibody Fragments for Prevention of Dandruff by Phage Display in Shampoo. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(1):442-50.
318. Jespers L, Schon O, Famm K, Winter G. Aggregation-resistant domain antibodies selected on phage by heat denaturation. *Nat Biotechnol.* 2004;22(9):1161-5.
319. Harmsen MM, van Solt CB, van Zijderveld-van Bemmelen AM, Niewold TA, van Zijderveld FG. Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;72(3):544-51.
320. Christ D, Famm K, Winter G. Repertoires of aggregation-resistant human antibody domains. *Protein Eng Des Sel.* 2007;20(8):413-6.
321. Vincke C, Loris R, Saerens D, Martinez-Rodriguez S, Muyldermans S, Conrath K. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J Biol Chem.* 2009;284(5):3273-84.
322. Lauwereys M, Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Kinne J, Hölzer W, De Genst E, Wyns L, Muyldermans S. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J.* 1998;17(13):3512-3520.
323. Stijlemans B, Conrath K, Cortez-Retamozo V, Van Xong H, 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.* 2004;279(2):1256-61.
324. Transue TR, De Genst E, Ghahroudi MA, Wyns L, Muyldermans S. Camel single-domain antibody inhibits enzyme by mimicking carbohydrate substrate. *Proteins.* 1998;32(4):515-22.
325. Hendrickx MLV, DE Winter A, Buelens K, Compennolle G, Hassanzadeh-Ghassabeh G, Muyldermans S, et al. TAFIa inhibiting nanobodies as profibrinolytic tools and discovery of a new TAFIa conformation. *J Thromb Haemost.* 2011;9(11):2268-77.
326. Conrath KE, Lauwereys M, Galleni M, Matagne A, Frère JM, Kinne J, et al. Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(10):2807-12.
327. Oyen D, Srinivasan V, Steyaert J, Barlow JN. Constraining enzyme conformational change by an antibody leads to hyperbolic inhibition. *J Mol Biol.* 2011;407(1):138-48.

328. Barlow JN, Conrath K, Steyaert J. Substrate-dependent modulation of enzyme activity by allosteric effector antibodies. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1794(8):1259-68.
329. Henry KA, Sulea T, van Faassen H, Hussack G, Purisima EO, MacKenzie CR, et al. A Rational Engineering Strategy for Designing Protein A-Binding Camelid Single-Domain Antibodies. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163113.
330. Deyev SM, Lebedenko EN. Multivalency: the hallmark of antibodies used for optimization of tumor targeting by design. *Bioessays*. 2008;30(9):904-18.
331. Saerens D, Kinne J, Bosmans E, Wernery U, Muyldermans S, Conrath K. Single Domain Antibodies Derived from Dromedary Lymph Node and Peripheral Blood Lymphocytes Sensing Conformational Variants of Prostate-specific Antigen. *J Biol Chem*. 2004;279(50):51965-72.
332. Ulrichs H, Silence K, Schoolmeester A, de Jaegere P, Rossenu S, Roodt J, et al. Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed antiplatelet drugs. *Blood*. 2011;118(3):757-65.
333. Barbon E, Ayme G, Mohamadi A, Ottavi J, Kawecki C, Casari C, et al. Single-domain antibodies targeting antithrombin reduce bleeding in hemophilic mice with or without inhibitors. *EMBO Mol Med*. 2020;12(4):e11298.
334. Sargentini-Maier ML, De Decker P, Tersteeg C, Canvin J, Callewaert F, De Winter H. Clinical pharmacology of caplacizumab for the treatment of patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Exp Rev Clin Pharmacol*. 2019;12(6):537-45.
335. Cortez-Retamozo V, Lauwereys M, Hassanzadeh Gh. G, Gobert M, Conrath K, Muyldermans S, et al. Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *Int J Cancer*. 2002;98(3):456-62.
336. Caljon G, Caveliers V, Lahoutte T, Stijlemans B, Ghassabeh G, Van Den Abbeele J, et al. Using microdialysis to analyse the passage of monovalent nanobodies through the blood-brain barrier. *Br J Pharmacol*. 2012;165(7):2341-53.
337. Harmsen MM, Van Solt CB, Fijten HPD, Van Setten MC. Prolonged in vivo residence times of llama single-domain antibody fragments in pigs by binding to porcine immunoglobulins. *Vaccine*. 2005;23(41):4926-34.
338. Coppieters K, Dreier T, Silence K, de Haard H, Lauwereys M, Casteels P, et al. Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(6):1856-66.
339. Iqbal U, Trojahn U, Albaghdadi H, Zhang J, O'Connor-McCourt M, Stanimirovic D, et al. Kinetic analysis of novel mono- and multivalent VHH-fragments and their application for molecular imaging of brain tumours. *Br J Pharmacol*. 2010;160(4):1016-28.

340. Van Roy M, Ververken C, Beirnaert E, Hoefman S, Kolkman J, Vierboom M, et al. The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody® ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:135.
341. Kontermann RE. Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics. *Curr Opin Biotechnol.* 2011;22(6):868-76.
342. Ferrière S, Kawecki C, Ottavi J-F, Denis CV, Kauskot A, Christophe OD, et al. A single-domain antibody that blocks factor VIIa activity in the absence but not presence of tissue factor. *J Thromb Haemost.* 2019;17(12):2035-46.
343. de Maat S, van Dooremalen S, de Groot PG, Maas C. A nanobody-based method for tracking factor XII activation in plasma. *Thromb Haemost.* 2013;110(3):458-68.
344. Aymé G, Adam F, Legendre P, Bazaa A, Proulle V, Denis CV, et al. A Novel Single-Domain Antibody Against von Willebrand Factor A1 Domain Resolves Leukocyte Recruitment and Vascular Leakage During Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(9):1736-40.
345. Denorme F, Martinod K, Vandenbulcke A, Denis CV, Lenting PJ, Deckmyn H, et al. The von Willebrand Factor A1 domain mediates thromboinflammation, aggravating ischemic stroke outcome in mice. *Haematologica.* 2021;106(3):819-28.
346. Hyseni A, Kemperman H, de Lange DW, de Groot PG, 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.
347. Kylilis N, Riengrunroj P, Lai H-E, Salema V, Fernández LÁ, Stan G-BV, et al. Whole-Cell Biosensor with Tunable Limit of Detection Enables Low-Cost Agglutination Assays for Medical Diagnostic Applications. *ACS Sens.* 2019;4(2):370-8.
348. Arnljots B, Dahlbäck B. Protein S as an in vivo cofactor to activated protein C in prevention of microarterial thrombosis in rabbits. *J Clin Invest.* 1995;95(5):1987-93.
349. Arnljots B, Dahlbäck B. Antithrombotic Effects of Activated Protein C and Protein S in a Rabbit Model of Microarterial Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(7):937-41.
350. Gruber A, Cantwell AM, Di Cera E, Hanson SR. The thrombin mutant W215A/E217A shows safe and potent anticoagulant and antithrombotic effects in vivo. *J Biol Chem.* 2002;277(31):27581-4.
351. Tucker EI, Verbout NG, Markway BD, Wallisch M, Lorentz CU, Hinds MT, et al. The protein C activator AB002 rapidly interrupts thrombus development in baboons. *Blood.* 2020;135(9):689-99.
352. Dargaud Y, Scoazec JY, Wielders SJH, Trzeciak C, Hackeng TM, Négrier C, et al. Characterization of an autosomal dominant bleeding disorder caused by a thrombomodulin mutation. *Blood.* 2015;125(9):1497-501.

353. Comp P, Forristall J, West C, Trapp R. Free protein S levels are elevated in familial C4b-binding protein deficiency. *Blood*. 1990;76(12):2527-9.
354. Stein PD, Beemath A, Meyers FA, Skaf E, Olson RE. Deep venous thrombosis and pulmonary embolism in hospitalized patients with sickle cell disease. *Am J Med*. 2006;119(10):897.e7-11.
355. Novelli EM, Huynh C, Gladwin MT, Moore CG, Ragni MV. Pulmonary Embolism in Sickle Cell Disease: A Case-Control Study. *J Thromb Haemost*. 2012;10(5):760-6.
356. Naik RP, Streiff MB, Haywood C, Nelson JA, Lanzkron S. Venous thromboembolism in adults with sickle cell disease: a serious and under-recognized complication. *Am J Med*. 2013;126(5):443-9.
357. Naik RP, Streiff MB, Haywood C, Segal JB, Lanzkron S. Venous thromboembolism incidence in the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *J Thromb Haemost*. 2014;12(12):2010-6.
358. Sparkenbaugh EM, Chen C, Brzoska T, Nguyen J, Wang S, Vercellotti GM, et al. Thrombin activation of PAR-1 contributes to microvascular stasis in mouse models of sickle cell disease. *Blood*. 2020;135(20):1783-7.

