



HAL
open science

Étude de deux anomalies de la coagulation : Exploration de la capacité des cellules de la paroi vasculaire à induire la génération de thrombine en présence de traitements de l'hémophilie A et caractérisation des mécanismes responsables du déficit en FX de la coagulation dans l'amylose à chaînes légères

Sénadé Atsou

► **To cite this version:**

Sénadé Atsou. Étude de deux anomalies de la coagulation : Exploration de la capacité des cellules de la paroi vasculaire à induire la génération de thrombine en présence de traitements de l'hémophilie A et caractérisation des mécanismes responsables du déficit en FX de la coagulation dans l'amylose à chaînes légères. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris-Saclay, 2024. Français. ⟨NNT : 2024UPASQ018⟩. ⟨tel-05537013⟩

HAL Id: tel-05537013

<https://theses.hal.science/tel-05537013v1>

Submitted on 4 Mar 2026

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

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



HAL Authorization

Etude de deux anomalies de la coagulation : Exploration de la capacité des cellules de la paroi vasculaire à induire la génération de thrombine en présence de traitements de l'hémophilie A et caractérisation des mécanismes responsables du déficit en FX de la coagulation dans l'amylose à chaînes légères

Study of two coagulation abnormalities: Exploration of the ability of vascular wall cells to induce thrombin generation in the presence of hemophilia A treatments and characterization of the mechanisms responsible for coagulation FX deficiency in light chain amyloidosis

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569, Innovation Thérapeutique, du Fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Physiologie et Physiopathologie
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée au sein de l'unité de recherche **HITH INSERM UMR_S1176** (Université Paris-Saclay, Inserm) sous la direction de **Olivier CHRISTOPHE**, Directeur de recherche INSERM 1176, sous le co-encadrement de **Cécile DENIS**, Directrice de recherche INSERM 1176

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 13 Juin 2024, par

Sénadé ATSOU

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Marc VASSE PU-PH, INSERM U1176/Hôpital FOCH	Président
Arnaud JACCARD PU-PH, UMR 6101/CHU Limoges	Rapporteur & Examineur
Nadine AJZENBERG PU-PH, INSERM 1148/Hôpital Bichat	Rapporteuse & Examinatrice
Véronique REGNAULT Directeur de recherche, INSERM 1116	Examinatrice
Julien GIUSTINIANI Directeur de recherche, INSERM 1195	Examineur

Titre : Caractérisation du déficit en Facteur X de la coagulation dans l'amylose à chaînes légères

Mots clés : Hémostase, Coagulation, Facteur X (FX), Amylose AL, FVIII, emicizumab

Résumé : L'hémostase regroupe les processus physiologiques assurant la coagulation sanguine pour réparer les vaisseaux lésés et maintenir la fluidité du sang, tout en éliminant les caillots une fois la cicatrisation effectuée. Dans cet ensemble, la coagulation, au cours de laquelle diverses protéines appelées « Facteur » s'activent les uns les autres pour former un caillot insoluble, joue une partition prépondérante.

Une anomalie fréquente de la coagulation est l'hémophilie A (HA), une maladie hémorragique due au déficit congénital en facteur VIII (FVIII). L'HA se manifeste par des épisodes de saignement affectant principalement les articulations et les muscles. Sa prise en charge consiste en l'administration de thérapies substitutives. Ces dernières années, la prise en charge de l'HA, a radicalement changé avec l'arrivée de thérapies comme l'emicizumab. Un autre acteur jouant un rôle crucial au cours de la coagulation est le facteur X (FX). Une glycoprotéine sécrétée par le foie et impliquée dès les premières phases de la coagulation. Sa position centrale dans la cascade enzymatique menant à la formation du caillot lui confère une importance capitale et son absence dans la circulation sanguine revêt une sévérité particulière. Le déficit en FX, hors contexte héréditaire, est le plus souvent lié à une dysplasie plasmocytaire agrégante appelée amylose à chaîne légères (AL).

L'amylose AL est une protéinopathie au cours de laquelle les chaînes légères d'immunoglobulines (CL) surproduites forment des dépôts fibrillaires dans divers organes. La présence d'un déficit en FX complexifie davantage le tableau clinique en associant des manifestations hémorragiques. Dans une première partie de ma thèse, nous avons exploré les mécanismes responsables du développement du déficit en FX dans l'amylose AL. Dans une cohorte de 3 patients, nous avons analysé la colocalisation du FX avec les structures amyloïdes de CL. Nous avons montré la présence spécifique du FX sur les dépôts amyloïdes de CL dans le contexte d'un déficit en FX dans l'amylose AL.

Par la suite nous avons exploré les processus biochimiques pouvant conduire au déficit en FX dans l'amylose AL. Ainsi après avoir produit des CL recombinantes, nous avons étudié leur capacité à se lier au FX. Nous avons montré que dans un contexte de déficit en FX, la CL se lie au FX et conduit à l'augmentation de l'endocytose du FX par les macrophages. Nous avons montré par ailleurs, que le déficit en FX dans l'amylose AL est un déficit par absence du FX et non par un défaut d'activité du FX.

Dans une seconde partie de ma thèse, nous avons exploré, dans un modèle de génération de thrombine, la capacité des cellules de la paroi des vaisseaux de l'aorte à générer un caillot de fibrine dans un plasma déficient en FVIII et en présence de FVIII, d'emicizumab et/ou de concentré de complexe prothrombique activé (aPCC). J'ai montré que les cellules endothéliales et les cellules musculaires servent de support à la génération de thrombine.

Cependant les cellules endothéliales expriment des protéines anticoagulantes comme la thrombomoduline et le TFPI, leur conférant ainsi un caractère moins procoagulant par rapport aux cellules musculaires lisses. L'ajout de FVIII ou d'emicizumab permet la génération de la thrombine de manière dose-dépendante. Mais nos données ont montré que l'emicizumab est moins efficace que le FVIII pour favoriser la génération de thrombine à la surface des cellules vasculaires. De plus, la combinaison d'emicizumab avec le FVIII n'augmente pas la génération de thrombine induite par le FVIII. En revanche, l'association d'emicizumab à l'aPCC a conduit à une génération explosive de thrombine. Enfin, nous avons montré que la stimulation des cellules endothéliales par le TNF- α conduit à l'expression des composants pro et anticoagulants ce qui a eu pour effet inattendu de mieux contrôler la génération de thrombine.

Title : Characterization of coagulation Factor X deficiency in light chain amyloidosis

Keywords : Haemostasis, Coagulation, Factor X (FX), AL amyloidosis, FVIII, emicizumab

Abstract : Hemostasis is the physiological phenomenon that enables an organism to seal damaged blood vessels, maintain blood fluidity and eliminate hemostatic plugs once vascular integrity has been re-established. Coagulation, in which various proteins called "Factors" activate each other to form an insoluble clot, plays a crucial role in this process. One of the most common coagulation abnormalities is hemophilia A (HA), a hemorrhagic disease caused by congenital deficiency of factor VIII (FVIII). HA manifests through bleeding, which mainly affects joints and muscles. It is managed by substitutive therapies. In the last few years, the management of HA has radically changed with the arrival of therapies such as emicizumab.

Factor X (FX) is an essential component of the coagulation process. It is produced by the liver and is involved from the earliest stages of coagulation. FX plays a central role in the enzymatic cascade that leads to the formation of a hemostatic plug. FX deficiency can also lead to severe hemorrhage. When not hereditary, FX deficiency is typically associated with a type of plasma cell dysplasia called light chain amyloidosis (AL). Light chain amyloidosis is a condition where overproduced immunoglobulin light chains lead to fibrillar deposits in different organs. The presence of FX deficiency further complicates the clinical picture with associated hemorrhagic manifestations. In the first part of this thesis, we analysed the mechanisms contributing to the development of FX deficiency in AL amyloidosis. It is commonly believed that FX adsorption onto amyloid deposits leads to FX deficiency. In a group of 3 patients, we analyzed the colocalization of FX with amyloid structures.

We found that FX is present specifically on light-chain amyloid deposits in the context of FX deficiency in AL amyloidosis. We further explored the biochemical processes that could lead to this deficiency. After producing recombinant light chains, we studied their ability to bind FX. In the context of FX deficiency, we found that the light chain binds FX, increasing its internalization by macrophages. We also demonstrated that FX deficiency in AL amyloidosis results from a quantitative defect and not from a lack of activity.

In the second part of this thesis, we investigated, the ability of aortic vessel wall cells to generate a fibrin clot in FVIII-deficient plasma and in the presence of FVIII, emicizumab and/or aPCC in a thrombin generation assay. In this work, we established that endothelial cells and muscle cells serve as a scaffold for thrombin generation. However, unlike smooth muscle cells, endothelial cells express anticoagulant proteins such as thrombomodulin and TFPI, making them less procoagulant. The addition of FVIII or emicizumab enables thrombin generation in a dose-dependent manner. However, our results show that emicizumab is less effective than FVIII in promoting thrombin generation on the surface of vascular cells. Furthermore, combining emicizumab with FVIII does not increase FVIII-induced thrombin generation. In contrast, combining emicizumab with aPCC resulted in explosive thrombin generation. Finally, TNF- α stimulation of endothelial cells leads to the expression of pro and anticoagulant components, however unexpectedly results in better control of thrombin generation.

Remerciements

Après quatre années intenses et enrichissantes, je suis honorée de présenter ce manuscrit de thèse, fruit d'un travail déterminé et guidé par la passion au sein du laboratoire U1176, sous la direction bienveillante et éclairée de Olivier CHRISTOPHE et Cécile DENIS. Le chemin parcouru fut semé d'obstacles, mais chaque défi a été une occasion de grandir et de démontrer ma résilience.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers Olivier CHISTOPHE mon directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance. Ton soutien constant et tes précieux conseils ont été indispensables tout au long de cette aventure académique. Tu as beaucoup donné de ton temps et de ton énergie pour m'accompagner dans ce travail. Les heures passées à discuter et à chercher des issues aux problèmes rencontrés dans ce projet, resteront dans mon souvenir précieux. En plus de ton encadrement scientifique, tes qualités humaines font de toi un excellent directeur de thèse.

Mes remerciements vont ensuite à Cécile DENIS, directrice de l'unité et codirectrice de ma thèse. Merci de m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Vos conseils rassurants, votre bienveillance et votre pragmatisme ont été essentiels dans la réalisation de ce travail de recherche. J'ai également une profonde reconnaissance pour Peter Lenting pour ses conseils experts, ses suggestions pragmatiques qui ont aidé à faire avancer ce projet.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance envers les membres de mon jury de thèse, qui ont accepté de consacrer leur temps et leur expertise à l'évaluation de ce travail. A Marc VASSE, Nadine AJZENBERG, ARNAUD JACCARD, Julien GIUSTINIANI et Véronique REGNAULT, vos suggestions et commentaires constructifs ont grandement enrichi ce manuscrit.

Je suis également reconnaissante envers toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à faire avancer ces travaux. A Ivan Peyron pour ton assistance technique. Tu as été d'un accompagnement sans failles sur tous les défis techniques de biologie moléculaire et de production bactérienne. A Éric BUN, pour sa disponibilité et ses contributions techniques, à Marie CLAVEL pour ses conseils techniques, à Vincent LICARI qui reprends le flambeau du projet amylose AL et bien sûr à tous les curieux qui voudront lire ce travail.

Un spécial merci à mes collègues doctorants. Rejoindre le bureau des doctorants a été salvateur et m'a permis de mener le reste de ma thèse dans la bonne humeur et dans un climat stimulant. En particulier Thibaud SEFIANE, Claire AUDITEAU, Alexis TEXIER, Jean SOLARZ, Toscane VIELLARD, Adeline BLANDINIERES et Mona MAHMOUD. Je ne manque pas de remercier Geneviève MC CLUSKEY, Christelle SOUKASSEUM, Sadyo DARAME et Josépha SEDJRO qui sans cesse, ont fait preuve de gentilles attentions. A vous tous qui m'avez soutenue, conseillée et réconfortée parfois.

Je remercie également nos collaborateurs de Poitiers, de Limoges et de Nancy. Merci à tous de m'avoir accueillie, fourni du matériel ou accompagnée dans les expérimentations.

Enfin je remercie ma famille, à qui je dédie ce travail. Merci d'être ma bulle de bonheur et mon soutien. Vous m'avez redonné de l'énergie à chaque fois que cela était nécessaire pour garder le cap. Je voudrais souligner à quel point il est précieux d'avoir à ses côtés un partenaire dévoué qui croit en nous. Caleb, Tiaani et Noah, je n'ai survécu à l'exigence de cette période que grâce à votre amour inconditionnel.

En conclusion, je voudrais reprendre les mots de Nelson Mandela, qui ont pu être dits par d'autres avant lui, « Notre plus grande force ne réside pas dans le fait de ne jamais tomber, mais dans notre capacité à nous relever à chaque chute ». Ces mots résument parfaitement le voyage que j'ai entrepris au cours de cette thèse, où chaque défi surmonté m'a permis d'évoluer et de devenir plus forte. Je sors grandie de cette aventure et je suis toute enjouée de découvrir la suite.

Table des matières

Liste des tableaux	10
Avant-propos	11
Introduction.....	13
A. Généralités sur l'hémostase.....	17
1. Vasoconstriction et hémostase primaire	17
2. La Coagulation.....	20
2.a. La phase d'initiation.....	22
2.b. Les phases d'amplification et de propagation.....	23
3. Fibrinolyse	25
4. Les pathologies les plus fréquentes de la coagulation.....	26
4.a. L'hémophilie A.....	27
4.b. Les thérapies de l'hémophilie.....	29
4.b.1 Le traitement substitutif et ses limites.....	29
4.b.2. Les nouvelles thérapies de l'hémophilie A	31
- Agents « by-passants »	31
- emicizumab	32
5. Approches d'études de la coagulation chez les patients hémophiles.....	36
B. Le facteur X : un acteur pivot dans la coagulation et au-delà	39
1. Structure du gène et de l'ARN messager	39
2. Biosynthèse et structure du FX	41
3. Voies d'activation du FX.....	44
4. Fonctions du FX/FXa dans la coagulation.....	45
5. Les fonctions du FX au-delà de l'hémostase	47
6. Anomalies liées au facteur X	49
6.a. Déficit en facteur X	49
6.a.1. Déficit congénital.....	51
6.a.2. Déficit acquis.....	52
C. L'amylose AL.....	54
1. Introduction.....	54
2. Epidémiologie	56
3. Etiologie de l'amylose AL.....	56
4. Les mécanismes moléculaires de l'amylose AL	58

4.a. Caractéristiques des chaînes légères impliquées dans l'amylose AL.....	59
4.b. Mécanisme de formation des fibrilles amyloïdes de chaînes légères	61
4.c. Structure des fibrilles : résultats des interactions avec le microenvironnement extracellulaire	63
5. Diagnostic de l'amylose AL	65
6. Traitements de l'amylose AL.....	67
7. L'amylose à chaîne légère et le déficit acquis en FX.	75
Objectifs de la thèse	77
Résultats expérimentaux.....	81
Chapitre 1 :	83
Identification du FX sur les dépôts amyloïdes dans l'amylose AL	83
Chapitre 2 :	109
Exploration biochimique du mécanisme de déficit en FX dans l'amylose à chaînes légères	109
Chapitre 3 :	159
Les cellules vasculaires comme support de la génération de thrombine d'un plasma hémophile A en présence de FVIII et ou d'emicizumab.....	159
Discussion générale	181
A) Caractérisation des mécanismes responsables du déficit en FX de la coagulation dans l'amylose à chaînes légères	183
B) Exploration de la capacité des cellules de la paroi vasculaire à induire la génération de thrombine en présence de traitements de l'hémophilie A	193
Perspectives.....	197
A) Caractérisation des mécanismes responsables du déficit en FX de la coagulation dans l'amylose à chaînes légères	199
B) Exploration de la capacité des cellules de la paroi vasculaire à induire la génération de thrombine en présence de traitements de l'hémophilie A	205
Références bibliographiques	207

Liste des abréviations

A

AAV	Adeno associated virus
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADP	Adénosine diphosphate
AL	Amylose à chaînes légères
ARN	Acide ribonucléique
ASCT	Cellules souches hématopoïétiques
ATP	Adénosine triphosphate

B

BCMA	B-cell maturation antigen
------	---------------------------

C

CDR	Complementarity determining regions
CHO	Cellules ovariennes d'hamster chinois
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée

D

DDAVP	Désamino-8-D-arginine vasopressine (Desmopressine)
DEX	Dexaméthasone

E

EGF	Epidermal growth factor
EHA	European hematology association
EHL	Extended half-life
EPCR	Endothelial Protein C receptor
ELISA	Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ETP	Endogenous Thrombin Potential

F

FDA	Food and Drug administration
FEIBA	Facteur de coagulation ayant une activité court-circuitant l'inhibiteur
FII	Facteur II

FIX	Facteur IX
FLC	Chaînes légères libres
FT	Facteur tissulaire
FVIII	Facteur VIII
FX	Facteur X
FXI	Facteur XI
FXII	Facteur XII
G	
GPVI	Glycoprotéine VI
H	
HA	Hémophilie A
I	
ISA	International Society of Amyloidosis
ISTH	International Society on Thrombosis and Haemostasis
K	
kDa	Kilodalton
Kdapp	Constante de dissociation
KHPM	Kininogène de haut poids moléculaire
L	
LB	Lisogeny Broth (milieu de culture)
LT	Temps de latence
M	
MGUS	Gammopathie monoclonal de signification indéterminée
MM	Myélome multiple
N	
NKT	Natural killer T cell
P	
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PAR	Protease-activated receptor
PCC	Concentré de complexe de prothrombine

PDB	Protein Data Bank
PET	Plasmide
PK	Prékallcreine
PL	Phospholipides
PMP	Million de personnes par an
R	
RKR	Arginine-Lysine-Arginine
S	
SAP	Serum amyloïde P
SERPIN	Inhibiteur de serine protéase
SLAM	Molécule d'activation lymphocytaire de signalisation
T	
TAFI	Inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine
TBRP	Très bonne réponse partielle
TCA	Temps de céphaline activée
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TGT	Test de génération de thrombine
THT	Thioflavine
TM	Thrombomoduline
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale alpha
TTP	Le temps au pic
TTR	Transthyrétine
V	
VH	Région variable de la chaîne lourde
VJ	Variable jonction
VLCL	Région variable et région constante (chaîne légère)
VWF	Facteur de Von Willebrand
W	
WM	Macroglobulinémie de Waldenström

X

XTEN Polypeptide hydrophile de fusion

Z

ZPI Inhibiteur dépendant de la protéine Z

Liste des figures

Figure 1 : Formation du thrombus plaquettaire.....	19
Figure 2 : Représentation classique de la cascade de la coagulation et ses facteurs.....	21
Figure 3 : Nouvelle vision physiologique de la coagulation.....	23
Figure 4 : Mécanisme de la fibrinolyse	26
Figure 5 : Traitement de l'hémophilie A au cours du temps	31
Figure 6 : Action mimétique du FVIII par l'emicizumab.....	32
Figure 7 : Récapitulatif des nouvelles thérapies et leurs cibles.....	34
Figure 8 : Les différents paramètres analysés du test de génération de thrombine	38
Figure 9 : Représentation schématique : du gène F10 à la structure du FX mature.	41
Figure 10 : Mécanisme de régulation du taux de FX par SR-AI et PTX2	44
Figure 11 : Du Facteur X au Facteur Xa.....	45
Figure 12 : Activation de la prothrombine par le complexe prothrombinase.....	46
Figure 13 : Le FX au-delà de la coagulation : représentation des principales fonctions décrites.....	48
Figure 14 : Mécanisme de formation des fibrilles amyloïdes.....	57
Figure 15 : Structure de fibrilles amyloïdes issues de 3 patients ²⁰⁸	62
Figure 16 : Structure en feuillet β des fibrilles issues d'un patient. ²⁰⁶	64
Figure 17 : Aperçu général des principaux traitements et de leurs cibles dans l'amylose AL.....	71
Figure 18 : Thérapies ciblant les dépôts amyloïdes.....	74

Liste des tableaux

Tableau I : Corrélation de la sévérité de l'hémophilie A aux taux résiduel de FVIII	28
Tableau II : Classification des déficits en FX.....	50
Tableau III : Principales formes d'amylose systémique en France.	55
Tableau IV : Différents systèmes de stadification de l'amylose al cardiaque.....	67
Tableau V : Critères d'évaluation de la réponse hématologique	69

Avant-propos

Pour ma carrière professionnelle, j'ai orienté mon cursus universitaire vers la pharmacie avec un parcours en biologie médicale. Dans ce contexte, j'ai effectué mes stages pratiques au sein de laboratoires d'hématologie. Ces expériences au Sénégal, ont nourri mon intérêt pour la prise en charge des troubles de l'hémostase.

Arrivée en France, j'ai voulu poursuivre dans le domaine de l'hémostase en m'orientant vers la recherche translationnelle. J'ai ainsi eu l'opportunité d'effectuer un parcours d'initiation à la recherche complété d'un stage au sein du laboratoire d'hématologie biologique de Cochin. Lors de ce stage, j'ai eu l'occasion de travailler avec le Dr Georges JOURDI sur l'intérêt particulier de monitorer les patients hémophiles B traités par un FIX recombinant à demi-vie prolongée par le test de génération de thrombine.

Par la suite, il m'a semblé utile de rentrer dans le vif de la recherche avec un master puis un doctorat en hémostase. C'est ainsi que j'ai rencontré les Dr Olivier CHRISTOPHE et CECILE DENIS qui m'ont proposé un sujet à la frontière entre l'hémostase et l'oncohématologie. J'avais l'honneur de travailler à comprendre les mécanismes du déficit en Facteur X de la coagulation dans l'amylose à chaînes légères. Cependant, le début du projet a été marqué par une première frustration du fait de la pandémie de la Covid-19 qui m'a empêchée de développer les premières techniques pendant mon stage de master 2. Toutefois, mon intérêt persistant pour ce projet novateur à haut potentiel et les nombreuses opportunités de projets de l'équipe U1176 m'ont poussée à persévérer et à obtenir une bourse de l'école doctorale pour la poursuite en thèse.

Nos résultats préliminaires mettaient en évidence une interaction des chaînes légères recombinantes avec le FX spécifiquement dans le cadre d'un déficit en FX et semblaient indiquer de nouvelles possibilités pour expliquer le mécanisme du déficit en FX dans l'amylose à chaînes légères.

Ce travail prometteur s'est aussi heurté à un manque d'outils et d'informations qui ont entraîné des difficultés notamment dans la production en quantité suffisante et la manipulation de chaînes légères amyloïdogènes et agrégantes.

Face à ces défis, et dans la continuité de mon intérêt pour la recherche dans le domaine de l'hémostase et ses liens avec les tissus, nous avons développé un second projet en collaboration avec l'équipe du Dr V. Regnault de Nancy. Ce projet s'est appuyé sur l'expertise du Dr Regnault à explorer la génération de thrombine *in vitro* dans le plasma avec un accent particulier sur la contribution des cellules artérielles vasculaires primaires dans ce processus. En effet, les tests *in vitro* permettant de mesurer l'activité coagulante d'un plasma utilisent généralement des vésicules phospholipidiques ou parfois des plaquettes. Cependant, physiologiquement, le plasma est exposé aux cellules vasculaires dans la circulation et ces cellules non seulement ont une composition phospholipidique caractéristique mais elles expriment vers la lumière vasculaire des protéines pro et anti coagulantes. Dans cette deuxième phase de ma thèse nous avons étudié l'influence des cellules artérielles primaires sur l'efficacité des traitements anti-hémophiliques, notamment le facteur VIII (traitement substitutif) et l'emicizumab, anticorps bispécifique mimant l'activité du facteur VIII. Les travaux de ce deuxième projet ont fait l'objet d'une publication dans une revue internationale à comité de lecture.

Introduction

L'hémostase est un ensemble de processus indispensables à l'organisme. Il constitue l'ensemble des phénomènes physiologiques qui permettent à un organisme de colmater les vaisseaux sanguins endommagés, de maintenir la fluidité du sang et d'éliminer les bouchons hémostatiques formés une fois l'intégrité vasculaire rétablie. Le système hémostatique est une machinerie très conservée au cours de l'évolution. Dans cette machinerie, la coagulation, au cours de laquelle diverses protéines appelées « Facteur » s'activent les uns les autres pour former un caillot insoluble, joue une partition prépondérante.

Un acteur clé de la coagulation est le Facteur VIII (FVIII) dont une anomalie du gène codant pour cette protéine est responsable de l'hémophilie A. Un faible taux de FVIII dans le plasma conduit à des épisodes de saignement affectant principalement les articulations et les muscles. Ces dernières années, la prise en charge de l'hémophilie A a radicalement changé, améliorant la qualité et l'espérance de vie des patients.

Un autre acteur jouant un rôle crucial au cours de la coagulation est le Facteur X (FX). C'est une glycoprotéine vitamine K dépendante, sécrétée par le foie et impliquée dès les premières phases de la coagulation en permettant la génération d'un thrombus à la suite d'un épanchement vasculaire. Sa position centrale dans la cascade enzymatique menant à la formation du caillot ou bouchon hémostatique lui confère une importance capitale. Son absence dans la circulation sanguine revêt ainsi une sévérité particulière. Le déficit en FX, hors contexte héréditaire, est le plus souvent lié à une dysplasie plasmocytaire agrégante appelée amylose à chaîne légères (AL).

L'amylose à chaînes légères est une protéinopathie au cours de laquelle la surproduction de chaînes légères d'immunoglobulines monoclonales conduit à des dépôts fibrillaires au niveau de divers organes. La présence d'un déficit en FX en complique davantage le tableau clinique, en y associant des manifestations hémorragiques.

L'introduction de ce manuscrit de thèse est structurée en trois sections. Dans la première partie est décrite l'hémostase, notamment la coagulation et ses désordres les plus fréquents. Une attention particulière sera portée sur l'hémophilie A, avec une description de ses manifestations et des traitements associés. La deuxième partie se focalise sur le FX en examinant sa physiologie, son importance dans la coagulation tout en décrivant ses

implications au-delà de ce processus. Les états pathologiques liés à son déficit seront également abordés. La troisième et dernière partie est consacrée à l'amylose à chaînes légères abordant la description des phénomènes physiopathologiques, les thérapies disponibles, les mécanismes moléculaires ainsi que son lien particulier avec le déficit acquis en FX de la coagulation.

A. Généralités sur l'hémostase

L'hémostase regroupe l'ensemble des phénomènes physiologiques qui concourent à la formation d'un caillot lors d'un épanchement sanguin. Elle permet l'arrêt du saignement en bouchant la brèche vasculaire. Elle permet également la prévention des saignements. Une hémostase efficace est donc essentielle au maintien de l'intégrité vasculaire et à la fluidité du sang. Le plus souvent, ce processus complexe se subdivise en quatre parties. Cependant, il faut noter qu'in vivo, ces différents phénomènes sont interdépendants et complémentaires. De façon pratique et successive on distingue, la vasoconstriction, l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse. L'ensemble de ces phénomènes fait intervenir plusieurs acteurs que sont les plaquettes, les vaisseaux et différentes protéines, nommées les facteurs de la coagulation.¹ L'hémostase primaire fait référence à une vasoconstriction initiale qui a lieu après une lésion vasculaire et avec ensuite une adhésion, une activation et une agrégation des plaquettes permettant la formation du bouchon hémostatique. La coagulation est l'activation d'une cascade de réactions enzymatiques dont la finalité est de générer de la thrombine qui va cliver le fibrinogène en un réseau de fibrine insoluble. La fibrine forme un maillage autour du bouchon hémostatique qui consolide et stabilise le caillot. Bien que la vasoconstriction et l'hémostase primaire interviennent en premier lieu, il existe un chevauchement entre l'hémostase primaire et la coagulation. Certaines plaquettes au sein de l'agrégat deviennent pro-coagulantes, contribuant de manière significative à la liaison entre ces deux processus. Les facteurs de coagulation se lient aux plaquettes pro-coagulantes, favorisant leur concentration et stimulant les réactions enzymatiques conduisant à la génération de thrombine. Finalement, dans les étapes terminales, le système fibrinolytique est activé, entraînant la dissolution du caillot sanguin au cours du processus de cicatrisation, afin de rétablir un flux sanguin normal dans le vaisseau.

1. Vasoconstriction et hémostase primaire

La face interne des vaisseaux en contact avec le sang est tapissée d'une couche de cellules endothéliales. Dans les conditions physiologiques, les plaquettes dans le sang circulent à proximité des parois vasculaires, mais sont protégées des composants hautement réactifs par

la couche endothéliale saine qui constitue une "barrière" naturelle non adhésive. En effet, les cellules endothéliales présentent une strate de glycanes à leur surface luminale qui agit en surface anti coagulante et repousse les plaquettes. Aussi, les cellules endothéliales sécrètent notamment le monoxyde d'azote (NO), la prostaglandine I₂ (PGI₂, prostacycline) et la CD39, une ecto-ADPase présente à leur surface. Cette dernière hydrolyse de faibles quantités d'ADP, prévenant ainsi l'activation des plaquettes. L'action combinée de ces molécules inhibe l'adhésion et l'agrégation plaquettaires.^{2,3} De plus, les récepteurs clés de l'adhésion cellulaire exprimés par les plaquettes circulantes quiescentes restent insensibles aux protéines adhésives plasmatiques en phase fluide. Par exemple, le Facteur de von Willebrand (VWF) plasmatique et le fibrinogène subissent des changements de conformation lorsqu'ils sont adsorbés ("immobilisés") sur des surfaces biologiques ou artificielles. Ce sont ces conformations actives qui permettent une fixation de ces ligands aux plaquettes.

Lors d'une brèche vasculaire, le sous endothélium thrombogène est exposé. La première étape de l'hémostase primaire est vasculaire. C'est le vaisseau qui subit une contraction due à des spasmes réflexes et à des stimuli neuronaux au niveau des cellules musculaires lisses. Cette vasoconstriction est temporaire, et nécessite d'être maintenue tout au long du processus hémostatique. Certains agents libérés notamment par l'endothélium lésé (comme l'endothéline-1), ou par les plaquettes activées, comme la sérotonine et le thromboxane A₂ (TXA₂) sont de puissants vasoconstricteurs. Cette contraction initiale entraîne la diminution du flot sanguin et va favoriser l'accumulation des plaquettes au site de la lésion. La deuxième étape de l'hémostase primaire est plaquettaire et consiste en l'adhésion des plaquettes à la paroi vasculaire. Les plaquettes qui ralentissent sont rapidement capturées via une liaison réversible de leur glycoprotéine Ib (GPIb-V-IX) au VWF lié au collagène sous-endothélial. À ce stade initial, le VWF provient du plasma et/ou des corps de Weibel-Palade, organites des cellules endothéliales stockant du VWF multimérisé, tandis que, dans des phases ultérieures, la sécrétion plaquettaire à partir des α -granules fournit une source endogène de VWF. Cette interaction entre le VWF et la GPIb est caractérisée par un taux d'activation-inactivation rapide qui favorise l'adhésion transitoire se traduisant par un roulement des plaquettes à la surface de la paroi vasculaire. Une deuxième interaction entre la glycoprotéine plaquettaire GPVI et

le collagène vasculaire est nécessaire à la stabilité de l'adhésion des plaquettes⁴⁻⁶. L'adhésion des plaquettes déclenche ensuite l'activation de divers mécanismes de signalisation, conduisant notamment à l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ par changement de conformation et à l'activation des plaquettes.^{7,8} L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ plaquettaire, désormais en mesure de se lier à ses ligands avec une haute affinité, joue un rôle essentiel dans l'adhésion stable et favorise l'immobilisation de protéines plasmatiques solubles telles que le VWF, le fibrinogène et la fibronectine à la surface des plaquettes fermement attachées, déclenchant ainsi l'agrégation plaquettaire.^{9,10} Les plaquettes activées, changent de forme, émettent des pseudopodes et enrichissent le micro-environnement de la lésion par la sécrétion de médiateurs solubles, incluant le thromboxane A2 (TXA₂), l'ADP, l'épinéphrine et la sérotonine entretenant ainsi l'accumulation et l'agrégation de nouvelles plaquettes.^{11,12}

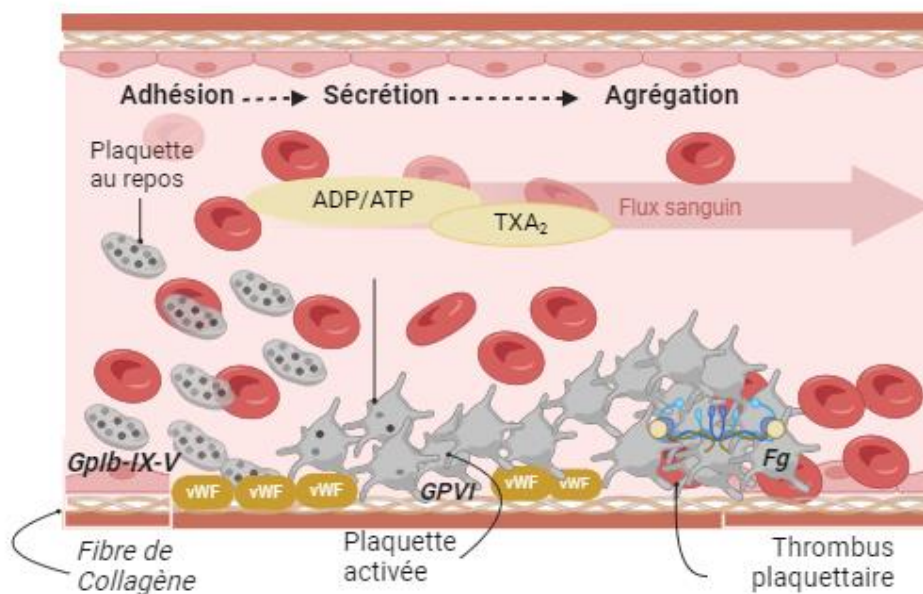


FIGURE 1 : FORMATION DU THROMBUS PLAQUETTAIRE

Les plaquettes sanguines s'activent rapidement au contact d'une paroi vasculaire lésée, elles adhèrent au VWF (Facteur de von Willebrand) exposé grâce à la GPIb-IX-V et au collagène via la GPVI. Elles changent de forme, s'étalent sur la surface et sécrètent des molécules proagrégantes telles que l'ADP, l'ATP et la TXA₂. Ces composés permettent le recrutement de plaquettes circulantes pour renforcer le clou hémostatique, composé principalement de plaquettes liées entre elles grâce au fibrinogène (Fg). ADP/ATP : Adénosine Diphosphate / Adénosine Triphosphate ; TXA₂ : Thromboxane A₂.

Ainsi, l'hémostase primaire aboutit à la formation d'un agrégat plaquettaire, constitué de plaquettes liées les unes aux autres via le fibrinogène et le VWF, au site de blessure (Figure

1). Tout au long du processus de l'hémostase primaire, les plaquettes exposent des lipides anioniques à leur surface où les facteurs de la coagulation viendront s'assembler d'une façon optimale conduisant à générer très efficacement de la thrombine qui est l'activateur le plus puissant des plaquettes, et permettre ainsi la coagulation par conversion du fibrinogène insoluble en fibrine. ¹³ De plus, le Facteur Tissulaire (FT) localement exposé entraîne la génération rapide de thrombine aux sites de dénudation endothéliale. Les réponses des plaquettes à la thrombine sont largement médiées par les membres de la famille des PAR (Protease-activated receptor). Le PAR-1 est le principal récepteur de la thrombine chez les plaquettes humaines, ainsi que le PAR-4. Par ailleurs, la thrombine peut également activer les plaquettes par liaison à la GPIIb du complexe GPIIb-IX-V plaquettaire. ¹²

2. La Coagulation

La coagulation est un ensemble de réactions enzymatiques intriquées et successives qui se déroule à la surface des membranes cellulaires. Elle fait intervenir divers facteurs qui s'activent à la chaîne et conduit à la formation de la fibrine, une protéine indispensable à la consolidation du thrombus plaquettaire, généré lors de l'hémostase primaire.

Initialement, la coagulation était décrite comme une cascade enzymatique où deux voies d'initiation, intrinsèque et extrinsèque, se rencontrent pour poursuivre en une voie commune débouchant sur la génération de la thrombine. Les réactions consistent en l'activation de zymogènes par des enzymes activées en amont. La voie extrinsèque est appelée ainsi puisque déclenchée par le FT et la voie intrinsèque, parce que les éléments impliqués sont tous plasmatiques (Figure 2). Cette vision où les deux voies de coagulation sont séparées a prévalu depuis le 19^e siècle. ^{14,15}

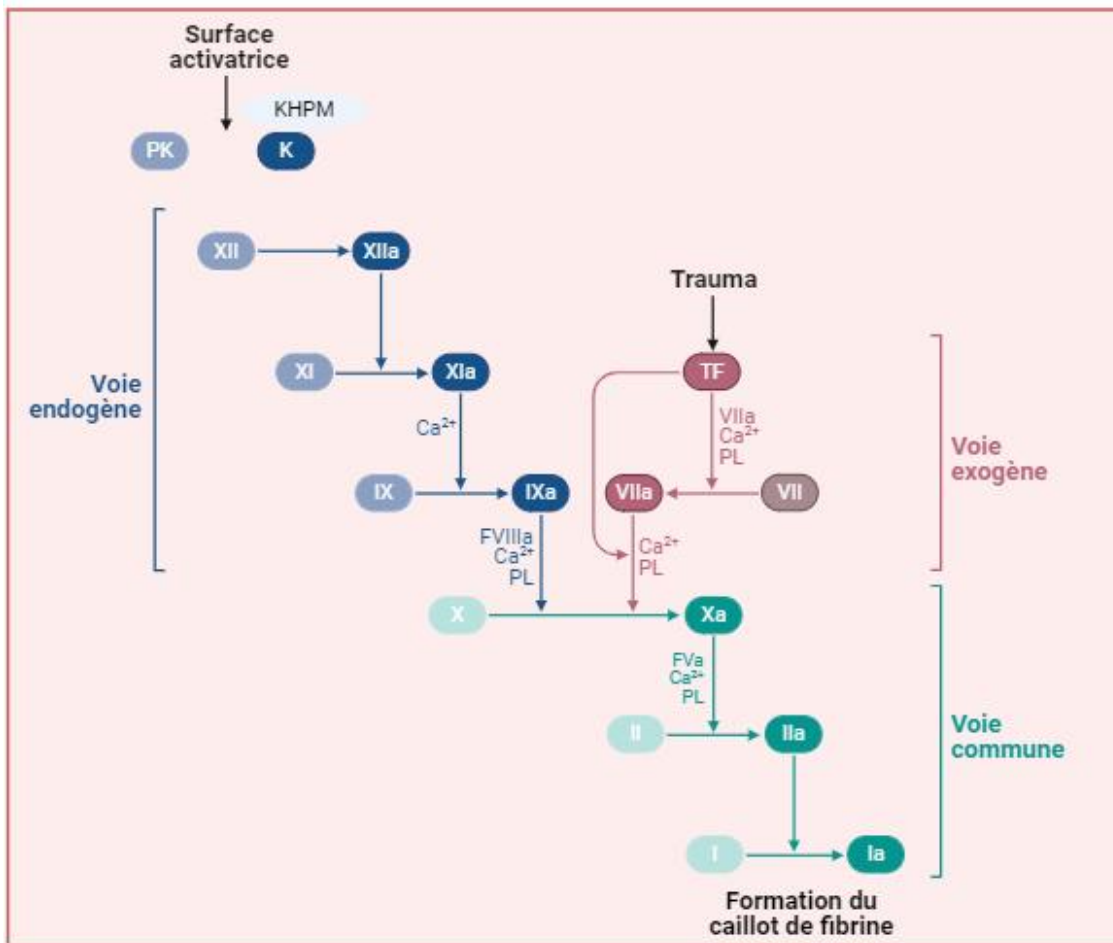


FIGURE 2 : REPRESENTATION CLASSIQUE DE LA CASCADE DE LA COAGULATION ET SES FACTEURS

Deux voies d'initiation de la coagulation débouchent sur une voie commune qui conduit à la formation d'un caillot de fibrine par polymérisation du fibrinogène soluble en fibrine. Les flèches représentent les réactions enzymatiques. A chaque étape, un zymogène est activé par une enzyme activée en amont. F (facteur) et leurs numéros en chiffres Romains ; a : forme activée des facteurs ; Ca²⁺ : calcium ; PL : Phospholipides ; KHPM : kininogène de haut poids moléculaire ; PK Prékallicroïne ; K : Kallicroïne

La conception actuelle soutenue par les recherches plus récentes conçoit l'hémostase comme un phénomène global incluant des interactions complexes de la plaquette avec le sous endothélium et le milieu extracellulaire ¹⁶ et conduisant jusqu'à la cicatrisation et à la protection de la barrière endothéliale. ¹⁷⁻¹⁹ Dans cette nouvelle vision, la coagulation est redéfinie comme un processus global, dynamique et cellulaire composé de trois phases : l'initiation, l'amplification et la propagation. ²⁰

En résumé, l'exposition du FT par le sous-endothélium, induite par des lésions vasculaires génère la formation de traces de thrombine exerçant des effets multiples sur d'autres facteurs de coagulation et sur les plaquettes. Par le biais de multiples boucles d'amplification dans le

système de coagulation et dans l'activation des plaquettes, de grandes quantités de fibrine sont générées et stabilisent le thrombus plaquettaire déjà formé.

2.a. La phase d'initiation

La coagulation est déclenchée par l'exposition du sang aux composants protéiques et cellulaires du sous endothélium (collagène, cellules musculaires lisses, fibroblastes...).^{21,22} Ces cellules expriment à leur surface le FT qui est un récepteur de haute affinité pour le Facteur VII (FVII) et le FVII activé (FVIIa). Le FT, en se liant au FVII, favorise son auto activation aboutissant à la formation d'un complexe FT-FVIIa. Le complexe FT-FVIIa ainsi formé, génère les premières traces de Facteur X activé (FXa) et de Facteur IX activé FIXa en clivant respectivement le FX et le FIX, en présence de calcium (Figure 3).²⁰ Le FXa généré permet la formation des premières traces de thrombine qui vont induire une agrégation locale des plaquettes, l'activation des cofacteurs critiques à la coagulation, le Facteur V (FV) et le Facteur VIII (FVIII), et l'activation du Facteur XI (FXI).

En résumé, la thrombine, enzyme capitale de la coagulation est générée dans la phase d'initiation. Elle active divers facteurs dans l'objectif d'amplifier sa propre production et de générer suffisamment de fibrine.²³

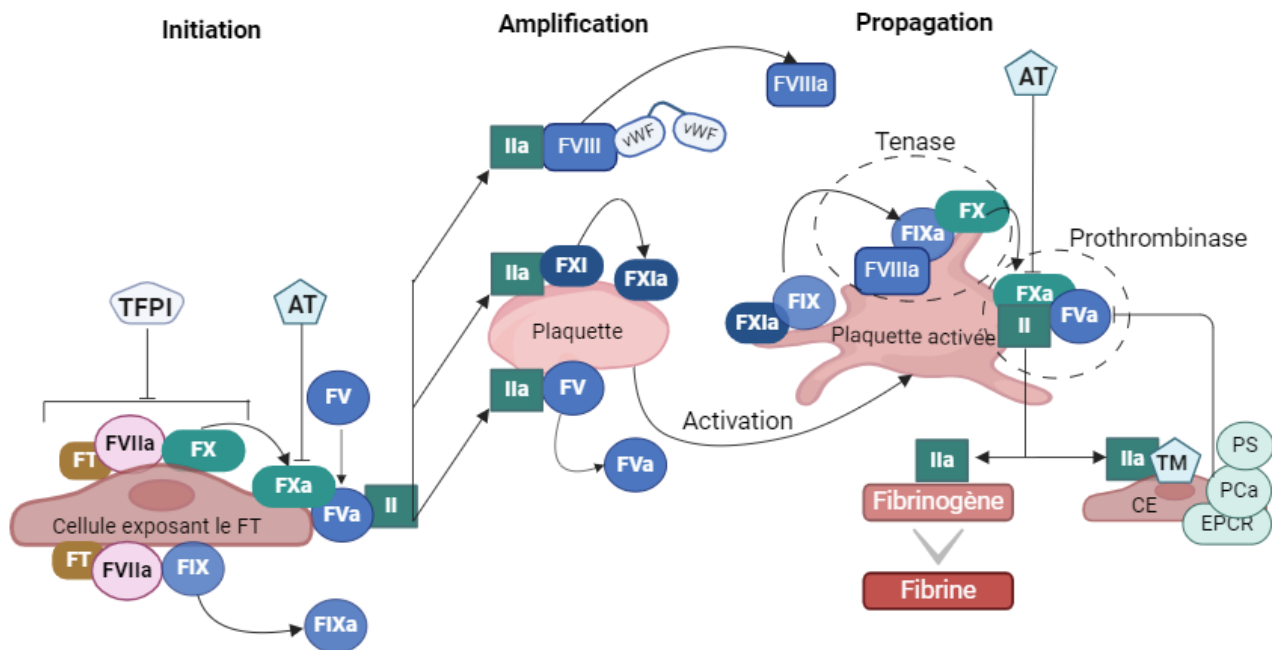


FIGURE 3 : NOUVELLE VISION PHYSIOLOGIQUE DE LA COAGULATION

La coagulation est initiée par l'exposition du facteur tissulaire (FT) par les cellules du sous endothélium. Elle s'amplifie grâce à la formation des premières traces de thrombine et se propage sur les membranes plaquettaires grâce aux complexes prothrombinase et tenase. La génération de la thrombine (IIa) est l'étape clé de la coagulation. Elle active les facteurs pro-coagulants nécessaires à sa propre génération mais aussi des facteurs anticoagulants pour réguler et contenir sa propre génération grâce à un rétrocontrôle négatif. F (facteurs) et leurs numéros en chiffres Romains ; a : état activé des facteurs ; TFPI : Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire ; AT, antithrombine ; VWF : Facteur de von Willebrand ; CE : Cellule endothéliale, TM : Thrombomoduline ; PCa : Protéine C activée ; PS : Protéine S ; EPCR : récepteur endothélial de la protéine C.

2.b. Les phases d'amplification et de propagation

Les premières traces de thrombine générées lors de la phase d'initiation, s'accumulent et activent des boucles rétroactives pour conduire à l'activation de davantage de plaquettes. Parallèlement, la thrombine active le FV libéré par les plaquettes activées, en FV activé (FVa). Ce dernier agit en cofacteur du FXa formé dans l'initiation. Ensemble avec les phospholipides et le calcium, ils forment le complexe appelé « complexe prothrombinase ».²⁴ Ce complexe accélère de 200 000 fois l'efficacité catalytique du FXa vis-à-vis de la prothrombine in vitro.²⁵⁻²⁷ La thrombine en permettant la formation de ce complexe grâce à la formation du FVa augmente donc elle-même sa propre génération.

La thrombine convertit également le FVIII en FVIII activé (FVIIIa). Celui-ci agit en cofacteur du FIX activé (FIXa) dans un complexe appelé « complexe tenase » pour activer plus de FX.²⁸ Ces deux boucles qui s'entretiennent conduisent à l'accumulation de la thrombine au site de la blessure vasculaire. La thrombine active également le FXI, un facteur de l'ex voie intrinsèque, dont on pense désormais qu'il permet lui aussi l'amplification de la boucle du complexe tenase.

Cependant, le processus de la coagulation ne se limite pas au compartiment sous endothélial où il a démarré. La thrombine activant de plus en plus de plaquettes, ce processus se propage en même temps qu'il s'amplifie du fait de la formation des complexes tenase et prothrombinase. En effet, ces complexes se forment à la surface des plaquettes activées exprimant les phospholipides pro-coagulants notamment la phosphatidylsérine.

Il faut noter que les premières quantités de FXa peuvent être inhibées par les anticoagulants circulants notamment l'antithrombine (AT) et l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI pour tissue factor pathway inhibitor).^{29,30} Il est alors important que le FIXa qui n'est pas une cible du TFPI, prenne la suite du complexe FT-FVIIa, aidé de son cofacteur le FVIIIa pour amplifier la génération de thrombine.

Le complexe tenase notamment a donc une importance capitale dans la génération de grandes quantités de thrombine. Ainsi, les anomalies quantitatives et ou qualitatives affectant les FVIII et FIX de la coagulation sont responsables de troubles hémorragiques appelés respectivement hémophilie A et B.

Physiologiquement la coagulation est le plus souvent initiée suivant la voie du FT dite voie extrinsèque. Il est toutefois possible qu'elle soit initiée dans certaines situations par la voie d'activation passant par le facteur XI (FXI) qui est activé par les facteurs contacts (FXII, Prékallitrène, Kininogènes de Haut Poids Moléculaire) après exposition aux composants du sous-endothélium, mais l'importance de cette voie d'activation est mineure.^{31,32}

La génération de la thrombine est l'étape ultime de la cascade de coagulation. En effet la thrombine est l'enzyme responsable de la polymérisation du fibrinogène en réseau de fibrine. Cette étape est nécessaire à la consolidation du caillot plaquettaire formé lors de l'hémostase primaire. De plus, la thrombine générée est l'enzyme clé de la coagulation.

Elle possède à la fois des effets pro-coagulants, anticoagulants, fibrinolytiques et pro-activateurs plaquettaires.³³

En conclusion, il est crucial de noter que la coagulation a lieu principalement à la surface cellulaire et fait intervenir des récepteurs et voies de signalisation qui sont eux-mêmes impliquées dans d'autres processus tels que l'immunité ou l'inflammation, créant ainsi des liens entre la coagulation et ces divers mécanismes.^{34,35}

3. Fibrinolyse

La fibrinolyse est un processus finement régulé qui permet le rétablissement de la fluidité de la circulation sanguine. Elle consiste en la dissolution du caillot précédemment formé, une fois la blessure vasculaire réparée. La protéase principalement impliquée dans ce processus est appelée la plasmine. C'est une sérine protéase à spectre large, impliquée dans divers processus physiopathologiques mais dont le substrat le plus connu est la fibrine. Son rôle consiste donc à cliver la fibrine formée lors de la coagulation en produits de dégradation monomériques et dimériques (D-Dimer), qui sont ensuite éliminés de la circulation (Figure 4).

36

La plasmine est issue de l'activation de son précurseur, le plasminogène circulant. Son activation est assurée par deux enzymes, l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) sécrété par les cellules endothéliales et l'activateur de plasminogène type urokinase (uPA) produit par les monocytes/macrophages et l'épithélium urinaire. L'activation médiée par le tPA est déclenchée lorsque le tPA et la plasminogène sont liés à des matériaux insolubles comme la fibrine. L'activation médiée par l'uPA passe elle en revanche par la fixation de l'uPA aux surfaces cellulaires par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques (uPAR).³⁷

La régulation du processus fibrinolytique passe par différents mécanismes comme la régulation des activateurs de la plasmine (tPA et uPA) par le PAI-1 (inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1) et la protéase nexine 1 (PN1). La plasmine est également directement inhibée par l'alpha2-antiplasmin (α 2AP)³⁸ et l'alpha2 macroglobuline.³⁹ L'autre régulateur connu de la fibrinolyse est le TAFI (Inhibiteur de la fibrinolyse activable par la

thrombine), un inhibiteur activé par la thrombine et dont l'action est potentialisée par fixation de la thrombine à la thrombomoduline (TM) exprimée par les cellules endothéliales. ⁴⁰

En résumé, la fibrinolyse est une étape importante de l'hémostase qui assure la dissolution du caillot de fibrine formé lors de la coagulation et permet ainsi le rétablissement de la circulation sanguine. Au-delà de l'hémostase, il a également été montré que ce système complexe participe à la réparation et au remodelage des vaisseaux et que le système d'activation du plasminogène joue un rôle bien au-delà des processus de coagulation et de saignement. Ces domaines englobent l'immunité, l'inflammation et l'élimination des amyloïdes. ⁴¹

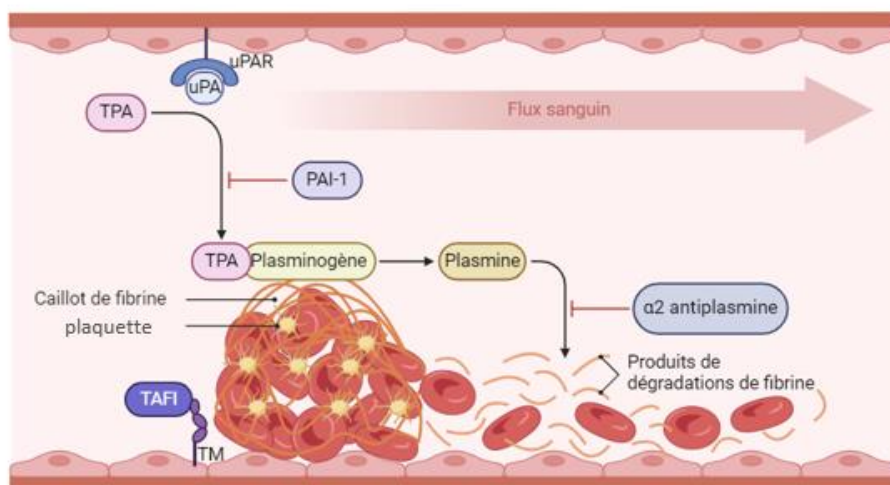


FIGURE 4 : MECANISME DE LA FIBRINOLYSE

La fibrinolyse est initiée par les activateurs du plasminogène qui convertissent le plasminogène circulant en sa forme active, la plasmine, pour permettre la dégradation de la fibrine. Les produits solubles de dégradation de la fibrine (PDFs) sont ensuite éliminés de la circulation. La régulation de la plasmine passe par un inhibiteur direct, l' α 2-antiplasmine ou par l'effet d'inhibiteurs de ses activateurs. (PAI-1 ; TAFI) Divers récepteurs cellulaires, dont ceux du plasminogène et du récepteur activé par la protéase de l'urokinase, localisent les facteurs fibrinolytiques à l'intérieur du système vasculaire afin d'augmenter l'activation du plasminogène médiée par la présence de thrombus. Adapté de Mutch et al, ⁴¹

4. Les pathologies les plus fréquentes de la coagulation

Les pathologies de la coagulation sont des troubles qui affectent le processus normal de coagulation du sang. Elles peuvent entraîner une tendance accrue aux saignements. C'est

l'exemple de l'hémophilie A, une maladie grave qui se caractérise par des manifestations hémorragiques.⁴²

4.a. L'hémophilie A

L'hémophilie A est une maladie hémorragique causée par le déficit en FVIII de la coagulation. Le déficit est le résultat de mutations pouvant affecter le gène codant pour le FVIII, conduisant à une anomalie qualitative ou quantitative de cette protéine. C'est un des troubles les plus fréquents de la coagulation, représentant 80 à 85 % de l'ensemble des hémophilies.⁴³ C'est une maladie héréditaire liée au chromosome X qui touche généralement les hommes, tandis que les femmes sont le plus souvent porteuses.⁴⁴ La prévalence de la maladie est d'environ 1 sur 5000 à 10000 naissances masculines.⁴⁵ L'expression phénotypique chez la femme est rare et peut s'apparenter à une hémophilie mineure lorsque l'expression du FVIII est comprise entre 40 et 60 %.⁴³ L'hémophilie sévère touche les femmes dans certains rares cas d'inactivation du chromosome X normal ou dans les communautés consanguines et naissances résultant de liaisons entre une femme porteuse et un homme hémophile.^{44,46}

La sévérité de la maladie est variable et corrélée au taux résiduel circulant du FVIII de la coagulation. Il est ainsi possible de distinguer 3 groupes de patients : les patients avec une hémophilie A sévère avec un taux de FVIII inférieur à 1 UI/dL (Valeurs de référence : 50 à 150 % ou 50 à 150 UI/dL chez l'adulte et l'enfant) ; les patients avec une hémophilie A modérée ou mineure avec respectivement un taux de FVIII compris entre 1-5 UI/dL (1-5%) ou entre 5-40 UI/dL (5-40%).⁴⁷

Sur le plan clinique, l'hémophilie A se manifeste par des épisodes hémorragiques internes non contrôlés. La gravité et la fréquence de ces manifestations sont fortement corrélées au taux de FVIII plasmatique circulant. La forme sévère de l'hémophilie A, se caractérise par la présence fréquente de saignements spontanés qui entraînent des lésions progressives, principalement au niveau des articulations et au niveau des tissus mous. Elle présente un phénotype hémorragique sévère et peut se manifester dès le début de la vie notamment par des hémorragies intracrâniennes.^{43,48} mais bien souvent, les manifestations hémorragiques n'apparaissent que lors de l'apprentissage de la marche. Les saignements chroniques au niveau des articulations, appelés hémarthroses, conduisent au développement

d'arthropathies fortement invalidantes, en particulier au niveau des hanches et des genoux, et sont associées une morbidité élevée. ⁴⁹ Chez les patients hémophiles modérés, les saignements peuvent à l'occasion être spontanés, mais le plus souvent, ils surviennent après des traumatismes peu importants. En ce qui concerne les hémophiles mineurs, les saignements sont rarement spontanés mais surviennent en général à la suite d'un traumatisme majeur ou à une intervention chirurgicale. Le tableau I récapitule la relation entre la sévérité des symptômes et le taux de FVIII.

TABLEAU I : CORRELATION DE LA SEVERITE DE L'HEMOPHILIE A AUX TAUX RESIDUEL DE FVIII

Degré de sévérité	Taux résiduel de FVIII (Valeurs de référence : 50 à 150 %)	Manifestations cliniques
Sévère	<1 UI/dL	<ul style="list-style-type: none"> • Saignement spontané dans les articulations (hémarthroses) ou dans les muscles principalement en l'absence de traumatisme identifiable.
Modéré	1-5 UI/dL (1-5%)	<ul style="list-style-type: none"> • Saignement spontané occasionnel • Saignement prolongé lors d'un traumatisme mineur ou d'une intervention chirurgicale
Mineure	5-40 UI/dL (5-40%)	<ul style="list-style-type: none"> • Les saignements spontanés sont rares • Hémorragie grave lors d'un traumatisme majeur ou d'une intervention chirurgicale.

4.b. Les thérapies de l'hémophilie

Une fois qu'il était établi que l'hémophilie A était due à l'absence du FVIII, son traitement a principalement consisté à apporter une source de FVIII exogène. Depuis les années 1960 à nos jours, les traitements de l'hémophilie A, ont considérablement évolué, passant des cryoprécipités plasmatiques, aux concentrés de FVIII recombinant ou de FVIII d'origine plasmatique, puis aux traitements contournant ou mimant l'action du FVIII. Toutes ces améliorations ont permis aux patients des pays économiquement développés de disposer d'un large panel d'outils thérapeutiques. Dans ce chapitre, nous discuterons dans un premier temps des thérapies de remplacement et de leurs limites puis nous discuterons des nouvelles stratégies de traitement développées ces dernières années en mettant l'accent sur l'emicizumab, un anticorps mimant la fonction du FVIII.

4.b.1 Le traitement substitutif et ses limites

Les objectifs classiques du traitement de l'hémophilie A sont de prévenir les saignements, de minimiser le risque de complications à long terme associées aux lésions articulaires et d'améliorer la qualité de vie en maintenant des niveaux appropriés de FVIII.

Jusque dans les années 1980, le traitement était limité à la thérapie à la demande, c'est-à-dire la perfusion de concentrés après l'apparition de l'hémorragie.⁵⁰ Même si cette option de thérapie peut arrêter le saignement, les dommages aux articulations ou aux muscles commencent en général quelques heures après l'apparition du saignement. De nombreuses études ont établi l'avantage d'une prophylaxie par rapport à la thérapie à la demande sur la santé des articulations.⁵¹⁻⁵³ La prophylaxie avec les traitements substitutifs en FVIII a été le traitement de référence pour les patients atteints d'hémophilie A pendant de nombreuses années, permettant un contrôle adéquat des saignements. Elle consiste en l'administration intraveineuse de FVIII à fréquence régulière. (2 à 3 jours pour le FVIII à demi-vie standard). La prophylaxie par FVIII est efficace mais pose un problème d'observation, notamment chez les jeunes enfants et chez les personnes avec une difficulté d'accès aux veines, du fait de la récurrence des injections intraveineuses. Pour répondre à ces enjeux, du FVIII recombinant à

durée de vie allongée a été développé. Après les premières tentatives pour prolonger la demi-vie circulante du FVIII grâce à plusieurs stratégies de conjugaison ou de fusion, il est rapidement apparu que la clairance du FVIII était dominée par le VWF et que, tant que cette influence ne serait pas surmontée, il serait impossible de prolonger de manière plus significative la demi-vie du FVIII. Cet objectif a été récemment atteint grâce à l'élégante bio-ingénierie de la molécule chimérique FVIII-domaines D'D3 du VWF, l'efanesoctocog alfa ou BIVV001. Ce FVIII recombinant élaboré est composé d'une seule protéine de FVIII recombinante et de trois composants supplémentaires qui contribuent à sa demi-vie accrue: un domaine Fc qui facilite le recyclage par la voie du récepteur Fc néonatal, un domaine du VWF (D'D3) de liaison au FVIII pour découpler la chimère de FVIII du VWF endogène, et deux polypeptides XTEN pour protéger l'efanesoctocog alfa de la dégradation protéolytique et de la clairance. Il a le potentiel de fournir des niveaux d'activité du FVIII proches de la normale pendant la majeure partie de la semaine, prolongeant ainsi la protection contre les saignements avec une dose hebdomadaire unique.⁵⁴

La complication majeure de la prophylaxie substitutive par FVIII, est le développement d'anticorps contre le FVIII injecté, notamment chez l'hémophile A sévère.^{55,56} Il s'agit d'anticorps classiques comme ceux observés en réponse à un antigène exogène à l'organisme. Ils sont dits « inhibiteurs » parce qu'ils peuvent neutraliser l'activité pro-coagulante du FVIII et sont titrés en Unités Bethesda (UB/mL). La présence des inhibiteurs (notamment à plus de 5 UB/ml) rend le traitement par FVIII inefficace exposant les patients à plus de risques de saignements graves et à la dégradation de leur qualité de vie.^{57,58} Le développement d'inhibiteurs survient chez 5 à 30% des patients HA sévères.⁵⁹ Les raisons de leur apparition sont multiples. Ils tiennent entre autres de la dose administrée, de l'immunogénicité intrinsèque du FVIII, de l'âge d'initiation de la prophylaxie, mais aussi sur des mutations propres au système immunitaire du patient comme des polymorphismes du gène de l'interleukine 10 (l'IL-10) et du TNF alpha (facteur de nécrose tumorale).⁶⁰⁻⁶² Pour éradiquer l'inhibiteur, une induction de tolérance immune (ITI) peut être initiée. Elle fait appel à l'administration régulière et répétée de fortes doses de FVIII.

4.b.2. Les nouvelles thérapies de l'hémophilie A

Pour répondre aux divers problèmes posés par les thérapies substitutives à savoir la durée de vie limitée du FVIII entraînant des injections trop récurrentes ainsi que le développement des inhibiteurs qui représente une impasse thérapeutique, d'autres thérapies ont vu le jour. Elles sont appelées thérapies non substitutives. On retrouve des agents permettant de court-circuiter l'action du FVIII dans la coagulation appelés agents « by-passants » et de nouvelles molécules mimant l'activité du FVIII comme l'emicizumab. D'autres thérapies favorisent la coagulation en inhibant les anticoagulants naturels. Un récapitulatif des thérapies utilisées dans l'hémophilie A depuis les années 1950 est présenté dans la figure 5.

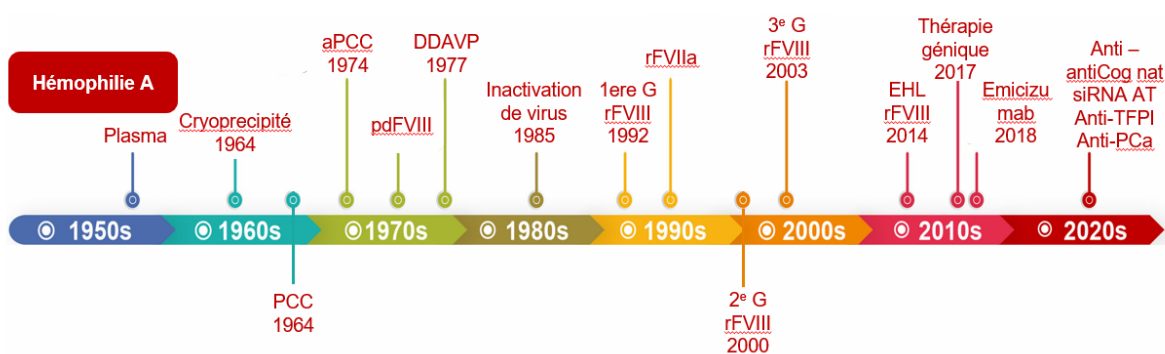


FIGURE 5 : : TRAITEMENT DE L'HEMOPHILIE A AU COURS DU TEMPS

Adapté de Ozelo et al ; ⁶³ PCC : Concentré de complexe prothrombinique; aPCC : Concentré de complexe prothrombinique activé; pdFVIII : Facteur VIII dérivé du plasma; DDAVP : Desmopressine; rFVIII : Facteur VIII recombinant; rFVIIa : Facteur VII activé recombinant; EHL rFVIII : Facteur VIII recombinant à longue durée de demi-vie; siRNA AT : ARN interférant contre l'antithrombine; Anti-TFPI : anticorps dirigé contre l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire; Anti-PCa : anticorps inhibiteur de la protéine C activée.

- Agents « by-passants »

Il s'agit de molécules permettant de contourner l'action du FVIII dans la coagulation. Elles ont été utilisées pour répondre à la demande de traitement pour les patients ayant développé des inhibiteurs contre le FVIII. Ces molécules sont le FVII activé d'origine recombinante (NovoSeven, Novo Nordisk ®) qui permet la génération de thrombine par la voie extrinsèque avec l'aide de son cofacteur le FT, ^{64,65} et le concentré de protéines du complexe prothrombinique activé (activated Prothrombin Complex Concentrates – aPCC). L'aPCC, dont

le FEIBA® de Baxter est le seul commercialisé, est constitué de toutes les enzymes et cofacteurs nécessaires à la génération de thrombine (prothrombine, FVIIa, le FIXa, le FXa...) ⁶⁶

- emicizumab

L'emicizumab, (Hemlibra®), est un anticorps monoclonal humanisé de type IgG4 bispécifique contre le FIX activé (FIXa) et le FX qui, imite la fonction de cofacteur du FVIII manquant dans l'hémophilie A. Il se lie simultanément au FIXa et au FX, les rapprochant dans l'espace pour favoriser l'activation du FX catalysée par le FIXa et rétablissant ainsi une hémostase efficace (Figure 6). ⁶⁷ Approuvé par l'EMA en 2018, l'emicizumab est utilisé cliniquement chez les patients hémophiles A avec ou sans inhibiteurs. ⁶⁸

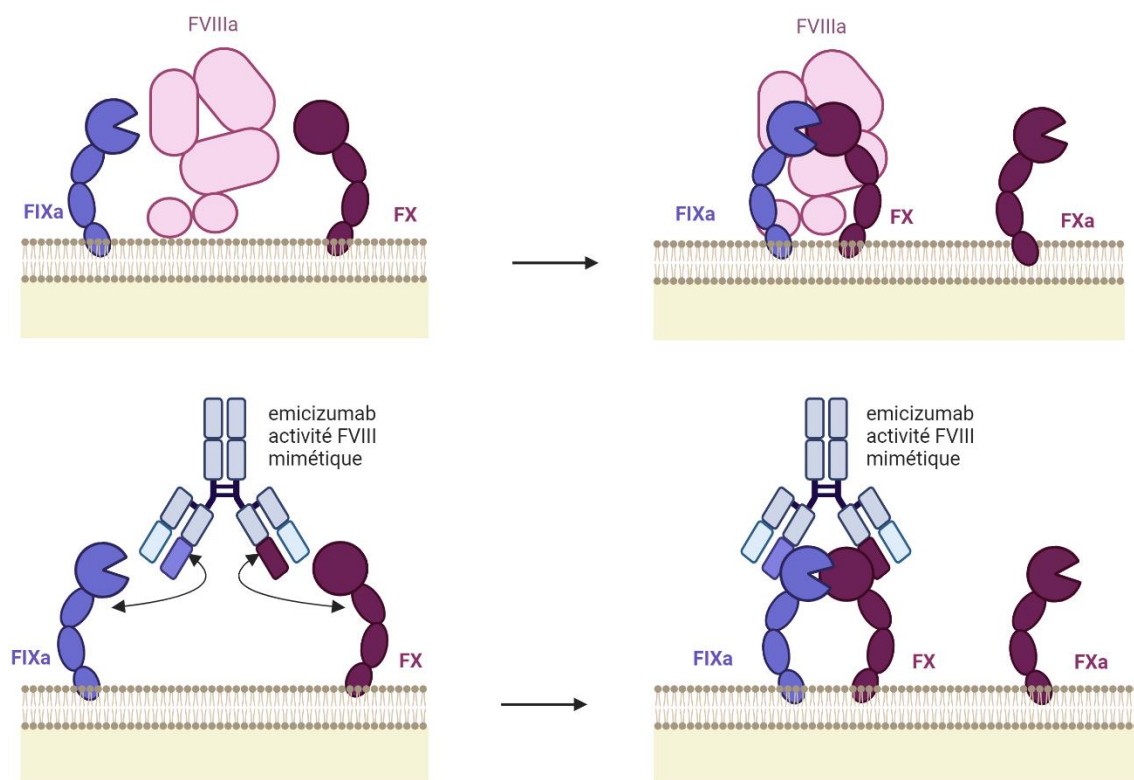


FIGURE 6 : ACTION MIMÉTIQUE DU FVIII PAR L'EMICIZUMAB

Contrairement au FVIII qui présente une demi-vie d'environ 12 à 16 h, emicizumab présente une demi-vie allant de 4 à 5 semaines, ce qui permet des schémas d'administration plus espacées qu'avec le FVIII. En effet, emicizumab étant une immunoglobuline, n'est pas éliminé de la circulation par les mêmes mécanismes physiologiques que le FVIII. Il bénéficie des mécanismes de recyclage intracellulaire médiée par les récepteurs FcRn et persiste donc beaucoup plus longtemps dans la circulation que le FVIII. Selon le RCP du produit (Résumé des caractéristiques du produit, Hemlibra®, Roche) la prophylaxie avec emicizumab consiste en une injection par semaine à la dose de 3 mg/kg pendant les quatre premières semaines de traitement (dose de charge). Les patients ont ensuite le choix pour les doses d'entretien entre une dose par semaine de 1,5 mg/kg à partir de la cinquième semaine ou 3 mg/kg toute les deux semaines, ou 6 mg/kg toutes les 4 semaines.

L'absence de ressemblance moléculaire entre l'emicizumab et le FVIII permet également son utilisation chez les patients ayant des inhibiteurs du FVIII, ce qui en fait un outil thérapeutique utile lorsque l'induction de la tolérance immunitaire et la prophylaxie par les agents by-passants ont échoué. De plus, grâce à sa voie d'administration sous-cutanée, la prophylaxie par emicizumab permet de réduire la charge de traitement associée aux fréquentes perfusions intraveineuses de facteur.⁶⁹

Différentes études cliniques multicentriques ont confirmé l'efficacité d'emicizumab dans la prévention des saignements chez les patients hémophiles A avec ou sans inhibiteurs contre le FVIII. Les essais cliniques HAVEN (1 à 4) ont évalué le nombre de saignements annuels (ABR : Annual bleeding rate) et ont rapporté un ABR médian de 1,4 sur une durée de 120 semaines. Emicizumab est indiqué en prophylaxie pour prévenir les épisodes hémorragiques chez les hémophiles A dans toutes les tranches d'âge. L'indication concerne les patients avec ou sans inhibiteurs anti FVIII.

Le traitement a fait ses preuves concernant la sécurité d'emploi. Cependant emicizumab est indiqué en prophylaxie, ce qui suppose l'ajout d'autres agents hémostatiques supplémentaires (by-passants ou FVIII) lors d'épisodes hémorragiques ou pendant les

interventions chirurgicales. Aucun effet synergique n'a été suggéré lors de l'utilisation conjointe d'emicizumab et du FVIII. L'utilisation du rFVIIa s'est également avérée efficace sans effets indésirables signalés. Néanmoins, l'utilisation concomitante d'emicizumab et d'aPCC a entraîné des complications thrombotiques notamment lors de l'essai clinique HAVEN 1. ⁷⁰⁻⁷²

D'autres thérapies s'affranchissant des schémas classiques basés sur l'utilisation du FVIII ont été développés ou sont en cours de développement. Certaines de ces thérapies émergentes favorisent l'hémostase en inhibant les anticoagulants naturels. Ils visent à rétablir un équilibre hémostatique en inhibant l'axe anticoagulant. On retrouve le Concizumab et le Marstacimab, deux anticorps monoclonaux dirigés contre différents domaines du TFPI, ^{73,74} et le Fitusiran, ⁷⁵ un ARN interférent dirigé contre l'antithrombine. ^{76,77} D'autres thérapies non substitutives sont en cours de développement comme le Mim8, un autre anticorps bispécifique anti FIXa et FXa. ⁷⁸ La figure 7 récapitule les principaux nouveaux traitements et leurs cibles.

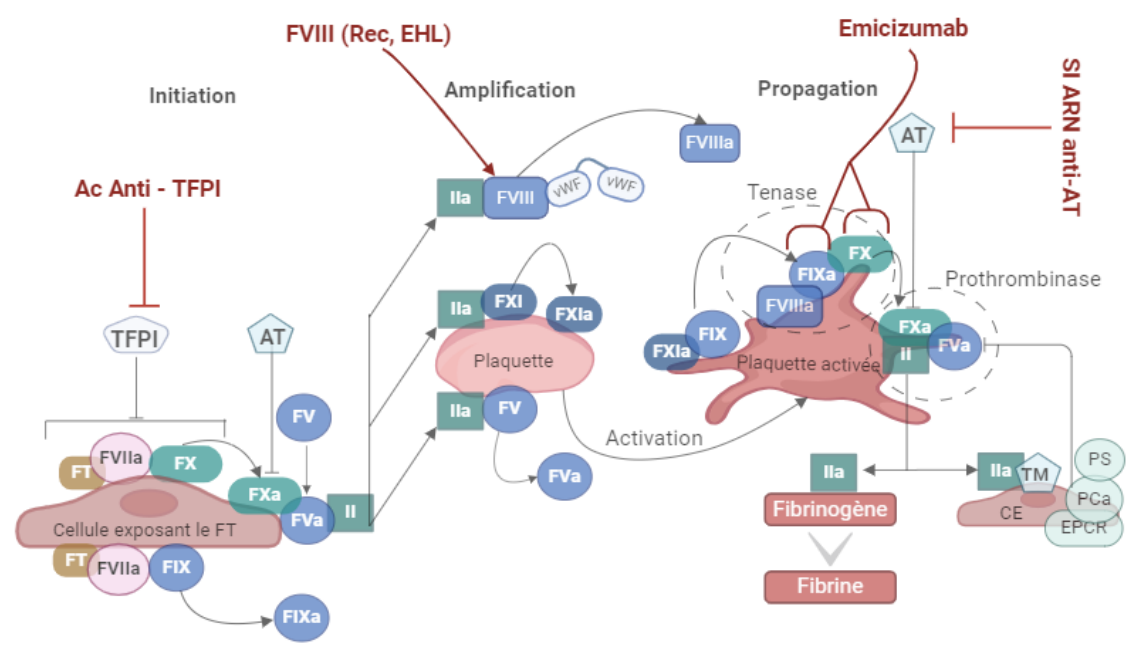


FIGURE 7 : RECAPITULATIF DES NOUVELLES THERAPIES ET LEURS CIBLES

Ac anti TFPI : Anticorps inhibiteur de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire ; FVIII (Rec, EHL) : Facteur VIII, recombinant ou à longue durée de demi-vie ; Si-ARN anti AT : petit ARN interférant anti antithrombine.

L'une des grandes innovations dans le traitement de l'hémophilie est la thérapie génique. C'est une nouvelle modalité de traitement efficace qui permet de contourner les complications des autres thérapies abordées auparavant.⁷⁹ La thérapie génique consiste en la perfusion unique d'un vecteur viral, qui entraîne la transduction d'un gène codant pour le facteur déficient avec l'objectif d'apporter au patient une thérapie efficace en une intervention unique.

Contrairement à l'hémophilie B, les approches de thérapie génique pour l'hémophilie A, se sont heurtées à des difficultés spécifiques au FVIII qui ont retardé sa mise en place. En effet, la taille du transgène pour le FVIII dépassait la capacité du vecteur viral pressenti. La stratégie a donc consisté à tronquer l'ADNc du FVIII humain de son domaine B, à priori non impliqué dans l'activité pro-coagulante du FVIII.⁸⁰⁻⁸² Le premier traitement de l'hémophilie A par thérapie génique a ainsi été récemment été approuvé par les autorités de régulation américaines et européennes : il s'agit de l'AAV5-hFVIII-SQ (valoctocogene roxaparvovec), qui cible l'expression de l'ADNc du facteur VIII dans le foie. Le suivi sur 2 ans des patients lors de l'essai clinique a en effet conclu à une persistance de l'efficacité hémostatique malgré des élévations transitoires des taux d'alanine aminotransférase (transaminases hépatiques).⁸³ Si la thérapie génique laisse entrevoir la possibilité d'un traitement unique pour l'hémophilie A, elle présente toutefois un certain nombre de limites qui sont encore à l'étude, notamment la toxicité hépatique en ce qui concerne tous les AAV avec un tropisme hépatique et la préexistence des anticorps anti-capsides ou l'induction d'une nouvelle réponse humorale neutralisante contre les AAV. Dans le cas spécifique de l'hémophilie A, le ciblage des hépatocytes qui ne sont pas les producteurs physiologiques du FVIII pèse sans doute sur la variabilité inter et intra individu observée mais aussi la diminution progressive de la production du FVIII qui est observée.^{82,84-87}

5. Approches d'études de la coagulation chez les patients hémophiles

L'introduction des nouveaux traitements discutés plus haut induit de nouveaux enjeux pour le suivi des patients.⁸⁸ En effet, pour les patients traités par les thérapies de remplacement de FVIII, le suivi classique consiste en un dosage spécifique du FVIII. A cette fin, les tests utilisés sont des tests de coagulation chromométriques basés sur le temps de céphaline activée (TCA) ou des tests d'activité chromogénique basés sur l'utilisation des protéines purifiées soit d'origine humaine, soit d'origine bovine.

Le monitoring des nouvelles thérapies a fait émerger des différences majeures au niveau des résultats obtenus par ces deux tests principaux dans le suivi des effets hémostatiques de ces nouveaux traitements.^{89,90}

- Exemple de la prophylaxie avec emicizumab

Les concentrations d'emicizumab mesurées dans les études cliniques HAVEN sont stables à partir de la cinquième semaine de traitement, entre 30 et 50 µg/mL ce qui implique une pharmacocinétique prévisible chez tous les patients. De plus, les données récentes montrent une prévention constante des saignements dans l'intervalle d'administration, quel que soit le schéma d'administration choisi.⁹¹ Le suivi biologique de routine n'est donc pas nécessaire pour les patients sous prophylaxie emicizumab. Néanmoins l'évaluation de l'effet hémostatique des traitements peut être nécessaire dans des situations complexes comme lors d'épisodes hémorragiques nécessitant l'utilisation d'autres agents hémostatiques (FVIII, agents by-passants) ou dans les rares cas de développement d'anticorps anti emicizumab.⁹²

Le test de dosage de l'activité du FVIII basé sur le TCA mesure le temps nécessaire à la formation d'un caillot, notamment le temps nécessaire pour l'activation du FVIII en FVIIIa par la thrombine. Dans le cas des patients sous prophylaxie avec emicizumab, l'utilisation du test basé sur le TCA donne des temps de coagulation très raccourcis puisque emicizumab ne nécessite pas d'activation par la thrombine. Il agit directement en rapprochant le FIXa du FX.

Dans le test chromogénique, le plasma du patient est dilué et mélangé avec du facteur X (FX) purifié, du facteur IXa (FIXa), des phospholipides, de la thrombine et des ions Ca²⁺. Cela

conduit à la génération de FXa, dont la quantité est analysée en utilisant un petit substrat synthétique qui est hydrolysé par le FXa.^{93,94} Les kits de test utilisant des facteurs de coagulation d'origine humaine réagissent à emicizumab, et peuvent surestimer le potentiel hémostatique clinique d'emicizumab. En revanche, les kits de test utilisant des facteurs de coagulation d'origine bovine sont insensibles à emicizumab et peuvent être utilisés pour surveiller l'activité du FVIII endogène ou perfusé.

Pour évaluer l'effet hémostatique, les tests globaux d'évaluation comme le test de génération de thrombine (TGT), offre une issue intéressante.⁹⁵

Le test de génération de thrombine est un test dit « global » car il reflète toutes les réactions pro- et anticoagulantes qui régulent la formation et l'inhibition de la thrombine. Il consiste en une mesure continue de la génération thrombine. Ainsi, il permet d'analyser les phases d'amplification et de propagation (où une grande quantité de thrombine est générée) et la phase de terminaison (où la formation de thrombine est arrêtée par des voies anticoagulantes et où toute l'activité de la thrombine est inhibée par des protéases plasmatiques). Remis au goût du jour dans les années 1990 par le Pr. Hemker,⁹⁶ des efforts ont été faits pour normaliser et automatiser le test.

Ce test qui couvre la coagulation de son initiation à son inhibition offre la possibilité d'évaluer les différentes voies en utilisant différents déclencheurs (FXIa ou FT). Contrairement aux tests qui mesurent le temps nécessaire à la formation d'un premier caillot, le TGT suit la cinétique de la formation de l'enzyme capitale de la coagulation qu'est la thrombine. En outre, le TGT permet également d'inclure d'autres participants physiologiques de la coagulation qui ne peuvent pas être étudiés par les tests chronométriques et chromogéniques. Le test de génération de thrombine est modulable. Des modèles en sang total, en plasma riche en plaquettes ou à la surface de cellules diverses ont ainsi été développés.^{70,97,98} Dans ce dernier cas, il permet d'étudier les propriétés pro- et anti-coagulantes des surfaces cellulaires. Il faut noter que dans la version classique du TGT des vésicules phospholipidiques sont rajoutées dans le milieu réactionnel pour servir de surface pro-coagulante aux complexes de la coagulation.

Concrètement, la formation de thrombine dans le plasma à tester est déclenchée par de petites quantités de facteur tissulaire (FT) et de phospholipides, et la génération de thrombine est surveillée en permanence au moyen d'un substrat fluorogénique spécifique. Le signal fluorescent est enregistré en continu durant une période pouvant aller jusqu'à 2 heures. Il est ensuite converti en concentration de thrombine grâce à un calibrant (Thrombin calibrator ; Stago). Ce dernier est formé d'un complexe α 2-macroglobuline-thrombine qui clive le substrat fluorescent à vitesse constante et est exprimé en unité équivalent de thrombine.⁹⁷

Quatre paramètres sont principalement discutés dans la figure 8

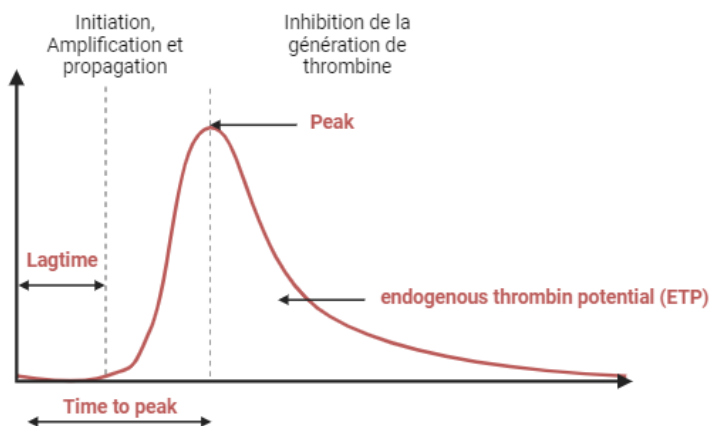


FIGURE 8 : LES DIFFERENTS PARAMETRES ANALYSES DU TEST DE GENERATION DE THROMBINE

- Le temps de latence (lag time, LT) qui correspond au temps écoulé entre le moment du déclenchement de la coagulation et le moment où une concentration d'environ 10-30 nM de thrombine est atteinte. Il est le reflet de la phase d'initiation et s'exprime en minutes
- Le temps au pic (time to peak, TTP) qui correspond au temps écoulé entre le moment du déclenchement de la coagulation et le moment où la quantité maximale de thrombine est atteinte et s'exprime en minutes

La hauteur de pic (peak height, PH) qui correspond à la concentration maximale de thrombine générée, elle est le reflet de la phase d'amplification de la coagulation et s'exprime en nmol/L (nM)

- L'aire sous la courbe aussi appelée potentiel endogène de thrombine (endogenous thrombin potential, ETP) qui reflète la quantité totale de thrombine formée et est exprimée en nM.min.

B. Le facteur X : un acteur pivot dans la coagulation et au-delà

Un des acteurs clés de la coagulation, du fait de sa position centrale dans la cascade enzymatique est le FX. Cette glycoprotéine synthétisée par le foie circule dans le sang sous forme de zymogène à une concentration environnant 8-10 µg/ml. Il a été identifié pour la première fois vers la fin des années 1950 par deux équipes indépendantes. *Telfer et al.* en 1956 rapportent le cas d'une patiente présentant des troubles hémorragiques dus au déficit d'un facteur de la coagulation alors nommé Facteur Prower. En 1957, l'équipe de *Hougie* décrit à son tour un profil anormal de la coagulation dû au déficit d'une protéine alors nommé Facteur Stuart. Le Facteur Stuart-Prower sera plus tard purifié et caractérisé à partir de plasma humain.^{99,100} Un accent sera mis sur la plupart des aspects de la biologie du FX dans les sections suivantes.

1. Structure du gène et de l'ARN messager

Le gène du FX humain, noté *F10*, est situé au site 13q34-ter sur le bras long du chromosome 13. Il mesure environ 22 kilobases (kb) et est approximativement situé 28kb en aval du gène du facteur FVII de la coagulation. Il contient 8 exons séparés par 7 introns. Une forte relation existe entre l'organisation du gène et la structure de la protéine. En effet chacun des 8 exons code pour un domaine d'homologie de structure du précurseur du FX. Tous ces domaines sont codés par des exons (E I-EV III) comme montré sur la figure 9. L'exon 1 (E I) code pour le peptide signal, l'exon 2 (E II) pour le propeptide et un domaine riche en acides gamma-carboxy-glutamiques ou domaine Gla, l'exon 3 (E III) pour un court segment de liaison d'acides aminés (aa) aromatiques, les exons 4 et 5 (E IV et E V) codent pour les domaines

homologues à l'Epidermal Growth factor (EGF), les domaines EGF 1 et 2. L'exon 6 (E VI) code pour la région contenant le peptide d'activation et les exons 7 et 8 (E VII) et (E VIII) pour le domaine catalytique contenant le site actif de type serine protéase.¹⁰¹ L'organisation du gène du FX présente une forte similitude avec les gènes d'autres facteurs vitamine K-dépendants de la cascade de la coagulation comme le facteur IX (FIX), le facteur VII (FVII) ou la protéine C (PC). Les recherches sur l'évolution des protéases de la coagulation ont conduit à l'hypothèse selon laquelle les gènes de ces protéines ont évolué à partir d'un gène ancestral commun.¹⁰²

Les structures tri-dimensionnelles qui résultent de ces gènes, sont ainsi, elles aussi, similaires, à l'exception de certains acides aminés spécifiques permettant de différencier les fonctions de ces facteurs.

L'ADNc du F10 est constitué de 1474 bases. Parmi celles-ci 1344 bases codent pour les 488 acides aminés de la protéine mature, tandis que les 120 situées en amont (5') codent pour le peptide signal et le propeptide du FX. Une zone non traduite de 10 bases précède la queue Poly A à l'extrémité 3'. Le signal de polyadénylation se retrouve ainsi intégré dans la séquence codante de l'ARNm du FX.

L'épissage alternatif du gène *F10* génère de multiples variants de transcrits codant pour différentes isoformes de la protéine qui subissent ensuite un traitement protéolytique similaire afin de générer des polypeptides matures.¹⁰³

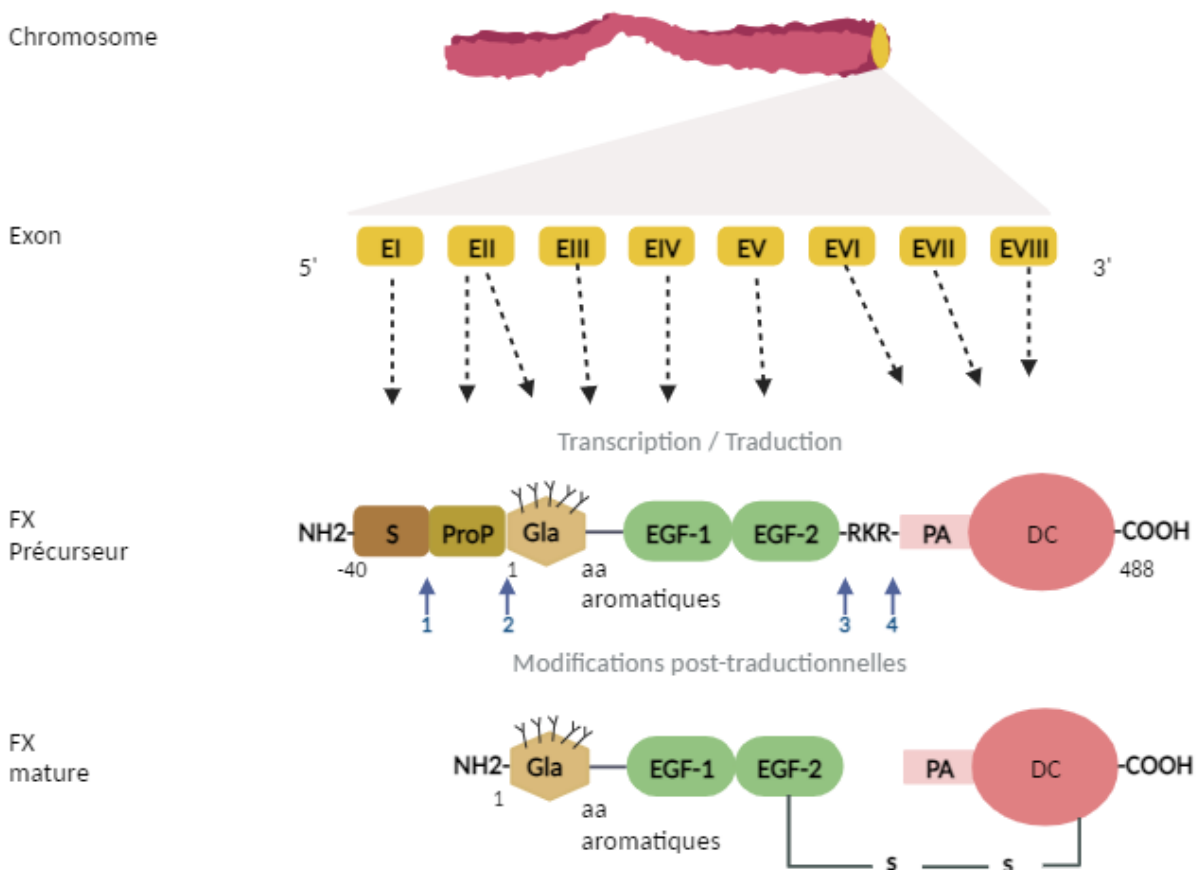


FIGURE 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE : DU GENE F10 A LA STRUCTURE DU FX MATURE.

Le gène *F10* comporte 8 exons séparés par 7 introns. Il est situé en position terminale du bras q du chromosome 13 (13q34-ter). Chacun des exons code pour un domaine d'homologie de la protéine précurseur (Pré-pro-FX). L'exon I code pour le peptide signal (S), l'exon II pour le propeptide (ProP) et le domaine Gla. L'exon III pour le segment d'acides aminés (aa) aromatiques, les exons IV et V codent pour les domaines homologues à l'Epidermal Growth factor (EGF- 1 & 2). L'exon VI code pour le peptide d'activation (PA) et les deux exons VII et VIII codent pour le domaine catalytique (DC).

Les flèches (↑) représentent les sites de clivage permettant de passer de la protéine précurseur (FX Précurseur) au zymogène mature (FX mature). Dans l'ordre, clivage du peptide signal (1), du propeptide (2), de la région arginine-Lysine-Arginine, -RKR-, (3 et 4) permettant le passage à la protéine bicaténaire. Les acides aminés gamma-carboxyglutamiques sont représentés par Υ sur le domaine Gla.

2. Biosynthèse et structure du FX

Le FX synthétisé par le foie est une pré-pro-protéine qui subit différentes modifications post-traductionnelles afin d'aboutir au FX mature, bicaténaire, retrouvé dans le plasma.¹⁰⁰ Ce précurseur contient le peptide signal et le propeptide (aa -40 à -1) codés respectivement par l'exon 1 et l'exon 2 (figure 9). Le peptide signal a pour rôle d'orienter la protéine précurseur vers le réticulum endoplasmique, où les premières modifications post-traductionnelles sont effectuées. Dans ce contexte, la pré pro-protéine perd de son peptide signal et subit la γ -

carboxylation des 11 acides glutamiques situés dans le domaine Gla, après le propeptide, à l'extrémité amino-terminale.

Cette γ -carboxylation est réalisée grâce à la présence du propeptide, d'une enzyme appelée γ -carboxylase et son cofacteur, la vitamine K réduite. La γ -carboxylation du domaine Gla, permet au FX de se lier aux membranes pro-coagulantes en présence de calcium. Ensuite, dans le même compartiment endoplasmique, deux résidus du FX humain, Asn181 et Asn191 sont soumis au processus de N-glycosylation.^{104 105} Dans l'appareil de Golgi, il y a une O-glycosylation supplémentaire sur les résidus Thr159 et Thr171 du peptide d'activation du FX humain.¹⁰⁶ Ces étapes sont suivies de la conversion en acide β -hydroxyaspartique de l'Asp63 du premier domaine EGF. Ceci permettrait un changement de conformation favorable à l'activation du FX en présence de calcium¹⁰⁷ De plus, lorsque la protéine est transportée à travers le réseau trans Golgien, le propeptide est clivé par une protéase. Ensuite, un processus de clivage protéolytique se produit entre Arg139 et Ser143 conduisant à l'élimination d'un tripeptide basique interne, Arg-Lys-Arg (RKR), et à la formation d'une molécule à deux chaînes, maintenues ensemble par une liaison disulfure (figure 9).

Le FX mature circule dans le plasma sous forme d'une glycoprotéine bicaténaire de 445 aa. On distingue à partir de l'extrémité N-terminale la chaîne légère de 17 kDa constituée du domaine Gla, suivie par un enchaînement d'acides aminés aromatiques, puis par deux domaines EGF. Le domaine Gla est responsable de la liaison du FX aux phospholipides des membranes, comme les plaquettes activées, en présence de calcium. Quant aux domaines EGF-like, des études structurales ont montré qu'ils contiennent un feuillet beta majeur et un feuillet beta mineur, reliés entre eux par trois ponts disulfures et terminés par des boucles en épingle de cheveux.¹⁰⁸ La chaîne lourde du FX, d'un poids de 49 kDa, contient le peptide d'activation et le domaine catalytique à l'extrémité C-terminale. Le peptide d'activation, situé dans la première partie de l'extrémité N-terminale de la chaîne lourde contient les sites de O- et N-glycosylation du FX. Il a été démontré que ces derniers jouent un rôle déterminant dans le mécanisme de clairance du FX.¹⁰⁹ L'activation du zymogène FX, en enzyme FXa passe par une protéolyse spécifique du pont arginine-isoleucine en position 195-196 libérant ainsi le peptide d'activation. Le domaine catalytique du FX appartient à la famille des serines

protéases de type trypsine. Il est intéressant de noter que le domaine catalytique du FX est homologue à celui des autres sérines protéases de l'hémostase (FVII, FIX, PC, thrombine) du fait d'une structure primaire très conservée. Les régions conservées sont séparées de régions variables conférant à ces enzymes des spécificités particulières qui les différencient.

Les deux chaînes du FX sont reliées entre elles, par un pont disulfure entre le deuxième domaine EGF et le domaine catalytique.

Le FX une fois secrété par les hépatocytes, circule dans le sang avec une demi-vie d'environ 24 à 48 heures chez l'homme. Des études récentes de notre équipe ont montré qu'il circulait en majorité complexé à une protéine constitutionnelle appelée la pentraxine 2 (PTX2 ou SAP pour serum amyloid P component)^{110,111}. Le mécanisme est illustré ci-après dans la figure 10. Bien que le mécanisme de clairance du FX n'a pas encore été identifié, notre équipe a mis en évidence que ce complexe jouait un rôle fondamental dans la régulation des taux circulants de la protéine. En effet, notre équipe a montré que les taux de ces deux protéines sont corrélés à la fois chez la souris et chez l'homme via un processus original. Le complexe FX/PTX2 circulant se lie à la surface des macrophages au scavenger receptor A-1 (SRA-1). Via cette interaction, les macrophages, malgré leur fonction de principaux phagocytes de l'organisme, vont permettre l'accumulation du complexe à leur surface ce qui va constituer un réservoir de FX qui sera libéré ultérieurement. Ce processus réduit la cinétique de clairance du FX. Ainsi, lorsque le complexe FX/PTX2 n'est pas formé ou qu'il y a un défaut de présence du récepteur SRA-1 on observe une clairance accélérée du FX et de la PTX2. Ce mécanisme de régulation de taux circulants du FX via des interactions avec des partenaires qui sont impliqués dans d'autres processus biologiques que l'hémostase est responsable du fait que le FX a une demi-vie relativement plus longue que celle observée pour des protéines de la coagulation possédant une structure similaire comme le FIX (demi-vie de 18 à 24h), le FVII (demi-vie de 3 à 6h) ou la protéine C (demi-vie de 6 à 10h). A l'inverse, une fois activé, le FXa se lie à l'alpha 2 macroglobuline et subit un catabolisme hépatique extrêmement rapide.¹¹²

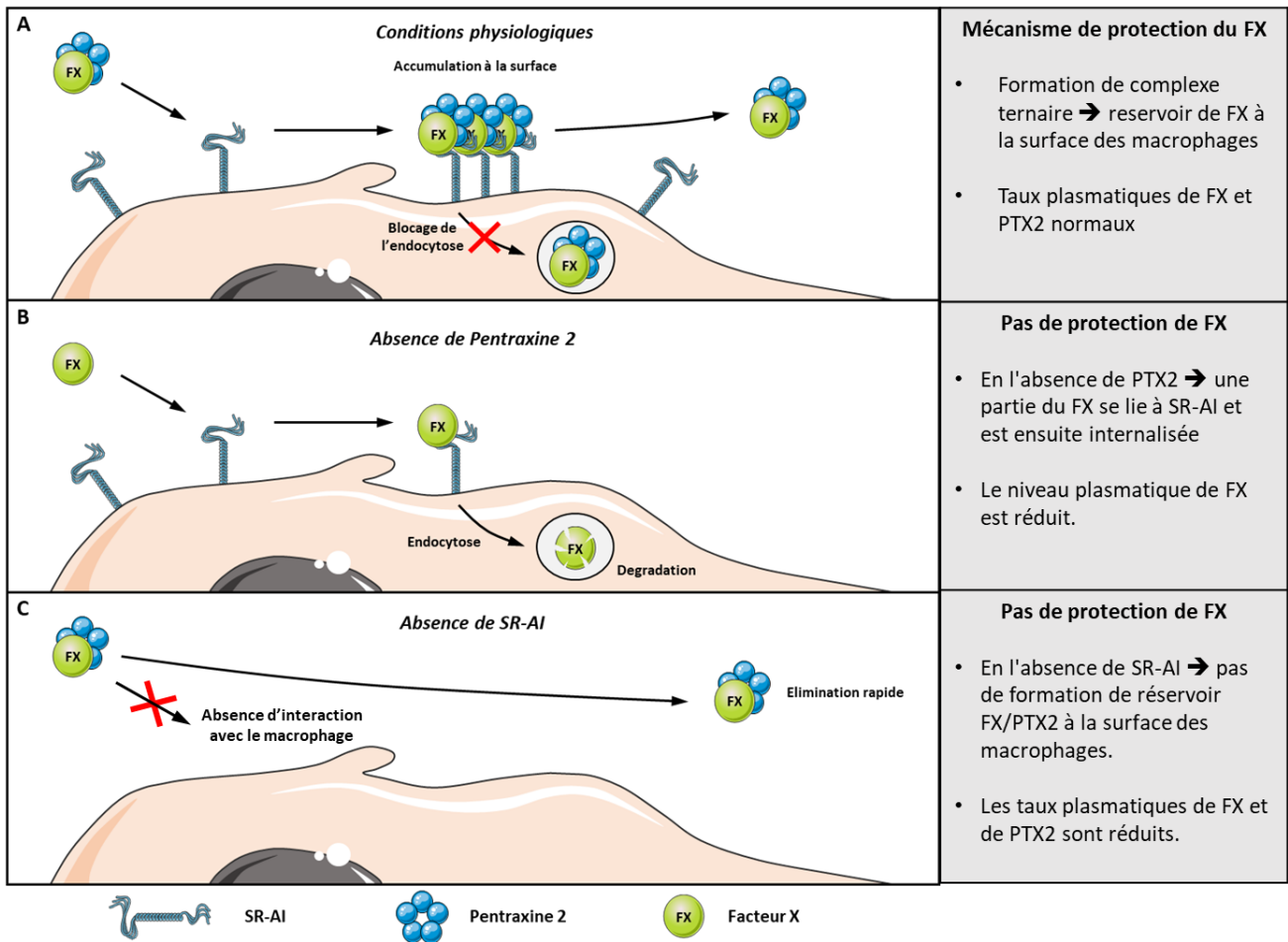


FIGURE 10 : MECANISME DE REGULATION DU TAUX DE FX PAR SR-AI ET PTX2

Adapté de Muczynski et al. ¹¹¹

3. Voies d'activation du FX

Pour remplir sa fonction au cours de la coagulation sanguine, le zymogène FX est activé en une sérine protéase, le FXa. L'activation passe par une protéolyse qui libère le peptide d'activation du reste de la protéine mature. Le clivage protéolytique du FX est effectué au cours de la coagulation par deux complexes d'enzymes distincts avec des cinétiques d'apparition différentes. Le premier complexe agit dans la phase d'initiation de la coagulation et l'autre au cours des étapes d'amplification et de propagation. Comme montré par la figure 11, les deux complexes hydrolysent la même liaison peptidique au sein du FX, Arg195-Ile196, libérant ainsi la boucle catalytique du FX.

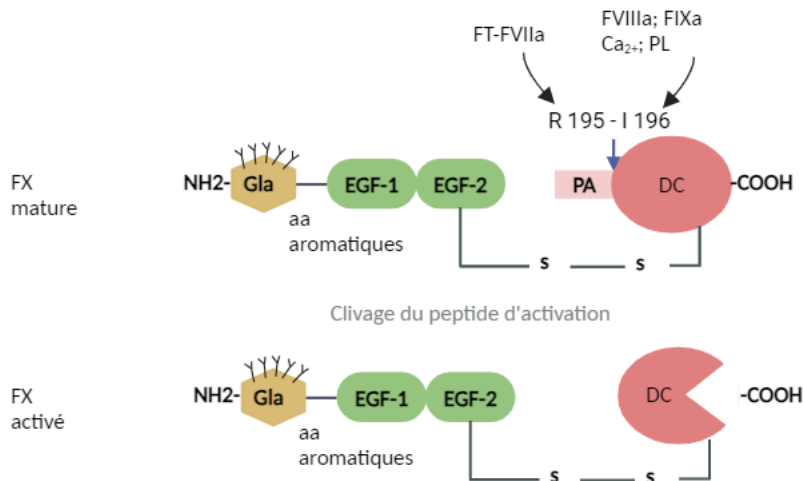


FIGURE 11 : DU FACTEUR X AU FACTEUR XA

Modifications structurales du passage du FX au FXa. La flèche (↑) représente le site de clivage permettant de passer de la protéine mature (FX mature) à l'enzyme FX activé (FXa). Le FXa se forme suite au relargage du peptide d'activation et au changement de conformation après hydrolyse de la liaison entre l'Arginine 195 et l'Isoleucine 196 du FX. FT-FVIIa : complexe d'activation du FX dans l'initiation ; FVIIIa, FIXa, Ca²⁺, PL : complexe tenase. Les acides aminés gammacarboxyglutamiques sont représentés par γ sur le domaine Gla.

4. Fonctions du FX/FXa dans la coagulation

L'indispensable rôle du FXa dans la coagulation consiste à activer la prothrombine en thrombine. Il s'agit de la seule étape non dupliquée de la cascade de la coagulation, ce qui concède une importance critique à l'activateur qu'est le FXa. Pour cliver la prothrombine, le FXa agit dans le complexe prothrombinase avec le FVa à la surface des phospholipides membranaires négativement chargés et en présence de calcium. Ces phospholipides peuvent être des membranes plaquettaires, des cellules endothéliales ou des surfaces de cellules sanguines périphériques notamment les monocytes, les lymphocytes et les neutrophiles. Bien que le FXa soit capable de cliver la prothrombine, l'assemblage du complexe prothrombinase permet un clivage plus important.²⁵⁻²⁷

Le site catalytique du FXa transforme la prothrombine en thrombine par deux clivages séquentiels au niveau des résidus Arg271 et Arg320 générant ainsi deux intermédiaires potentiels différents à savoir la préthrombine-2 et la meizothrombine.¹¹³ Des études ont montré que le complexe prothrombinase, génère préférentiellement de la meizothrombine

comme intermédiaire, en clivant l'Arg320 avant le clivage de l'Arg271, aboutissant alors à la thrombine (figure 12).^{114,115}

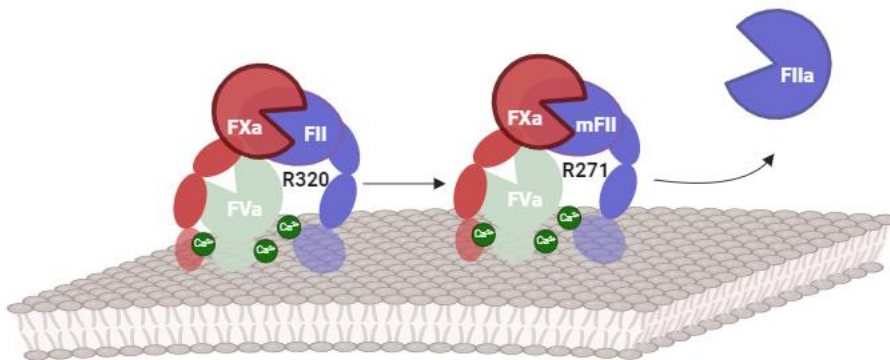


FIGURE 12 : ACTIVATION DE LA PROTHROMBINE PAR LE COMPLEXE PROTHROMBINASE

Le FXa forme avec son cofacteur, le FVa, le complexe prothrombinase enchâssé dans les phospholipides. Il clive la prothrombine après l'arginine 320 (R320) pour former la meizothrombine (mFII) puis après l'arginine 271 (R271) pour former l'enzyme capitale de la coagulation, la thrombine (FIIa). Les ions calcium (Ca²⁺) rentrent dans la formation du complexe entre phospholipides, FVa et FXa.

La fonction prothrombinase du FXa est ensuite régulée par les facteurs anticoagulants notamment l'antithrombine, le TFPI et le ZPI (Z-related Protein Inhibitor).

Un autre rôle du FXa dans la coagulation se situe dès la phase d'initiation, lors de l'activation du FX en FXa par le complexe FT-FVIIa. En effet, le tri complexe FT-FVIIa-FXa laisse libre le domaine catalytique du FXa. Il a été démontré qu'au sein de ce complexe, le FXa possède la capacité de cliver le FVIII en FVIIIa participant ainsi à l'amplification de la coagulation par génération de son propre activateur, le complexe tenase.¹¹⁶

Le tri complexe FT-FVIIa-FXa joue également un rôle important dans le contrôle de l'activité du facteur tissulaire par le TFPI. Le deuxième domaine inhibiteur de protéase de type Kunitz (K2) du TFPI interagit avec le site actif du FXa, au sein du complexe FT-FVIIa-FXa. Cette interaction est une étape critique pour que le domaine Kunitz 1 (K1) du TFPI puisse inhiber efficacement le complexe FT-FVIIa.¹¹⁷ Cette étape est essentielle à l'activité inhibitrice du TFPI sur le facteur tissulaire.

5. Les fonctions du FX au-delà de l'hémostase

Générer la thrombine à partir de son précurseur la prothrombine est la fonction la plus étudiée du FXa. Cependant, de nombreuses études ont montré que le FX/FXa pouvait être impliqué dans différents processus physiopathologiques, au-delà de la coagulation. L'hypothèse selon laquelle le FX aurait d'autres fonctions physiologiques est venue de l'observation d'une létalité embryonnaire partielle de souris déficientes en FX. En effet, l'atteinte ciblée des deux gènes F10, chez la souris, entraîne la mort in utero de 50% des souris homozygotes.¹¹⁸ Ces dernières ne présentent cependant pas de défaut histologique dans leur système vasculaire ni de leur sac vitellin. Les souriceaux arrivés à terme meurent entre J0 et J20 après leur naissance. Ils ont succombé principalement à de saignements intra-abdominaux sévères, mais aussi, sous-cutanés et intracrâniens. Les phénotypes observés ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle le FX/FXa, aurait des fonctions importantes dans le développement embryonnaire, fonctions indépendantes de ses fonctions dans la coagulation. Le FX/FXa longtemps considéré comme simple enzyme prothrombotique, est désormais étudié pour les effets directs qu'il exerce sur une grande variété de types de cellules via l'activation de ses deux principaux récepteurs, le récepteur activé par la protéase 1 (PAR-1) et le PAR-2 (figure 13).

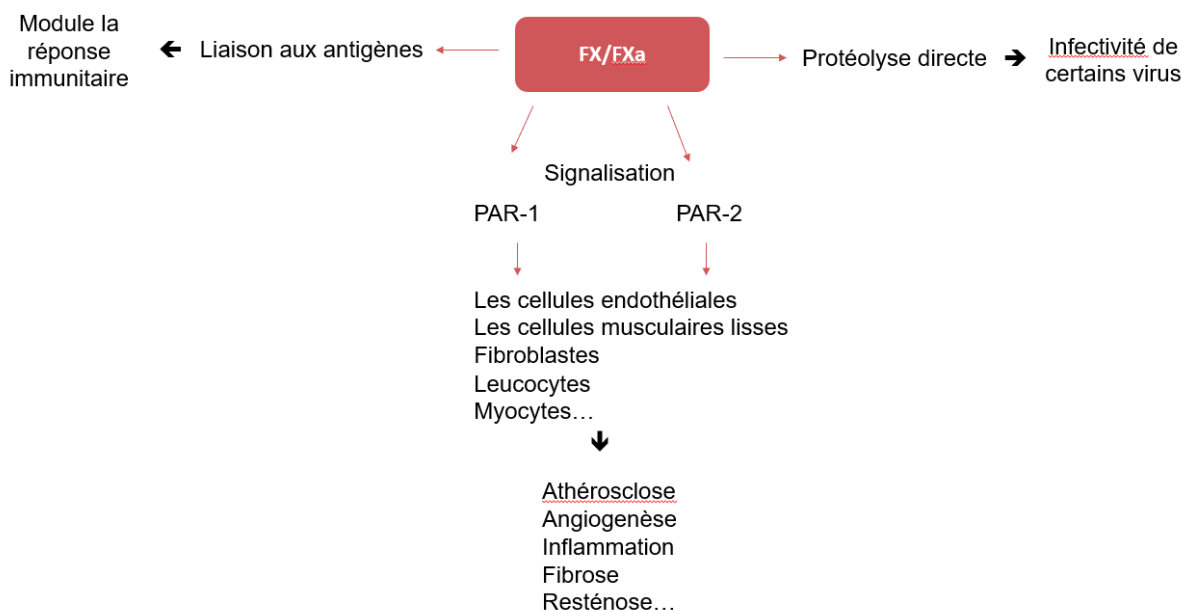


FIGURE 13 : LE FX AU-DELA DE LA COAGULATION : REPRESENTATION DES PRINCIPALES FONCTIONS DECRITES

Pour exemple, il a été montré que la présence du FXa aux côtés du FT-FVIIa est essentielle au clivage du récepteur PAR-2 impliqué dans la signalisation endosomale dépendante des intégrines. ¹¹⁹⁻¹²¹

Récemment, il a également été montré que le FX/FXa extra vasculaire, exprimé notamment par les monocytes pouvait augmenter le potentiel infectieux de certains virus comme les coronavirus (SARS-CoV) par effet protéolytique. Le FXa permettrait le clivage de la protéine spike des virus. Cette dernière est composée d'une protéine de fusion et d'un domaine de liaison au récepteur. Le FXa en clivant la protéine spike, permet la fusion de la protéine de fusion ainsi libérée, aux membranes des cellules hôtes. ^{40,41}

En outre, d'autres études ont mis en évidence l'implication du FXa dans la mitose des cellules musculaires lisses artérielles, favorisant ainsi, la resténose à la suite de lésions vasculaires dans des modèles animaux. ^{124,125}

De nombreux exemples des fonctions non hémostatiques du FX et du FXa sont désormais rapportées dans la littérature et comprennent la régulation de l'expression du FT, la modulation de la réponse immunitaire face à la croissance tumorale ou aux infections virales, ainsi que la stimulation des réponses pro-inflammatoires et profibrotiques. ¹²⁶⁻¹²⁸

Par ailleurs, à notre connaissance et jusqu'à présent, aucune publication ne fait état d'un individu humain présentant une délétion des deux allèles du gène F10. Toutes les mutations décrites sont soit des mutations faux-sens, soit des hétérozygotes composés où un allèle présente une délétion ou un codon d'arrêt tandis que l'autre présente une mutation faux-sens. Cette observation suggère que l'absence totale de facteur X n'est pas viable, ce qui souligne l'importance vitale de cette protéine dans les processus biologiques fondamentaux.

6. Anomalies liées au facteur X

Du fait de son importance critique dans la cascade de la coagulation, le gène F10 bénéficie d'une conservation tout au long de l'évolution. Quelques rares cas de patients présentant un déficit sévère (activité de FX <1 %) en FX ont été décrits.¹²⁹ Les anomalies les plus fréquemment rencontrées comprennent des mutations du gène F10 pouvant parfois conduire à des défauts qualitatifs de la protéine FX ou en un déficit quantitatif dans la circulation sanguine.

6.a. Déficit en facteur X

Le déficit en FX est une coagulopathie due à la réduction de l'activité du FX associée ou non à un déficit de la quantité d'antigène présent. Elle est caractérisée par des saignements plus ou moins sévères en fonction du taux d'activité de FX circulant dans le sang. Le déficit en FX peut être d'origine héréditaire ou acquise et ses manifestations cliniques incluent des hémorragies. Dans la forme congénitale de la maladie, la sévérité du saignement est corrélée à l'activité résiduelle de FX. La classification actuelle distingue 3 groupes selon l'activité résiduelle de FX. La forme la plus sévère correspond au groupe avec un taux de FX < 10 %. Ces patients peuvent présenter des hémorragies majeures comme des saignements du système nerveux central. Les patients avec un déficit modéré ont un taux de FX compris entre 10 et 40 % et présentent des saignements mineurs spontanés ou provoqués. Les patients avec un déficit mineur ont un taux de FX > 40% et sont généralement asymptomatique.^{130,131}

Le tableau II rapporte la classification proposée par le comité scientifique de standardisation (SSC ou Scientific and Standardization Committee) de l'ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis).¹³²

TABLEAU II : CLASSIFICATION DES DEFICITS EN FX

Degré de sévérité	Taux résiduel de FX (Valeurs de référence : 70 à 150 %)	Manifestations cliniques
Sévère	< 10 %	<ul style="list-style-type: none"> • Saignement du système nerveux central • Saignements gastro intestinaux • Saignement du cordon ombilical • Hémarthroses et hématomes récurrents
Modéré	10 – 40 %	<ul style="list-style-type: none"> • Saignements spontanés ou provoqués (mineurs) • Saignements muco-cutanés
Mineure	> 40 %	<ul style="list-style-type: none"> • Généralement asymptomatiques

Une autre classification du déficit en FX permet de distinguer les déficits quantitatifs des anomalies qualitatives. Elle se fait sur la base de deux tests, un test de fonctionnalité qui renseigne sur l'activité du FX et un dosage immunologique qui permet de déterminer le taux d'antigène FX. On distingue ainsi le trouble hémorragique de type I caractérisé par une faible activité coagulante et un faible taux d'antigènes immunologiques FX et le trouble hémorragique de type II caractérisé par une faible activité coagulante et un taux d'antigènes FX normal ou subnormal.

Dans les années 1985, une classification plus complexe avait été proposée par *Fair* et *Edgington*. Elle prend en compte les résultats de dosages additionnels tels que la mesure de

l'activité du FX dans un test utilisant le venin de vipère de Russell.¹³³ Cette classification prend en compte l'hétérogénéité des défauts moléculaires responsables du déficit en FX. Par exemple le FX Friuli est un FX non activable par les facteurs des deux voies de la coagulation mais reste activable par le venin de vipère de Russell. (In vitro)¹³⁴

Selon l'origine de l'anomalie, on distingue les déficits congénitaux et acquis.

6.a.1. Déficit congénital

Le déficit congénital en FX est une anomalie extrêmement rare de la coagulation. Du fait de l'importance critique du FX dans la physiologie, son déficit sévère est l'un des plus rares déficits dans la coagulation. C'est une anomalie transmise suivant un mode autosomal récessif. Les individus hétérozygotes (activité FX > 30 %) sont généralement asymptomatiques mais les homozygotes, dès leur jeune âge, présentent un tableau clinique hémorragique sévère. L'incidence du déficit en FX est d'un individu sur 500 chez les hétérozygotes et d'une naissance sur 1 million pour les homozygotes dans la population générale. Cependant, dans les régions où les unions consanguines sont fréquentes comme l'Iran ou le sud de l'Inde, la fréquence de cette anomalie est multipliée par 8 à 10.^{135,136}

Les premiers cas de déficit en FX ont été décrits par les équipes de *Hougie* et *Telfer* en 1956 et 1957.^{137,138} Il s'agissait dans un cas d'un déficit quantitatif de type I et dans l'autre un défaut d'activité d'un FX dysfonctionnel. Depuis, plusieurs autres cas ont été décrits et plusieurs mutations ont été identifiées comme étant à l'origine des défauts quantitatifs ou fonctionnels du FX. Le déficit en FX est caractérisé par une grande hétérogénéité moléculaire et clinique.^{130,139} On retrouve notamment des mutations faux-sens qui se traduisent par la substitution d'un ou de plusieurs acides aminés dans le FX mature. Pour exemple, une mutation dans l'exon 8 a conduit à la substitution p.(S334P) chez une patiente. Cette mutation entraîne l'altération de l'orientation du site de clivage du facteur X, empêchant l'activation de la molécule.¹⁴⁰ D'autres mutations ont été décrites sur les différents exons du gène F10. Il est intéressant de noter que les mutations rapportées sont réparties sur l'intégralité du gène excluant l'hypothèse de l'existence d'une région « hot spot »¹⁴¹ Ces mutations engendrent

des manifestations cliniques lorsque le nouveau résidu modifie les relations structure-fonction de l'enzyme.

En ce qui concerne les mutations non-sens, elles conduisent à la synthèse de protéines tronquées, ce qui se traduit inévitablement par des troubles hémorragiques. Ces mutations sont toutefois, plus rarement retrouvées sous forme homozygote.

Des mutations et délétions hétérozygotes sont également retrouvées. La copie sauvage résiduelle permet donc de générer du FX normal même si en moindre quantité. Les formes hétérozygotes engendrent ainsi des déficits modérés, le plus souvent cliniquement asymptomatiques ou résultant en des saignements post-traumatiques.^{142,143}

6.a.2. Déficit acquis

Dans sa forme acquise, le déficit en FX se développe suite à différentes pathologies. Classiquement, on le retrouve dans les hépatopathies. En effet, le FX étant synthétisé par le foie, sa production, se trouve affecté lors de pathologies hépatiques. Ce déficit est alors combiné à ceux d'autres facteurs de coagulation produits par les hépatocytes. Une autre occurrence de déficits combinés, y compris le déficit en FX, se rencontre lors d'un traitement par des anti-vitamine-K ou par défaillance du système de gamma carboxylation. La maturation de l'ensemble des facteurs vitamine-K dépendants (FII, FVII, FIX et FX) est alors affectée.

Dans de rares cas, un déficit acquis en facteur X peut se développer dans le cadre de certaines pathologies auto-immunes ou à la suite d'infections virales notamment respiratoires. Ce phénomène se produit lorsque les anticorps de la réponse immunitaire humorale anti virale, initialement dirigés contre le virus, présentent une réactivité croisée envers le FX.¹⁴⁴

La prise de certains traitements a aussi été associée au développement d'un déficit en FX. Parmi ces traitements, on retrouve notamment l'érythromycine mais aussi d'autres antibiotiques comme l'amoxicilline ou des fongicides dans d'autres études référencées.¹⁴⁵⁻

¹⁴⁷ Le mécanisme de développement de ce déficit n'est pas toujours clarifié. Il est possible que soit due à une activité inhibitrice dirigée contre le FX mais cela n'a été confirmé que dans

quelques rares cas.¹⁴⁸ Dans un cas concernant l'utilisation de l'érythromycine, le développement du déficit en FX était consécutif à l'hépatotoxicité de la molécule.¹⁴⁵

Cependant, la forme prépondérante de déficit acquis en FX, est celle liée à l'amylose à chaînes légères (amylose AL), pathologie dont je discuterai longuement plus loin (partie C).^{149,150} Bien que le déficit en FX soit aussi associé à une variété d'affections malignes (cas sporadiques), l'association particulière entre amylose AL et déficit en FX est régulièrement observée depuis des décennies.¹⁵¹ Dans certains cas, l'amylose primaire est d'ailleurs diagnostiquée grâce à un déficit en FX.¹⁵² Selon la littérature, environ 14% des patients amylose AL développent un déficit en FX (FX : C < 50 %) et ce déficit est une complication qui peut marquer la sévérité de l'amylose AL.

Sur le plan clinique, contrairement au déficit congénital en FX, les manifestations cliniques du déficit acquis en FX varient considérablement et vont de l'absence de saignement observé à des hémorragies pouvant menacer le pronostic vital. Parmi les manifestations les plus fréquemment rencontrées on retrouve les saignements gastro-intestinaux, les saignements muco-cutanés et des ménorragies/métrorragies.^{147,153} Dans le déficit acquis associé à l'amylose AL, les patients présentent, en plus des symptômes liés aux organes affectés par les dépôts amyloïdes, des manifestations hémorragiques telles que des saignements cutanéomuqueux et gastro-intestinaux. Ces symptômes hémorragiques s'expliquent par différents mécanismes rapportés dans la littérature dont je discuterai plus loin dans le chapitre consacré au lien entre l'amylose AL et le déficit en FX. On retrouve notamment une fragilité vasculaire du fait des dépôts amyloïdes dans le lit vasculaire, des déficits en facteurs de la coagulation ou quelque fois des suspicions d'hyperfibrinolyse induite par la présence des fibrilles amyloïdes. Cependant, l'anomalie de la coagulation le plus associé à l'amylose AL est le déficit acquis en FX. Il est généralement rapporté dans la littérature que le FX s'adsorbe vraisemblablement sur les dépôts amyloïdes, ce qui entraîne son élimination de la circulation sanguine et peut contribuer aux symptômes hémorragiques observés.

C. L'amylose AL

1. Introduction

Les amyloses représentent un groupe de maladies métaboliques rares résultant de la présence, dans différents organes, de substances amyloïdes. Ces substances amyloïdes sont formées par des protéines agrégées et insolubles et entraînent une altération des organes. L'agrégation des protéines et l'accumulation dans les tissus des substances amyloïdes sont le résultat d'anomalies intervenant dans le processus de repliement des protéines. Le pathologiste berlinois Rudolph Virchow a introduit le terme « amyloïde » en 1854 pour décrire les irrégularités macroscopiques des tissus révélées par la coloration à l'iode.¹⁵⁴ Les amyloses sont généralement classées en deux types principaux : les amyloses localisées et les amyloses systémiques. Les amyloses localisées impliquent généralement des dépôts amyloïdes dans un tissu ou un organe spécifique.¹⁵⁵ Par exemple, l'amylose cérébrale à prion est une forme d'amylose qui résulte de la conversion anormale d'une protéine normale (prion) en une forme pathologique, conduisant à la formation de dépôts amyloïdes dans le cerveau. Concernant les amyloses systémiques, elles impliquent une distribution généralisée des dépôts amyloïdes dans tout l'organisme. Les causes sous-jacentes des amyloses systémiques sont souvent des anomalies conformationnelles pouvant affecter certaines protéines. Le défaut de conformation généralement associé à une surproduction de la protéine conduit à la formation et à l'accumulation de structures fibrillaires. A ce jour, plus de quarante précurseurs protéiques responsables de l'amylose ont été identifiés. Selon le précurseur protéique responsable, on distingue plusieurs types d'amylose dont principalement : le tableau III présente un récapitulatif des formes d'amyloses systémiques rencontrées en France.¹⁵⁶

- L'amylose à TTR : Elle existe sous deux formes. Une forme héréditaire due à des mutations de la TTR (Transthyrétine) et transmise suivant un mode autosomal dominant et une forme dite « sénile » due à une détérioration des mécanismes de dégradation de la transthyrétine native (wt-TTR).^{157,158} La forme héréditaire est multi-systémique et peut atteindre différents organes. On retrouve notamment une atteinte neuropathique périphérique et cardiaque.

Dans l'amylose à TTR « sénile », la littérature montre que les atteintes sont essentiellement cardiaques.

- L'amylose AA est due à une protéine appelée sérum amyloïde A (SAA), une apolipoprotéine synthétisée en excès par le foie dans les maladies inflammatoires et chroniques (polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante) ou dans les infections chroniques comme la tuberculose. L'amylose AA est une amylose systémique pouvant affecter de nombreux organes mais l'atteinte rénale est la plus fréquente. ¹⁵⁹

TABLEAU III : PRINCIPALES FORMES D'AMYLOSE SYSTEMIQUE EN FRANCE.

Type d'amylose	Précurseur protéique	Atteintes (par ordre de fréquence)
AL	Chaîne légère d'immunoglobuline	Rein, cœur, tube digestif, foie, nerfs, tissus mous
AA	Protéine amyloïde A	Rein, tube digestif, foie, rate, cœur (rare)
A β 2M	β 2-microglobuline	Articulations, os, canal carpien, macroglossie
ATTR sénile	Transthyrétine non mutée	Cœur, canal carpien
ATTR héréditaire	Transthyrétine mutée	Nerfs périphériques, dysautonomie, cœur, vitré (selon la mutation responsable)
Afib	Chaîne alpha du fibrinogène	Rein, foie
AApoA1	Apolipoprotéine A1	Rein, foie, cœur, larynx, peau

- L'amylose AL, dont il sera question dans ce travail est une amylose impliquant la chaîne légère monoclonale d'immunoglobuline qui se replie de manière anormale et conduit à la formation d'agrégats amyloïdes qui se déposent dans les organes. L'amylose AL est le plus

souvent systémique et peut affecter tous les organes sauf le système nerveux central. Des formes localisées de l'amylose AL ont également été décrites mais elles sont minoritaires.^{160,161} Dans l'amylose AL, les organes les plus fréquemment atteints sont le cœur et le rein. Les conséquences des dépôts amyloïdes dépendent de leur dissémination et de leur abondance. L'atteinte cardiaque est associée au pronostic le plus défavorable et présente, à son stade le plus avancé, une sévérité extrême pouvant menacer la vie du patient à court terme.

2. Epidémiologie

L'amylose AL, à l'exclusion de l'amylose sénile à TTR native, représente la forme d'amylose la plus fréquente avec plus de 2/3 des amyloses. Cette pathologie encore appelée amylose primaire est une maladie rare avec une incidence qui varie significativement d'un pays à l'autre entre 5 à 12 cas par million de personnes par an (PMP) et une prévalence qui oscille autour de 50 à 65 PMP^{162,163}. On estime le nombre de nouveaux cas en France à 12,5 cas par million d'habitants, soit environ 700 cas par an. Une étude américaine retrouve une prédominance masculine et un âge médian au moment du diagnostic à environ 63 ans.¹⁶⁴ Par ailleurs, l'âge avancé est un facteur de risque important de développer l'amylose AL même si des individus de toute tranches d'âge peuvent être atteints.¹⁶⁵ Les dépôts amyloïdes peuvent toucher tous les organes, sauf le cerveau, mais ce sont les atteintes rénales et cardiaques qui sont les plus fréquentes.¹⁶¹ La diversité des organes ciblés par les dépôts et la rareté de signes cliniques spécifiques rendent le diagnostic long et compliqué dans le contexte d'une pathologie chronique. Ce retard de diagnostic, entraîne à son tour, un pronostic souvent défavorable qui toutefois, dépend entre autres de l'importance physiologique de l'organe atteint, du nombre d'organes atteints et du degré de la plasmocytose médullaire.^{156,162,166}

3. Etiologie de l'amylose AL

L'amylose AL repose sur une gammopathie monoclonale acquise, avec le plus souvent, de fortes concentrations circulantes de chaînes légères anormales d'immunoglobulines

monoclonales issues de plasmocytes. Une faible infiltration médullaire des plasmocytes (environ 7%) est souvent observée. L'hémopathie sous-jacente est le plus souvent un myélome multiple (MM, fréquemment de stade I) avec plus de 10 % de plasmocytes dans la moelle, une macroglobulinémie de Waldenström (WM) ou un MGUS (Monoclonal gammopathy of undetermined significance).¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ Le composant monoclonal avec un excès de chaînes légères libres associés ou non à une immunoglobuline complète est retrouvé chez la majorité des patients mais il est rapporté que 15 % de patients amylose AL n'ont pas d'excès de chaînes légères libres et une infime minorité n'a pas de protéine monoclonale détectable.¹⁵⁶

Ces chaînes légères, instables s'agrègent en protofibrilles puis en fibrilles insolubles et se déposent dans la matrice extra cellulaire des organes (figure 14). Les fibrilles sont généralement formées d'environ 80 % de la chaîne légère responsable et de 20 % d'autres facteurs, tels que l'apolipoprotéine E (ApoE), la serum amyloid P (SAP) ou des protéoglycanes. Ces autres molécules contribuent à stabiliser les fibrilles, à favoriser leur formation et à empêcher leur dégradation.^{170,171}

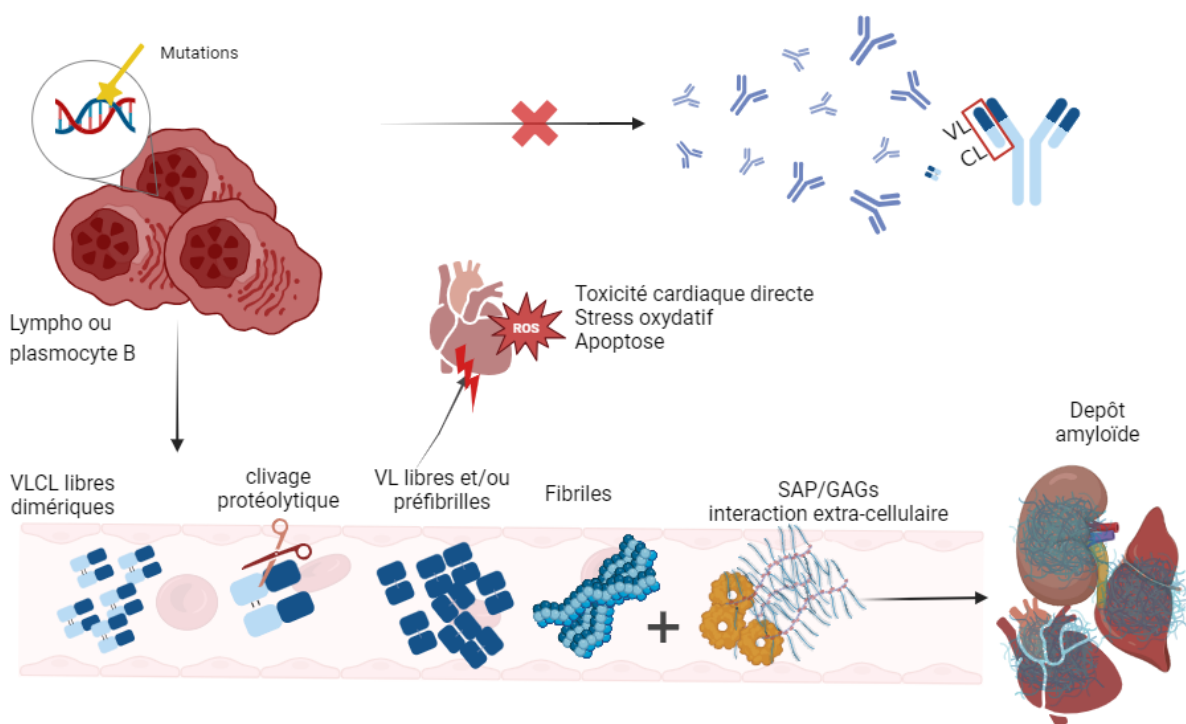


FIGURE 14 : MECANISME DE FORMATION DES FIBRILLES AMYLOÏDES

Apparition d'un clone de plasmocytes produisant des chaînes légères monoclonales (VLCL : Variable light chain – Constant light chain) souvent en grande quantités. Ces VLCL malformées se retrouvent en circulation où elles subissent de potentiels clivages protéolytiques et ou interactions diverses avec l'environnement. Elle se réorganise, se replie entre VL (région variable de la chaîne légère) en oligomères puis forment des fibrilles qui incorporent divers éléments plasmatiques et se déposent sur les organes (principalement Cœur, Rein et Foie)

Les fibrilles, en se déposant sur les organes, entraînent leur dysfonctionnement. Cependant, la chaîne légère libre présente une toxicité directe et affecte également le bon fonctionnement métabolique des cellules, en particulier des myocytes, en générant des espèces réactives de l'oxygène (ERO).¹⁷²⁻¹⁷⁵

La plupart des cas d'amylose AL sont acquis et sporadiques. Un seul cas de forme familiale associée à des mutations génétiques spécifiques dans les gènes liés à la production de chaînes légères d'immunoglobulines a été décrit.¹⁷⁶

Comprendre l'étiologie de l'amylose AL est crucial pour développer des stratégies thérapeutiques ciblées. L'hétérogénéité des présentations cliniques et des mécanismes sous-jacents soulignent la nécessité d'approches personnalisées dans la prise en charge de ce trouble complexe.

4. Les mécanismes moléculaires de l'amylose AL

Comme mentionné auparavant, l'amylose AL est une maladie caractérisée par l'accumulation de dépôts extracellulaires d'une protéine anormale appelée amyloïde, formée à partir de chaînes légères d'immunoglobulines. Les mécanismes moléculaires de l'amylose AL impliquent plusieurs étapes clés, notamment la production anormale de chaînes légères, la fibrillation de ces chaînes légères ainsi que le dépôt des agrégats d'amyloïde dans les tissus extracellulaires de divers organes. Ces étapes seront abordées dans cette section du manuscrit.

Il existe deux isotypes de chaînes légères nommés kappa (κ) et lambda (λ) et cinq isotypes de chaînes lourdes (μ , δ , γ , ϵ et α) qui diffèrent par leur région constante et définissent la classe d'immunoglobuline (respectivement IgM, IgD, IgG, IgE et IgA).¹⁷⁷ Chaque classe d'immunoglobuline possède des fonctions spécifiques portées par la variabilité de fonction des différentes chaînes lourdes. Les chaînes légères, en revanche, possèdent des fonctions similaires. Les gènes codant pour les isotypes kappa et lambda sont situés à des

emplacements différents sur le chromosome et chaque famille est subdivisée en sous-familles de chaînes légères. Dans le sérum d'un individu sain, le ratio du taux des chaînes légères lambda/kappa est d'environ 2 : 1. ¹⁷⁸

Le système immunitaire humoral a pour objectif principal de reconnaître de façon spécifique un grand nombre et une très large diversité d'antigènes afin de protéger l'organisme. La reconnaissance de l'antigène se fait au niveau des régions variables des chaînes lourdes et légères (VH-VL) de l'anticorps. Les gènes codant pour ces régions, ont donc, au cours de l'évolution, acquis la capacité de générer une grande variabilité dans la séquence des chaînes variables. Différentes sous-familles de chaînes légères peuvent être produites à partir des mêmes gènes grâce à des mécanismes de réarrangement de gènes. Il est intéressant de noter que les différents gènes qui codent pour les chaînes légères sont indépendants, situés sur des locus ou des chromosomes différents et sont organisés en différents segments. La combinaison aléatoire de ces différents segments est indispensable à la diversité physiologique des régions variables. Cependant, elle est aussi source de mutations diverses dans la séquence des chaînes légères. ¹⁷⁹

En plus des variations résultant de la recombinaison de segments de gènes, les mutations somatiques dans le domaine VL peuvent aussi augmenter l'éventail des séquences possibles de chaînes légères. ¹⁸⁰⁻¹⁸² Dans l'amylose AL, les aberrations génétiques dues à la maladie plasmocytaire sous-jacente introduisent des substitutions supplémentaires d'acides aminés dans la séquence CL. ^{183,184} Prises ensemble, ces mutations jouent un rôle essentiel dans l'initiation et la progression de la maladie car elles peuvent affecter le repliement et la stabilité du CL, contrôlant ainsi la transition de la protéine précurseur soluble aux fibrilles amyloïdes insolubles.

4.a. Caractéristiques des chaînes légères impliquées dans l'amylose AL

L'amylose à chaînes légères pose des défis uniques du fait de la spécificité que présente chaque chaîne légère de patient. Le mode de sélection de gènes germinaux à l'origine de la production des chaînes légères, couplé à l'incorporation des mutations somatiques à

différentes positions de la protéine et à différents acides aminés, conduit à l'hétérogénéité des séquences des chaînes légères impliquées dans l'amylose AL. ⁽¹⁸⁵⁾

Il existe toutefois une implication plus importante de certains segments de gènes qui codent pour la partie variable des chaînes légères lambda. En effet, ces dernières sont plus représentées dans l'AL, avec un ratio de 3/1 par rapport aux sujets sains. ¹⁸⁶ Dans une étude utilisant la spectrométrie de masse par chromatographie en phase liquide sur une importante cohorte de patients, les chercheurs ont effectivement retrouvé une fréquence plus importante de certains segments de gènes lambda dans l'amylose à chaînes légères systémique. Les segments IGVL6-57 (Vλ6a), IGVL3-01 (Vλ3r) et IGVL2-14 de la région variable de la chaîne λ y sont considérablement surreprésentés. ¹⁸⁷ La même étude a identifié des tropismes d'organes pour certains segments de gènes. Il a ainsi été montré que les sous familles LV3-19 et KV1-05 avaient un tropisme pour le cœur et la sous famille LV6-57 pour le rein. D'autres paramètres comme la co-déposition de chaînes lourdes, ont aussi montré une corrélation avec les sous types de chaînes légères. ^{187,188}

Beaucoup d'études ont cherché une corrélation entre diverses mutations et la propension de la chaîne légère à fibriller. Il a été prouvé que les domaines VL retrouvées dans les amyloses contiennent approximativement entre quatre et quinze mutations par rapport à leur séquence homologue germinale non amyloïdogène. Cependant, seule une petite fraction de ces mutations est souvent cruciale pour la déstabilisation et la propension à s'agréger de la chaîne légère. ¹⁸⁹⁻¹⁹¹

Parmi les aberrations chromosomiques les plus fréquentes, on retrouve les translocations, notamment la t(11,14). Cette translocation serait responsable d'une perturbation dans le locus de la chaîne lourde. On retrouve chez ces patients, un défaut d'assemblage de l'immunoglobuline. ^{184,192,193} Dans l'étude de *T. Bochtler*, la combinaison de la t(11,14) à un gain de gène en 11q23 semblait spécifique à l'amylose AL. Bien que des corrélations aient été trouvées avec certaines aberrations chromosomiques, aucun de ces éléments n'est absolu et les déterminants de l'amylose AL sont très certainement multifactoriels. ¹⁸⁴

4.b. Mécanisme de formation des fibrilles amyloïdes de chaînes légères

Les différences structurelles observées entre la chaîne légère fibrillée insoluble et celle native soluble, suggère qu'une barrière énergétique existe entre les deux états. Le passage de la chaîne soluble à la fibrille amyloïde, suppose donc un dépliement avant l'entrée dans l'état fibrillaire.¹⁹⁴ Il a également été démontré que la chaîne légère soluble retrouvée par exemple dans un myélome multiple présente une stabilité thermodynamique contrairement à la chaîne légère amyloïdogène.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ Des études ont ainsi montré que certaines mutations dans les CDR permettaient la déstabilisation de la chaîne légère et augmentaient donc sa propension à fibriller.¹⁹⁸ Les mécanismes permettant la déstabilisation de la chaîne légère vers un état fibrillaire ne sont toutefois pas totalement compris. On estime que plusieurs phénomènes sont possibles. Il peut s'agir des hyper-mutations somatiques qui conduisent à un mauvais repliement de la chaîne légère. Elles peuvent également conduire à la perte de l'interaction physiologique avec les chaînes lourdes, qui est à l'origine de la formation des immunoglobulines dans un contexte de sujet sain. Les espaces hydrophobes de la chaîne légère non engagée dans l'immunoglobuline vont donc conduire à la formation de dimères non physiologiques à savoir les VL-VL.^{199,200} Il a même été démontré que la partie constante des chaînes légères tend à stabiliser la protéine et empêcher la formation de fibrilles amyloïdes en privilégiant la formation de dimères stables de VLCL par formation de ponts disulfure entre les CL.^{201,202} De ce fait on estime que la formation des fibrilles à partir de la chaîne légère suppose un clivage protéolytique de la chaîne VLCL privilégiant ainsi la formation des dimères VL-VL. D'autres sources de déstabilisation ont été citées, notamment des facteurs environnementaux de la cellule comme le pH ou l'interaction avec les glycosaminoglycanes.²⁰³

Ces événements ont lieu pendant la phase de latence, et aboutissent à la formation d'oligomères puis du noyau fibrillaire.²⁰⁴ Dans l'état oligomérique, une autre transition structurelle se produit, dans laquelle les feuillet- β parallèles typiques des fibrilles sont formés. La recherche n'a toutefois pas encore élucidé les étapes de propagation qui conduisent du noyau fibrillaire aux immenses dépôts amyloïdes. On ignore encore si l'oligomérisation des monomères est toujours obligatoire pour l'élongation une fois qu'un noyau s'est formé ou si

l'interaction des LCs/VLs partiellement dépliées avec le noyau suffit à leur réarrangement structurel et à la croissance des fibrilles.

L'hypothèse du clivage protéolytique de la chaîne complète comme source de déstabilisation et conduisant à la formation des fibrilles est soutenue par un certain nombre d'études. Tout d'abord, l'utilisation de la Cryo-microscopie électronique (Cryo-EM) a permis l'identification des composants de noyau de différents dépôts amyloïdes. Trois études distinctes ont ainsi pu retrouver des VL dans des proportions différentes (77 résidus du domaine VL pour la chaîne AL55, 91 résidus VL (λ 1) pour le patient de *L. Rademaker et al.* et 115 résidus VL pour la chaîne FOR005) au cœur des dépôts amyloïdes de patient.²⁰⁵⁻²⁰⁷ Ils confirment ainsi l'hypothèse de la formation des VL comme étant nécessaires à la fibrillation. Mis ensemble, ces études démontrent également que le nombre de VL impliquées dans la formation du noyau fibrillaire n'est pas toujours le même chez les différents patients et que cela résulte en des organisations différentes au niveau des fibrilles (figure 15).

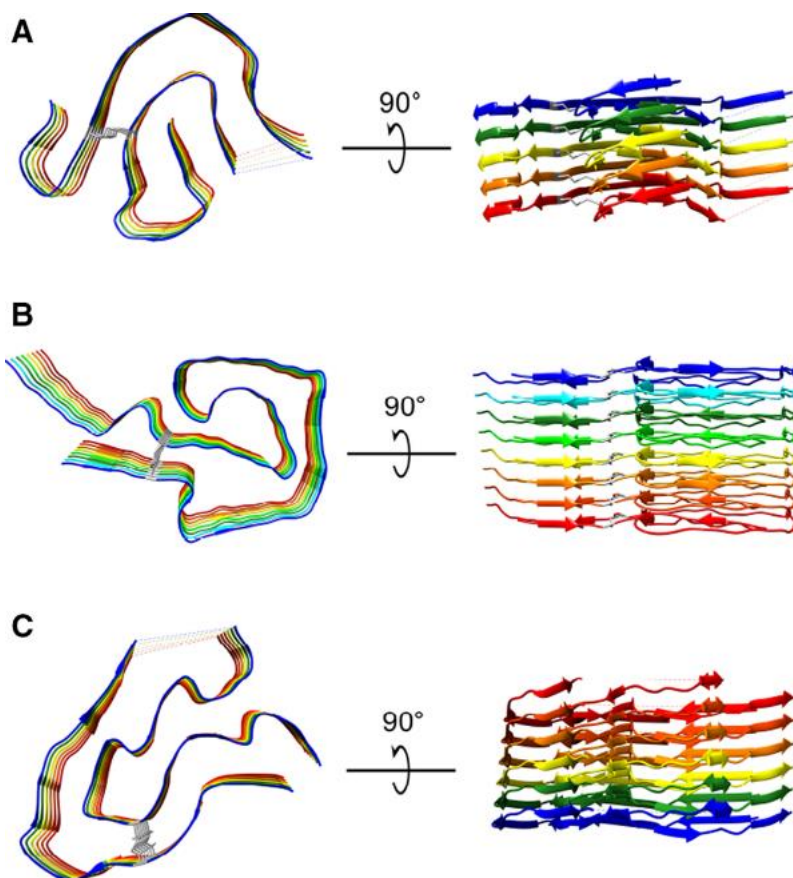


FIGURE 15 : STRUCTURE DE FIBRILLES AMYLOIDES ISSUES DE 3 PATIENTS²⁰⁸

*Les structures ont été élucidées suite à 3 études qui ont extrait les fibrilles de patients et les ont analysées grâce à la cryo EM. ²⁰⁵⁻²⁰⁷ A) Structure cryo-EM des fibrilles de AL55 (PDB 6HUD) ; B) Structure cryo-EM des fibrilles de λ 1 (PDB 6IC3) ; C) Structure cryo-EM des fibrilles de FOR005 (PDB 6Z10)
En A, B et C, les différentes couleurs représentent les différentes chaînes polypeptidiques issues des domaines VL. Les structures ont été générées à l'aide du logiciel d'analyse et de visualisation de structures moléculaires UCSF Chimera.*

Pour aller plus loin, d'autres études ont identifié différentes protéases à la surface des dépôts par immunomarquage. Des expériences de clivage in vitro ont été menées dans ces études et ont conclu à la capacité de ces protéases, des cathepsines notamment, à cliver les dépôts amyloïdes issues de patients. ^{209,210} Par ailleurs, des taux circulants élevés de métalloprotéinases et de leurs inhibiteurs ont été corrélés à l'atteinte cardiaque de l'AL. ^{211,212} Si les taux circulants de métalloprotéinases se sont avérés discriminants pour l'amylose AL, ils n'ont en revanche pas montré d'impact sur le pronostic des patients. Cependant, à la lumière des différentes études, la cinétique du clivage ne peut être clairement définie. Il n'est pas entièrement établi si la protéolyse précède le dépôt des chaînes légères ou si celle-ci intervient après la formation du dépôt amyloïde.

Une étude intéressante de caractérisation de dépôts amyloïdes par spectrométrie de masse a identifié différents sites de clivage sur deux chaînes légères. Elle n'a cependant pas réussi à identifier une enzyme spécifique. Elle conclut au contraire, à la potentielle action de multiples endo et exo protéases, agissant simultanément ou de façon séquentielle pour générer les profils protéolytiques retrouvés dans les dépôts amyloïdes. Si l'étude n'exclue pas que la protéolyse des dimères de chaînes légères natifs puisse déstabiliser leur structure et favoriser la formation de fibrilles, elle montre cependant que le dépôt de chaînes légères précède largement les événements protéolytiques documentés dans les fibrilles AL matures. ²¹³

Enfin, il est envisageable que le mécanisme et la cinétique de clivage ne soit pas unique mais dépendent de chaque patient et chaque chaînes légères.

4.c. Structure des fibrilles : résultats des interactions avec le microenvironnement extracellulaire

Les dépôts amyloïdes, qu'ils soient constitués de chaînes légères dans l'amylose AL ou d'autres protéines amyloïdogènes comme la transthyrétine (TTR) dans l'amylose héréditaire

à TTR, se composent de longs filaments ou fibrilles de protéines hautement ordonnées avec une structure en feuillets- β (figure 16). Cette organisation permet la fixation de la coloration du Rouge Congo et induit une biréfringence sous lumière polarisée d'un microscope.

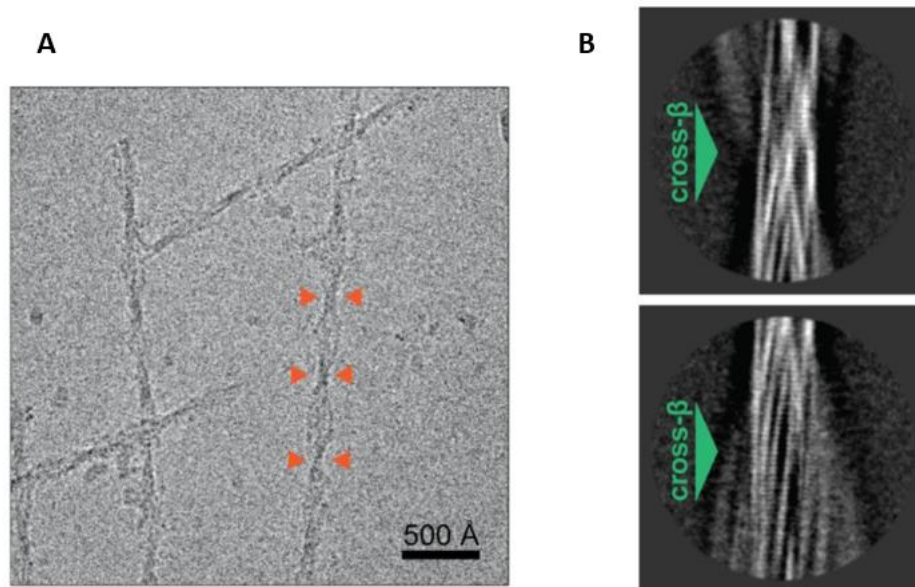


FIGURE 16 : STRUCTURE EN FEUILLET BETA DES FIBRILLES ISSUES D'UN PATIENT. ²⁰⁶

A) Micrographie cryo-EM représentative des fibrilles AL55 ; les flèches orange mettent en évidence les croisements de fibrilles. B) Moyennes de classe 2D sans référence des fibrilles AL55 montrant un étagement distinct des croisements- β mis en évidence par les flèches vertes.

Cette caractéristique est indispensable pour le diagnostic de la maladie par identification des zones émettant la biréfringence jaune/vert sur les coupes de tissus des patients. ²¹⁴ L'organisation en feuillet beta permet également la fixation de la thioflavine T (THT) et cette dernière caractéristique est utilisée pour le suivi de la formation in vitro des fibrilles. Il est cependant important de noter que la THT se fixe également aux agrégats et n'est donc pas spécifique des fibrilles. L'observation des fibrilles effectivement formées par microscopie est donc indispensable.

L'amas fibrillaire se forme sur les organes dans l'espace extracellulaire et interagit avec les protéines plasmatiques de son environnement. Des études récentes de cryoEM ont permis de montrer que le noyau des dépôts amyloïdes est formé de fragments de VL. ^{205,206} Ce noyau grandit en amas fibrillaire que l'on retrouve ensuite en dépôt sur les organes des patients.

Les analyses de ces dépôts ont permis d'identifier d'autres protéines entrant dans la composition de l'amas fibrillaire, notamment la chaîne légère entière et la SAP²¹⁵, une pentraxine plasmatique. Les glycosaminoglycanes ou les lipides comme l'apolipoprotéine E ont aussi été identifiés comme composant constitutionnelle des dépôts amyloïdes.²¹⁵⁻²¹⁷

La SAP sert d'ailleurs de biomarqueur au diagnostic de l'amylose. Sa forme radiomarquée est utilisée en scintigraphie pour un diagnostic non invasif de l'amylose.²¹⁸ La protéine SAP participe à la formation des dépôts amyloïdes grâce à une interaction réversible et calcium dépendant aux fibrilles. Son rôle n'est pas entièrement élucidé mais il semble consister en la consolidation des dépôts amyloïdes. En effet, l'équipe de Pepys a montré que la SAP prévient la protéolyse des dépôts amyloïdes par les macrophages en masquant leur conformation anormale.²¹⁹

La SAP a également été identifiée comme partenaire plasmatique du FX de la coagulation et régule ses concentrations circulantes en permettant son stockage à la surface des macrophages.¹¹⁰ La protéine de FX n'a quant à elle jamais été identifiée sur les dépôts amyloïdes par les techniques d'études actuelles. Cependant, le lien entre le FX de la coagulation et l'amylose AL a été établi dès 1962.¹⁵¹

5. Diagnostic de l'amylose AL

Le diagnostic d'amylose AL est histologique et est défini par la présence de dépôts amyloïdes visibles par une coloration au Rouge Congo et présentant une biréfringence jaune verte caractéristique en lumière polarisée. La coloration au Rouge Congo est complétée d'une étude en immunohistochimie et/ou en immunofluorescence indispensable pour confirmer le diagnostic d'amylose AL. Cette approche utilise des anticorps dirigés contre les chaînes légères et doit objectiver un marquage exclusif des dépôts par un anticorps permettant d'identifier la chaîne légère impliquée chaîne (lambda dans 2/3 des cas). Les sites de biopsies privilégiés (car moins invasifs en première intention) sont la biopsie des glandes salivaires accessoires et la biopsie de graisse sous-cutanée péri-ombilicale. Une biopsie de l'organe atteint (suivant la symptomatologie) peut être réalisée en deuxième intention. Dans les contextes complexes où la nature du précurseur amyloïde ne peut être définitivement établie

par les méthodes immunohistochimiques standard, il devient impératif de recourir à des analyses complémentaires des échantillons histologiques à l'aide de techniques plus sensibles. Parmi celles-ci, on compte l'immunomicroscopie électronique et/ou l'analyse protéomique des dépôts microdisséqués au laser par spectrométrie de masse. Ces approches permettent une identification précise du type d'amylose dans la grande majorité des cas ²²⁰. L'amylose AL implique souvent plusieurs organes, c'est pourquoi une évaluation complète de divers systèmes organiques est cruciale pour la stadification et la planification du traitement. La biopsie est généralement précédée d'une évaluation diagnostique approfondie comprenant la mesure systématique de la créatininémie et de la protéinurie, mais aussi des marqueurs cardiaques. D'autres dosages tels que le dosage des chaînes légères libres dans le sérum, l'électrophorèse des protéines dans le sérum et l'urine avec immunofixation, une numération formule sanguine complète, des tests de fonction hépatique et rénale, la mesure des protéines dans les urines, et des dosages quantitatifs des immunoglobulines sont également réalisés.

Comme pour d'autres dyscrasies des cellules plasmatiques, la stadification de l'amylose est réalisée au moment du diagnostic pour aider à déterminer le pronostic du patient et le choix de traitement le plus approprié. Étant donné que les dommages cardiaques constituent le paramètre le plus important dans la prédiction de la survie, la mesure des biomarqueurs cardiaques sert de base à tous les systèmes de stadification de la maladie (Tableau IV). Dans cet esprit, en 2004 la clinique Mayo a intégré dans son système de stadification de la maladie, le taux sérique de la troponine cardiaque T (TnT) et celui du peptide natriurétique B de type N-terminal (NT-proBNP) ²²¹. En 2012, une mise à jour a introduit un troisième paramètre pronostique, la différence entre les chaînes légères libres impliquées et non impliquées (dFLC) ²²². Chaque paramètre contribue 1 point, définissant le stade I à 0 points, le stade II à 1 point, le stade III à 2 points et le stade IV à 3 points. Le système européen modifié subdivise les patients de stade III de la stadification 2004 de la clinique Mayo en sous-groupes A et B, basés sur un seuil de NT-proBNP de 8500 ng/L. ²²³Un système de stadification de l'atteinte rénale a également été mis au point pour permettre de prédire la survie rénale.²²⁴

TABLEAU IV : DIFFERENTS SYSTEMES DE STADIFICATION DE L'AMYLOSE AL CARDIAQUE

Clinique Mayo 2004 ²²¹	Stade I	cTnT < 0.035 µg/L et NT-proBNP < 332 ng/L
	Stade II	cTnT < 0.035 µg/L ou NT-proBNP < 332 ng/L
	Stade III	cTnT ≥ 0.035 µg/L et NT-proBNP ≥ 332 ng/L
Adaptation Européenne de la clinique Mayo 2004 ²²³	Stade I	cTnT < 0.035 µg/L et NT-proBNP < 332 ng/L
	Stade II	cTnT < 0.035 µg/L ou NT-proBNP < 332 ng/L
	Stade IIIa	332 ng/L ≤ NT-proBNP ≤ 8500 ng/L
	Stade IIIb	NT-proBNP ≥ 8500 ng/L
Clinique Mayo révisé 2012 ²²²	Stade I	cTnT < 0.025 µg/L et NT-ProBNP < 1800 ng/L, et FLC-diff < 180 mg/L
	Stade II	1 des 3 paramètres au-dessus
	Stade III	2 paramètres au-dessus
	Stade IV	cTnT ≥ 0.025 µg/L et NT-ProBNP ≥ 1800 ng/L, et FLC-diff ≥ 180 mg/L

Trois études ont défini des seuils pour évaluer la sévérité de la cardiopathie amyloïde (AL). Ils sont basés sur les taux de marqueurs biologiques spécifiques à l'atteinte cardiaque et sur le taux des chaînes légères. Les patients sont classés dans des stades (I, II, III, IIIa, IIIb ou IV) selon leurs taux de cTnT (Troponine T sérique) et ou de NT-pro BNP (la fraction N terminale du peptide natriurétique) et ou de FLC-diff (la différence entre les chaînes légères libres impliquées et non impliquées)

6. Traitements de l'amylose AL

Le traitement contemporain de l'amylose AL vise à diminuer la production de chaînes légères d'immunoglobuline amyloïdogènes en éliminant le clone sous-jacent de plasmocyte. L'objectif est de réduire la disponibilité du précurseur amyloïde toxique, d'interrompre la formation des dépôts amyloïdes, et ainsi de favoriser une régression graduelle des dépôts dans les tissus. Cette approche contribue à obtenir une réponse favorable des organes affectés et améliore la survie des patients. Pour l'heure, aucun traitement validé ne permet d'agir directement sur les organes affectés. Le monitoring de la thérapie repose alors sur le suivi de la réponse hématologique qui conditionne la réponse des organes. Cette réponse

hématologique est évaluée par l'évolution du taux de la chaîne légère monoclonale et de la dFLC (différence entre la chaîne légère monoclonale et polyclonale).

Les critères de l'International Society of Amyloidosis (ISA) montrent qu'une réponse complète (RC) ou l'obtention d'une dFLC < 10 mg/l est associée à une plus grande fréquence de réponses positives au niveau des organes ²²⁵. Malgré tout, cette évolution favorable peut aussi survenir en cas de très bonne réponse hématologique partielle (dFLC < 40 mg/l) et même quelquefois de réponses moins profondes.

Les plus récentes recommandations suggèrent donc que l'objectif du traitement de l'amylose AL est d'obtenir une réponse hématologique complète, idéalement associée à une dFLC < 10 mg/L. ^{226,227} La réponse hématologique doit être évaluée au moins une fois par mois (plus fréquemment chez les patients classés à des stades plus avancés) et une modification du traitement doit être envisagée rapidement chez les patients non-répondeurs. Les critères de réponse attendus sont décrits dans le tableau V. Des critères spécifiques aux principaux organes ciblés par l'AL permettent également de suivre la réponse d'organe. Une bonne réponse d'organe après une thérapie anti-plasmocytaire est associée à un meilleur pronostic pour les patients. Cependant cette réponse d'organes peut prendre de longs mois à survenir. Dans une étude de 2018, *Muchtar et al* a observé une médiane de 9,4 mois pour une réponse cardiaque et de 6 mois pour une réponse hépatique. ²²⁸

TABEAU V : CRITERES D’EVALUATION DE LA REPONSE HEMATOLOGIQUE

Critère	Définition	Signification pronostique HR
Réponse complète (RC)	* Normalisation de la concentration sérique des chaînes légères *Immunofixation sérique et urinaire négatives	Référence
Très bonne réponse partielle (TBRP)	dFLC < 40 mg/L	2,67
Réponse partielle (PR)	Réduction de plus de 50 % dans la dFLC	6,24
Absence de réponse	Augmentation de la dFLC	12,34
Rechute	* à partir de la RC : Toute protéine monoclonale détectable ou ratio FLC anormal * à partir de la PR : ou réponse stable : Toute augmentation de 50 % de la LC sérique > 50 mg/L ou 50 % d’augmentation de la LC dans l’urine >200 mg/jr ou augmentation de la dFLC > 100mg/L	Avis de l’expert

Les critères d’évaluation de la réponse hématologique et leur signification pronostique ont été établis en 2010 par la société internationale de l’amylose. HR : hasard Ratio ²²⁹ ; dFLC : la différence entre les chaînes légères libres impliquées (monoclonales) et non impliquées (polyclonales). RC : réponse complète ; TBRP : très bonne réponse complète ; PR : réponse partielle. LC : chaîne légère.

Les dernières publications du groupe de travail de l’European Hematology Association et de l’International Society of Amyloidosis (EHA-ISA)^{230,231} ainsi que le Protocole National de Diagnostic et de Soins 2023 de l’Amylose AL ¹⁶¹ proposent que le choix du traitement initial ou secondaire soit effectué en fonction du stade de la maladie, de l’âge et des comorbidités. Il est également admis que les caractéristiques clonales influencent la réponse au traitement et une meilleure connaissance du clone amyloïde sous-jacent permettra leur prise en compte dans le choix de la thérapie. ²³²

La première option de traitement selon les recommandations de EHA-ISA consiste à évaluer l'éligibilité du patient à une autogreffe de cellules souches (ASCT). La transplantation est très efficace mais nécessite une sélection extrêmement minutieuse des patients, selon les critères définis par l'ISA ASCT, afin d'éviter une mortalité précoce.²³⁰

Les patients non éligibles à la transplantation sont traités par des combinaisons de chimiothérapies ou d'immunothérapies de plus en plus prolifiques (figure 17). Ce sont des agents destinés à détruire le clone lympho-plasmocytaire ou à induire l'arrêt de la production de la chaîne légère par ce dernier. On distingue notamment les agents alkylants, les inhibiteurs du protéasome, les anticorps monoclonaux et les immunomodulateurs.

1.c.1. Les agents alkylants

Ce sont des molécules dont l'activité antinéoplasique repose sur la capacité à attacher un groupement alkyle aux bases guanines de l'ADN. Elles entraînent la formation de liaisons transversales entre les brins et endommagent ainsi l'ADN. Elles interfèrent avec la réplication de l'ADN et sa transcription en ARN. Récemment, il a été démontré que ces agents induisaient une mort cellulaire immunogène et convertissaient le milieu cytokinique d'un microenvironnement tolérant au cancer à un microenvironnement de guérison du cancer²³³. Les agents alkylants étant des agents non spécifiques du cycle cellulaire, ils sont aussi responsables d'une cytotoxicité notamment au niveau gastro-intestinale et médullaire. On utilise notamment le Melphalan, le Cyclophosphamide et la Bendamustine. Le Melphalan est recommandé en combinaison triple avec les corticoïdes et un inhibiteur du protéasome.²³¹ Il est aussi utilisé à forte dose en induction avant la transplantation ASCT chez certains patients avec une amylose AL. Cette stratégie est cependant très peu utilisée en France depuis qu'un essai randomisé de phase III avait conclu à une moins bonne survie lors de son utilisation par rapport à la combinaison Melphalan dexaméthasone.^{234,235}

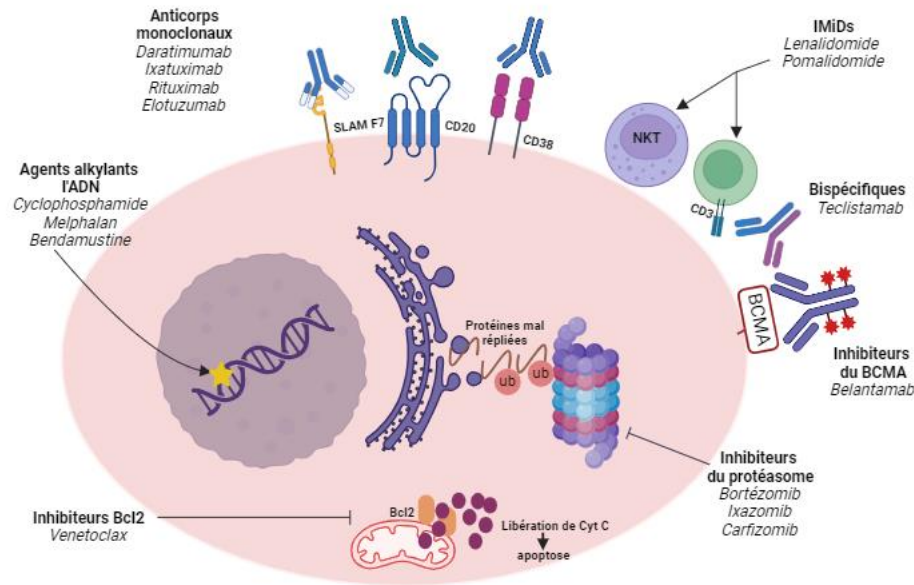


FIGURE 17 : APERÇU GENERAL DES PRINCIPAUX TRAITEMENTS ET DE LEURS CIBLES DANS L'AMYLOSE AL

La figure présente la cible et/ou les mécanismes d'action des médicaments les plus fréquemment utilisés dans l'amylose des chaînes légères d'immunoglobulines. Les agents alkylants créent des dommages sur l'ADN. Les inhibiteurs du Bcl2 favorisent l'apoptose via une sécrétion de cytochrome C (Cyt C). Les inhibiteurs du protéasome entraînent une accumulation de protéines ubiquitinées. BCMA : antigène de maturation de cellules B ; CD3 ; CD38 ; CD20 : cluster de différenciation (3 ; 38 ; 20) NKT : natural killer T cell ; SLAM F7 : antigène de surface, membre 7 de la famille des SLAM.

1.c.2. Les inhibiteurs du protéasome

Un protéasome fonctionnel est essentiel à la survie d'une cellule. Il lui permet notamment de résister au stress oxydant par lyse enzymatique des protéines toxiques. De manière générale, les cellules malignes sont plus dépendantes du protéasome que les cellules saines. Dans le cas de l'amylose AL, le stress oxydatif induit par les chaînes légères mal repliées conduit à une extrême dépendance du clone plasmocytaire au protéasome, les rendant ainsi très sensibles aux inhibiteurs du protéasome.²³⁶ La première molécule de cette classe thérapeutique est le bortézomib. C'est un inhibiteur réversible de la sous-unité $\beta 5$ du protéasome. Il est utilisé dans l'amylose AL associé aux corticoïdes (dexaméthasone) ou en combinaison triple avec un agent alkylant. Les combinaisons thérapeutiques contenant du bortézomib sont considérées comme le traitement principal de l'amylose AL dans la plupart des centres de traitement d'Europe, des États-Unis et de la région Asie-Pacifique.²³¹

En France, les deux combinaisons les plus utilisées sont Bortezomib-Cyclophosphamide-Dexaméthasone (CyBorD) et Bortezomib-Melphalan-Dexaméthasone (B-MDex).¹⁶¹

1.c.3. Les immunomodulateurs

On retrouve dans cette classe thérapeutique, la thalidomide, le lenalidomide et le pomalidomide. Leurs effets reposent sur l'immuno-modulation du micro environnement cancéreux. Le lenalidomide a été utilisé, combiné au Melphalan et à la dexaméthasone (ou cyclophosphamide et dexaméthasone) et a donné un taux bas de réponse complète (CR).^{237,238} Leur utilisation est restreinte du fait de leur toxicité conduisant à des effets indésirables importants.²³⁹ Le lenalidomide a montré une toxicité rénale particulièrement chez les patients amylose AL avec une atteinte rénale.²⁴⁰ L'utilisation de ces agents est également associée à une augmentation transitoire de la NT-proBNP pouvant compliquer le suivi des cardiopathies amyloïdes.²³¹

1.c.4. Les anticorps monoclonaux

La stratégie des molécules de cette catégorie, est de cibler les composants de la cellule lymphoplasmocytaire B avec des anticorps spécifiques et d'induire la mort cellulaire par divers mécanismes notamment une cytotoxicité médiée par l'anticorps (ADCC) ou par le complément (CDC). On retrouve principalement des anti-CD38, comme le daratumumab et l'ixatuzimab. Ces molécules lient le CD38 exprimé en grandes quantités par les cellules malignes B et induisent la mort cellulaire par cytotoxicité (ADCC, CDC ...) le Daratumumab est le premier testé et approuvé cliniquement. Parmi les autres cibles, on retrouve l'antigène SLAM F7 exprimé par les cellules malignes B, ciblé par l'elotuzimab ou encore le BCMA (Antigène de maturation des lymphocytes B) ciblé par le belantamab et des bispécifiques anti-CD3 (lymphocyte T) et anti BCMA. L'anti CD-20 historiquement utilisé dans les myélomes, le Rituximab, est parfois utilisé également dans l'AL.

Le daratumumab a montré une excellente efficacité chez les patients atteints d'amylose AL en rechute ou réfractaire à d'autres traitements.²⁴¹⁻²⁴³ Les réponses sont rapides et varient entre 60 et 80% suivant les études. Dans l'étude de phase III ANDROMEDA²⁴⁴, le

daratumumab sous-cutané, associé au CyBorD, a montré une efficacité supérieure à la combinaison standard CyBorD en première ligne. (RC à 53% contre 18%). Ce qui a valu en 2021, une validation accélérée de la FDA suivie d'une AMM européenne pour l'utilisation de la combinaison Dara-CyborD chez les patients nouvellement diagnostiqués. ^{245,246}

1.c.5. Les inhibiteurs de Bcl2

Le Bcl2 est une protéine régulatrice de l'apoptose, surexprimée dans de nombreuses hémopathies malignes, assurant aux cellules malignes une protection contre la mort cellulaire induite par des stress oncogéniques et externes. ²⁴⁷ Le premier agent de cette classe est le Venetoclax. Les plasmocytes porteurs de la translocation t(11 ;14) couramment retrouvés dans l'amylose AL sont particulièrement sensibles aux inhibiteurs du Bcl2. Une étude rétrospective a montré l'efficacité rapide et profonde du Venetoclax dans l'amylose AL. ^{248,249}

1.c.6. Les thérapies dirigées contre les dépôts amyloïdes

Malgré un large éventail de chimiothérapies et d'immunothérapies, la mortalité précoce reste un problème majeur dans l'amylose AL, avec un risque important en fonction de l'étendue de l'atteinte cardiaque. Les thérapies actuelles même en permettant une bonne réponse hématologique ne conduisent à une réponse d'organes qu'après de longs mois ou années puisqu'elles n'ont pas d'effets directs sur les dépôts amyloïdes. Il reste donc primordial de développer des agents ciblant spécifiquement les fibrilles amyloïdes dans l'espoir de prévenir la formation des dépôts de fibrilles et/ou leur élimination. Quelques pistes ont été explorées notamment celle de la serum amyloid P (SAP), un composant majeur des dépôts amyloïdes. ²⁵⁰ Un anticorps anti SAP (dezamizumab) a été développé et a montré en essai de phase I, des effets significatifs sur la réduction des dépôts amyloïdes hépatiques, spléniques et rénaux chez des patients amylose AL. L'essai de phase II n'a malheureusement pas montré d'effets sur l'atteinte cardiaque. Par ailleurs, la survenue d'effets adverses importants ont fait pencher la balance bénéfice/risque dans un sens défavorable. ^{251,252}

D'autres pistes permettant de cibler les chaînes légères amyloïdogènes mal repliées sont en cours de développement et/ou d'essais cliniques et suscitent beaucoup d'espoir quant à la

possibilité de traiter les amyloses AL par destruction directe des plaques.²⁵³⁻²⁵⁶ L'une de ces pistes est un anticorps monoclonal chimérique IgG1 (CAEL-101) qui cible les fibrilles amyloïdes. Il se lie à un épitope cryptique à l'extrémité N-terminale des protéines mal repliées des chaînes légères kappa (κ) et lambda (λ). Après des essais de phase Ia/Ib et II concluants, deux essais de phase III sont en cours pour préciser son efficacité chez des patients classés en stade IIIa et IIIb.^{254,257,258} Un autre anticorps est le Birtamimab (NEOD001), dirigé contre un épitope cryptique, conservé, en position C-terminale des chaînes légères lambda et kappa. Sa tolérance et sa sécurité ont été vérifiées lors d'essais de phase I/II. Depuis, il a obtenu la désignation de médicament orphelin pour l'amylose AL par l'EMA et la FDA lui a accordé la désignation de procédure accélérée. Un essai de phase III, AFFIRM-AL est en cours chez les patients de stade IV.^{255,259,260} En dehors des thérapies immunologiques, certaines molécules sont pressenties ou ont déjà été utilisées pour inhiber l'amyloïdogénèse. La doxycycline notamment est un antibiotique dont l'effet a déjà été évalué dans une étude prospective chez des patients atteints d'amylose cardiaque.²⁶¹ La figure 18 récapitule les principales cibles permettant un traitement par élimination et/ou prévention des dépôts amyloïdes.

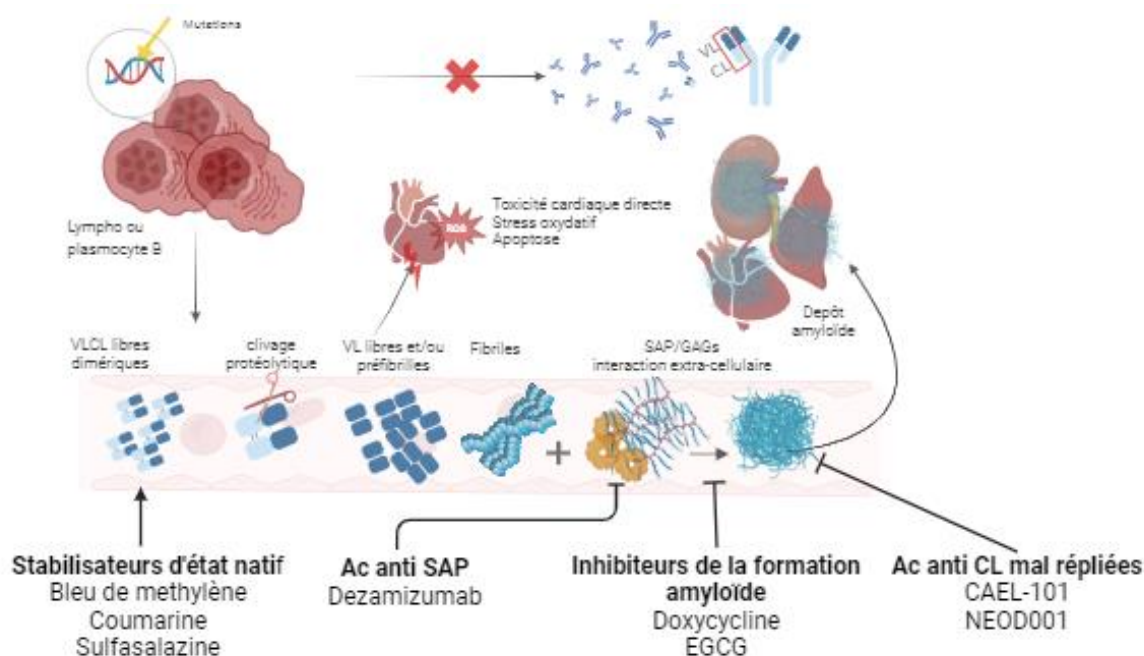


FIGURE 18 : THERAPIES CIBLANT LES DEPOTS AMYLOÏDES

Récapitulatif des cibles visées dans le traitement de l'amylose AL par élimination et ou prévention des dépôts amyloïdes. L'EGCG (épigallocatechine-3-gallate) un composé du thé vert, le bleu de méthylène, ou encore la

*coumarine sont des petites molécules proposées comme pouvant interférer avec la formation des fibrilles amyloïdes.*²⁶² Figure adaptée de Theodorakakou et al.²⁶³

7. L'amylose à chaîne légère et le déficit acquis en FX.

Les complications hémorragiques sont fréquentes dans l'amylose AL, allant de saignements muco-cutanés légers à des hémorragies plus importantes. Alors que les patients atteints d'autres amyloses systémiques peuvent présenter des saignements du fait de la fragilité des vaisseaux tapissés par les dépôts amyloïdes, les patients atteints d'amylose AL peuvent en plus présenter des anomalies de la coagulation, notamment un déficit en FX.²⁶⁴ En 1962, *Korsan et al*¹⁵¹ avaient décrit une patiente amylose AL avec un tableau hémorragique dû à un déficit non héréditaire en FX. La patiente avait été hospitalisée pour des saignements persistants post chirurgie puis a présenté des saignements intra utérines et abdominales. Les dépôts amyloïdes ont ensuite été identifiés dans le foie et la rate de cette patiente. Quinze ans plus tard, *Furie et al* ont fourni des preuves expérimentales d'une élimination rapide du FX de la circulation chez les patients atteints d'amylose AL par une expérience d'injection de FX radiomarqué.²⁶⁵ La même équipe a ensuite montré la liaison in vitro du FX sur des dépôts amyloïdes purifiés de biopsies humaines et avait alors conclu à la capacité du FX mais aussi, du FIX dans une moindre mesure, à se lier aux dépôts amyloïdes de chaînes légères.²⁶⁶ Depuis, de nombreux cas de déficits acquis en FX ont été rapportés dans le contexte de l'amylose AL.

Aujourd'hui on estime de 8 à 14% le nombre de patients d'amylose AL présentant un déficit en FX selon les principales cohortes rapportées dans la littérature en considérant les patients avec un taux de FX coagulant < 50 %.²⁶⁷⁻²⁶⁹ Dans une population normale, l'activité du FX varie généralement entre 70 et 150 %. La limite inférieure dépend de caractéristiques de chaque laboratoire et de la population de référence utilisée. Si on considère un déficit comme étant un abaissement du taux de FX en dessous de 70%, correspondant à la limite inférieure de la population normale, le pourcentage de patients atteints d'amylose AL présentant un déficit en FX augmente significativement, atteignant 62 % et non pas 14 % dans une étude chinoise et 43% et non pas 14% dans une étude de la clinique Mayo.^{269,270}

Au-delà du FX, d'autres anomalies de la coagulation sont observées dans l'amylose AL telles que des déficits en FV, FII, FIX, FVII, ²⁶⁴ ou des diminutions de taux de prothrombine. ²⁷¹ Une hyperfibrinolyse a également été rapportée dans quelques études notamment en raison de la capacité des structures amyloïdes à servir de support à l'activation du tPA. ^{41,272,273} L'hypothèse de la présence de l'hyperfibrinolyse dans l'amylose AL est soutenue, selon les études, par une augmentation des complexes plasmine α 2-antiplasmine (PAP), une augmentation des D-Dimères ou l'efficacité des traitements anti-fibrinolytiques comme l'acide tranexamique. ²⁷⁴⁻²⁷⁶ Toutes ces anomalies de l'hémostase ont été rapportées dans l'amylose AL de façon sporadique et les corrélations entre ces anomalies et les atteintes d'organes sont difficiles à établir en raison du faible nombre de cas.

En ce qui concerne le déficit isolé en FX, fortement associé à l'amylose AL, il n'a pas été rapporté de corrélation avec l'atteinte rénale qui pourrait expliquer le déficit par une perte rénale de la protéine (protéinurie). ²⁶⁸ En revanche, une corrélation avec les atteintes cardiaques et l'atteinte amyloïde de plus d'un organe a été établie dans l'étude de Patel et al. ²⁶⁷ De façon générale, le déficit considéré habituellement en FX (FX: C < 50%) est associé à un mauvais pronostic dans l'amylose AL, avec un risque accru de présenter des symptômes hémorragiques graves. ²⁶⁸

Le mécanisme exact responsable du déficit en FX dans l'amylose AL reste encore à élucider, mais l'hypothèse principale suggère un processus d'adsorption du FX sur les dépôts amyloïdes. Cette théorie a été renforcée par l'observation d'une correction des taux de FX après une splénectomie chez un patient. ^{277,278} Deux études ont également étayé cette hypothèse : l'une montrant la liaison du FX sur les dépôts amyloïdes extraits de patients atteints d'amylose AL ²⁶⁶, et l'autre identifiant le FX sur les plaques amyloïdes biopsiées d'un patient décédé d'amylose AL. ²⁷⁹ Cependant cette hypothèse ne peut expliquer la discordance entre les taux d'antigène de FX circulant et l'activité coagulante en FX observée dans une majorité de patients dans la cohorte de *Mumford*. ²⁷¹ D'autres mécanismes semblent donc contribuer aux diminutions des taux d'activité coagulante en FX observés chez certains patients.

Objectifs de la thèse

Une diminution des niveaux plasmatiques ou de l'activité des protéines impliquées dans le processus de la coagulation peut avoir des implications pathologiques majeures et conduire à des épisodes hémorragiques. Le FX est un des facteurs clés de la coagulation qui intervient dans les phases de propagation. Son déficit peut être acquis ou héréditaire et conduire à des saignements sévères.

Dans le premier chapitre de ma thèse je me suis intéressée au déficit acquis en FX lors de l'amylose AL. Il est généralement admis que ce déficit soit le résultat d'une adsorption du FX sur les dépôts de fibres amyloïdes qui sont notamment présents dans les tissus et les organes des patients atteints par cette pathologie. Cependant, même si des arguments cliniques supportent cette hypothèse, il y a très peu d'études qui montrent d'une façon directe une interaction du FX avec les structures amyloïdes. De plus, la simple hypothèse d'une adsorption du FX ne peut expliquer la disparité qui a été observée entre l'antigène FX circulant et l'activité coagulante du FX dans l'une des quatre plus grandes cohortes de patients rapportées à ce jour.²⁷¹ D'autres mécanismes doivent donc expliquer ces diminutions des taux d'activité coagulante du FX. Ainsi, quand j'ai débuté mon travail au sein de notre équipe, celle-ci venait d'identifier le « scavenger » récepteur de type AI (SR-AI) et la pentraxine (PTX2) comme des régulateurs des taux du FX circulant. La PTX2 et le FX forment un complexe ternaire avec le SR-AI à la surface des macrophages, empêchant ainsi l'internalisation du FX. Parce que ce complexe est nécessaire pour maintenir des niveaux plasmatiques normaux de FX et de PTX2 et que la PTX2 est par ailleurs un composant majeur des dépôts amyloïdes, un déséquilibre dans le complexe est susceptible d'entraîner une diminution du FX dans l'amylose AL systémique.

Étant donné le manque de données concernant le mécanisme expliquant jusqu'à présent le déficit acquis en FX au cours de l'amylose AL, les objectifs spécifiques ce chapitre de thèse ont été de :

- 1) Collecter davantage de preuves directes concernant le mécanisme d'adsorption du FX sur les plaques amyloïdes de patients.

- 2) Explorer d'autres mécanismes potentiels expliquant le déficit en facteur X acquis lors de l'amylose AL

Dans la seconde partie de ma thèse, je me suis intéressée à l'évaluation de la contribution des cellules vasculaires dans la génération de thrombine dans un plasma hémophile A. Le test de génération de thrombine (TGT) qui consiste à mesurer l'apparition de thrombine en fonction du temps dans un plasma est une technique largement utilisée pour identifier et quantifier les défauts sanguins ainsi que pour évaluer l'efficacité des composés pharmaceutiques.

Dans ce test, l'activité coagulante d'un plasma est mesurée généralement en présence des vésicules phospholipidiques ou parfois de plaquettes. Cependant, en situation physiologique ou en cas de brèche vasculaire, le plasma entre en contact avec les cellules vasculaires, qu'elles soient activées ou non (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses). Ces cellules ne se contentent pas d'avoir une composition phospholipidique distinctive, mais elles libèrent également dans la lumière vasculaire des protéines à la fois pro-coagulantes et anticoagulantes.

Dans ce contexte, mes objectifs étaient les suivants :

- 1) Evaluer la contribution des cellules vasculaires primaires aortiques, particulièrement les cellules endothéliales stimulées ou non et les cellules musculaires lisses, dans la génération de thrombine dans un plasma hémophile A, en utilisant une version modifiée du TGT.
- 2) Comparer l'efficacité de différents traitements anti-hémophiliques dans un plasma hémophile A lorsqu'ils sont testés dans le cadre du TGT modifié en présence de cellules vasculaires primaires aortiques. Ces traitements comprennent le FVIII (traitement substitutif), l'emicizumab (anticorps bispécifique mimant l'activité du facteur VIII) et des agents permettant de contourner la fonction du FVIII.

Résultats expérimentaux

Chapitre 1 :

Identification du FX sur les dépôts amyloïdes dans l'amylose AL.

Introduction

Il est généralement admis que le déficit acquis en FX observé chez une minorité des patients souffrant d'amylose AL résulte de l'adsorption de la protéine FX sur les fibres amyloïdes présentes dans les tissus ou organes affectés. Ce postulat est étayé par des études décrivant la correction du déficit en FX chez des patients atteints d'amylose AL traités par une splénectomie de la rate atteinte,^{277,280} après un traitement par chimiothérapie²⁶⁸ ou après une transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques.²⁸¹ L'hypothèse trouve son origine dans l'observation par l'équipe de Furie en 1977 qui a noté une clairance accélérée du FX radiomarqué injecté à un patient atteint d'amylose AL et de déficit en FX. Ils observeront ensuite que le FX radiomarqué s'est retrouvé dans le système vasculaire et les organes atteints du patient²⁶⁵. Plus tard, la même équipe, établit que le FX se lie effectivement à des structures amyloïdes extraites d'un patient atteint d'amylose AL.²⁶⁶

Ces observations permettent d'expliquer pourquoi les patients atteints d'amylose AL et d'un déficit en FX sont souvent réfractaires à la thérapie de remplacement utilisant du plasma ou des concentrés de FX. Cependant étant donné que le déficit en FX n'apparaît pas chez tous les patients atteints d'amylose AL, il est supposé que ce soit la charge élevée en fibrilles amyloïdes dans le sang circulant ou dans les organes qui serait responsable de ce déficit. Cette notion est renforcée par l'observation dans l'étude de l'équipe de Furie de 1981 montrant que des structures amyloïdes extraites d'un patient atteint d'amylose AL mais sans déficit en FX sont capables de lier ce dernier.²⁶⁶

Ainsi, il semble que des quantités importantes de structures amyloïdes puissent perturber l'équilibre entre la production et l'élimination du FX de la circulation entraînant de ce fait le déficit observé en FX. Cependant, il convient de noter qu'il n'existe qu'une seule étude dans la littérature qui démontre la présence de FX au niveau de la plaque amyloïde chez un patient présentant un déficit important en FX (FX : C <2%).²⁷⁹ Pour vérifier qu'il existe une liaison directe du FX aux structures amyloïdes, indépendamment de la présence d'un déficit sévère

en FX, nous avons analysé par microscopie les biopsies de trois patients atteints d'amylose AL et nous avons suivi leurs taux de FX et de chaîne légère libre tout au long des différents traitements qui leurs ont été administrés. Deux d'entre eux ont été diagnostiqués avec un déficit en FX au moment de l'échantillonnage des tissus, tandis que le troisième ne présentait pas de déficit significatif quand le diagnostic d'amylose AL a été établi à partir de biopsies d'organes périphériques.

Matériels et Méthodes

Patients

Les patients de cette étude ont été accueillis au CHU de Poitiers rattaché au Centre National de Référence Maladie rare, amyloses AL et autres maladies de dépôts d'immunoglobulines monoclonales (labellisé en juillet 2006). Quand ils ont été diagnostiqués avec une amylose AL, un test de routine de l'activité FX a été fait (voir plus bas). Le diagnostic d'amylose AL est anatomopathologique, il a donc été nécessaire d'obtenir un prélèvement, si possible par une biopsie peu invasive (glandes salivaires accessoires, graisse abdominale sous-cutanée, ...) sinon par biopsie d'un organe atteint (rein, foie, cœur, rectum, tractus gastro-intestinal) après contrôle du bilan de coagulation et après information du pathologiste de la suspicion d'amylose. L'examen anatomopathologique a été effectué par la coloration au rouge Congo des biopsies, et l'immunohistochimie, ou l'immunofluorescence ont été appliquées pour discriminer les sous-types d'amyloïde. Une fois le diagnostic établi, l'atteinte des organes et les réponses hématologiques et organiques ont été évaluées conformément aux lignes directrices de consensus du Protocole National de Soins (PNDS) Amylose AL en cours au moment de l'inclusion des patients. Les cellules produisant la protéine monoclonale ont ensuite été identifiées en examinant la moelle par une ponction, le plus souvent faite au niveau du sternum, et le taux de la protéine monoclonale a été déterminé par une prise de sang à l'aide de différents tests, le plus utile étant le dosage des chaînes légères libres du sérum (cf plus bas). Toutes les procédures ont été effectuées conformément aux normes éthiques du CHU de Poitiers. Tous les patients ont donné leur consentement éclairé conformément aux principes de la déclaration d'Helsinki.

Analyses en microscopie et quantification basée sur l'immunofluorescence

Les coupes de biopsies de tissus congelés ont été réalisées en série à partir de prélèvements frais. Ces prélèvements sont congelés en azote liquide puis gardé à -80°C (en cryotubes). Ils sont ensuite inclus en cryo-colle, coupés pour être mis sur lames puis conservés tels quels à -20°C sans les fixer. La section des coupes est de $3\ \mu\text{m}$. Avant utilisation, les lames sont d'abord ramenées 30 minutes à température ambiante avant d'être fixées 5 minutes dans une solution à -20°C d'acétone. Elles ont ensuite été séchées à l'air libre et réhydratées dans un tampon Phosphate (PBS) pendant 5 minutes puis incubées en tampon PBS avec 5% de Bovine Serum Albumin (BSA) et 0,1 % de Tween 20 (PBST), 30min à 37°C pour saturer les sites non spécifiques. Les sections tissulaires sur les lames ont ensuite été entourées avec un stylo hydrophobe pour délimiter les régions où vont ensuite se faire les incubations.

Les anticorps primaires ont ensuite été ajoutés sur les lames 2 heures à température ambiante en PBST/BSA 1% (ou 1 nuit à 4°C) et ont été suivis par les anticorps secondaires qui ont été incubés 1 h à température ambiante. Les noyaux des cellules ont été marqués avec $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ de 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Les lamelles ont été ensuite montées dans du réactif Prolong Gold antifade (Life Technologies) et stockées à -20°C .

Les anticorps suivants ont été utilisés dans cette étude : Anticorps polyclonaux de mouton (PoAb) anti-FX humain (ab110138, Abcam, France), les anticorps monoclonaux anti-chaine légère lambda ou kappa (ab124719 et ab124727, Abcam, France), les anticorps secondaires anti-lapin 488 (A21206 ; Invitrogen ; Thermo Fischer Scientific, Harz, Germany) et anti-mouton 647 (A21448, Invitrogen ; Thermo Fischer Scientific, Harz, Germany).

Les images de microscopie à champ large ont été acquises sur un microscope Cell Discoverer 7 (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne). Pour les analyses de colocalisation, Les champs de vue uniques de chaque échantillon ont été projetés le long de Z en utilisant l'intensité maximale et assemblés pour produire une image 2D de l'ensemble de l'échantillon. Les images résultantes ont ensuite été importées dans QuPath ²⁸² Pour chaque image d'échantillon, les valeurs de seuil T1 et T2 ont été déterminées manuellement, de sorte que les valeurs d'intensité en dessous de ces seuils correspondent à l'auto-fluorescence. Pour l'analyse de la

colocalisation, le code du plugin Fiji JACoP ²⁸³ a été porté en Groovy, le langage de script utilisé dans QuPath, et adapté au traitement avec les structures de données de QuPath. Pour chaque image d'échantillon, les outils d'annotation de QuPath ont été utilisés pour délimiter manuellement de 1 à 10 régions d'intérêt, classées comme Positives ou Négatives. Ensuite, le script de colocalisation Groovy a été utilisé pour calculer le coefficient de Pearson et les coefficients de Manders M1 et M2 en utilisant les valeurs de seuil T1 et T2, séparément pour chaque région. M1 correspond à la fraction du signal vert dans une région au-dessus de T1 qui colocalise avec le signal rouge au-dessus de T2. M2 correspond à la fraction du signal rouge au-dessus de T2 qui colocalise avec le signal vert au-dessus de T1. Toutes les images ont été assemblées à l'aide du logiciel ImageJ.

Détermination des taux de FX, II et V

Les taux d'activité des FX, FII et FV ont été mesurés en utilisant une technique chronométrique de type temps de Quick. Le temps de Quick est le temps de coagulation d'un plasma citraté, déplaqué et recalifié en présence d'un excès de thromboplastine tissulaire (Celle utilisée dans notre étude est d'origine animale) et d'une quantité optimale de chlorure de calcium. Pour mesurer l'activité pro-coagulante spécifique d'un facteur, le plasma dilué est mélangé volume à volume avec un plasma déficient qui contient tous les facteurs (en excès) sauf celui dont l'activité pro-coagulante est mesurée. Le temps mesuré est converti en pourcentage d'activité grâce à une courbe de calibration. (STA[®]-Deficient X, STA[®]-Deficient II, STA[®]-Deficient V, STA[®]-NeopTimal, Stago, Asnières-sur-Seine, France) sur un automate STARmax3.

Dosage des chaînes légères libres

Les concentrations sériques des chaînes légères libres κ et λ sont mesurées par une méthode immuno-néphélométrique automatisée (FreeLite[®]). Il s'agit d'anticorps polyclonaux conjugués à des particules de latex et spécifiques des chaînes légères libres. Ils reconnaissent les épitopes cryptiques physiologiquement indisponibles quand la chaîne légère est liée à la chaîne lourde de l'immunoglobuline entière.

Recherche d'anticorps anti-FX

La présence dans le sang d'anticorps dirigés contre le FX humain a été évaluée par un test immunologique en utilisant les IgG purifiés à partir du plasma ou du sérum des patients. Les IgG ont été purifiés par affinité sur des colonnes de 1mL HiTrap protéine G (Cytiva, France, Saint-Germain-en-Laye) selon le protocole du fabricant à partir d'environ 150µL de matériel biologique (plasma ou sérum). Brièvement, des plaques de microtitration (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Autriche) ont été recouvertes de FX humain purifié de plasma (Cryopep, Montpellier, France) pendant 1 nuit à 4°C dans un tampon Carbonate de Sodium (50mM Na₂CO₃ pH9,6). Ensuite, les puits ont été lavés trois fois avec un tampon Tris contenant du Tween ou TBST (50mM Tris pH7.4, 150nM NaCl, 0.1% Tween20) puis recouverts pendant 1 heure à 37°C dans un tampon TBST/3%BSA (3% AlbuMAX II, Albumine de sérum de bovin riche en lipides avec <0,1% IgG) afin de saturer les sites de liaison non spécifiques. Après 3 lavages, des concentrations identiques d'IgG des patients (200 µg/mL) ont été incubées pendant 2 heures à 37°C dans un tampon TBS/1%BSA. Les protéines non liées ont été éliminées par 3 lavages et les IgG ont été détectés par incubation d'un anticorps polyclonal de lapin anti-IgG humain marqué à la peroxydase (cat. P0214, Dako), dilué à 1:5000 dans du TBST/1%BSA 1 heure à 37°C, suivie d'une conversion chromogène à la tétraméthylbenzidine. La réaction colorimétrique a été stoppée avec du H₂SO₄ 0,5 M et la densité optique (DO) a été mesurée à 450 et 540 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques Infinite M Nano+ (Tecan). Le matériel biologique des patients a été analysé en double et les puits non recouverts de FX ont été utilisés comme contrôles négatifs. Les valeurs nettes de DO ont été obtenues après soustraction du signal des puits vierges. Les IgG purifiés d'un pool de plasma sain ont été utilisés comme contrôle ainsi que les IgG purifiés du plasma d'un individu ayant développé des IgG contre le FX humain. Les expériences ont été répétées 3 fois. Les données ont été acquises avec le logiciel i-control 2.0, interne à l'instrument Infinite M Nano+ et générées au format Excel (.xls). Les analyses des données ont été faites avec le logiciel GraphPad Prism.

Résultats

Données cliniques principales mesurées lors de l'inclusion des patients et au moment du diagnostic

Patient 1 : Il s'agit d'un homme de 58 ans qui a été admis en 2017 au CHU de Poitiers au centre de référence des amyloses AL pour une suspicion d'amylose AL. Le diagnostic d'amylose AL n'a pas pu être posé à partir d'une biopsie de glande salivaire. Cependant, une ponction de moelle osseuse a permis d'identifier un myélome indolent et en utilisant un séquençage du répertoire d'immunoglobulines à haut débit et sensible sur ARN, une expansion monoclonale dans la moelle osseuse des cellules plasmiques restreintes à kappa a été identifiée. En bref, les composantes monoclonales médullaires détectées ont été une chaîne lourde IgG1 (VH1-2*02 - DH6-13*01 - JH3*01) représentant 5,9% du répertoire G/A/M et une chaîne légère Kappa (Vκ1-16*02 - Jλ5*01) représentant 74,6% du répertoire kappa/lambda. De plus, une électrophorèse des protéines sériques a montré une protéine monoclonale IgG kappa et les niveaux de chaînes légères kappa et lambda sériques libres étaient de 110 et 8,7 mg/L, respectivement (voir Tableau 1). Aucune composante monoclonale $\geq 1\%$ a été détectée dans le répertoire médullaire lambda. Le patient présentait également une atteinte digestive avec rectorragies, et des atteintes hépatique et cardiaque (stade II). Pour la coagulation, l'activité du FX (FX:C) au moment de l'inclusion a été mesurée à 22 %, alors que les taux des autres facteurs de la coagulation étaient normaux, notamment pour le facteur V (FV) et la prothrombine (PT) (Tableau I). Les IgG du plasma du patient prélevé lors de son inclusion n'ont pas montré de capacité à reconnaître le FX. Devant le tableau clinique du patient, une trithérapie Cyclophosphamide, Bortézomib, Dexaméthaxone (CyBorD) a été mise en place. C'est finalement une biopsie digestive positive à la chaîne légère kappa réalisée en avril 2018 qui a permis de poser le diagnostic d'amylose AL.

TABLEAU I : CARACTERISTIQUES DE BASE DES PATIENTS A L'INCLUSION OU AU DIAGNOSTIC.

Caractéristiques de base	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Age (inclusion)	58 ans	71 ans	61 ans
Sexe	Homme	Femme	Homme
Diagnostic spécifique	Myélome indolent	MGCS	MGCS
Type de chaîne légère (germinale)	Kappa (Vκ1-16*02- Jk5*01)	Lambda (Vλ2-14*03- Jλ3*02)	Lambda (Vλ3-1*01-Jλ2*01)
Cytogénétique			
Organe(s) impliqué(s)	Cardiaque, Digestif, Hépatique	Cardiaque, Digestif, Hépatique, Neuro.,	Cardiaque, Digestif, Neuro.
Stade de la Clinique Mayo 2004 révision Européenne	II	IIIA	IIIA
Taux de chaînes légères libres (mg/L) (diagnostic/2023)	110 / 36	745 / 16	326 / 20
FX:C (diagnostic/2023)	22% / 85%	9% / 60%	73% / 80%
FV:C (diagnostic/2023)	130% / 137%	130% / NM%	140% / 122%
FII:C (diagnostic/2023)	92% / 108%	93% / 105%	104% / 78%
anti-FX plasmatiques	ND	ND	ND

MGRS : gammopathie monoclonale de signification clinique

ND : non différent de ce qui est détecté dans un pool de plasma normal.

NM : non mesuré

Patiente 2 : Une femme est arrivée en 2019 à l'âge de 71 ans au centre de référence des amyloses AL. Un diagnostic d'amylose AL sur un tableau de Gammopathie Monoclonale de signification clinique (MGCS) a été posé à la suite d'une biopsie salivaire positive à la chaîne

légère lambda. Les niveaux de chaînes légères kappa et lambda sériques libres étaient respectivement de 9 et 745 mg/L. Un séquençage du répertoire d'immunoglobulines comme décrit dans la section Matériels et Méthodes a permis d'identifier la séquence de la chaîne légère monoclonale lambda surexprimée (V12-14*03- J13*02). La patiente présentait des atteintes neurologique, digestive, hépatique et cardiaque (stade IIIA). Ce tableau était compliqué d'un déficit en FX évalué à 9%. Une trithérapie CyBorD a été mise en place pendant 6 mois (voir tableau II).

Patient 3 : Il s'agit d'un homme qui est arrivé en 2020 à l'âge de 61 ans au centre de référence. Il présentait une atteinte cardiaque au stade IIIA, des atteintes neurologique et possiblement digestive. Une biopsie de graisse abdominale et de glande salivaire positives à la chaîne légère lambda ont permis d'établir le diagnostic d'amylose AL sur un tableau de MGCS. La ponction de moelle osseuse effectuée a permis par séquençage comme décrit dans la section méthodes de détecter une composante monoclonale médullaire : une chaîne légère Lambda (Vλ3-1*01-Jλ2*01) représentant 65,2% du répertoire Kappa et Lambda. Le ratio chaînes légères libres Kappa/Lambda était de 12/326 mg/L. Le patient ne présentait pas de coagulopathie, un taux de FX plasmatique à 73% a été détecté. Le niveau normal de FX:C dans notre centre était alors de 60 % à 140 %, ce qui avait été déterminé par la plage d'activité du FX selon la distribution de 95 % des personnes en bonne santé. Une première trithérapie CyBorD a alors été initiée.

TABEAU II : TRAITEMENTS CONTRE L'AMYLOSE AL SUIVIS PAR LES PATIENTS

Lignes de traitements	Patient 1	Patiente 2	Patient 3
1ère	CyBorD (9 cures pendant 8 mois)	CyBorD (6 cures pendant 6 mois)	CyBorD (6 cures pendant 6 mois)
2ème	Dara/Lenalidomide/Dex (1 mois)	BorD + Lenalidomide (06 mois)	BorD + Daratumumab (1 mois)
3ème	Dara/ Dex (6 cures pendant 6 mois)		Bortézomib+ Daratumumab+Venetoclax (06 mois)
4ème			Venetoclax (en cours)

BorD : Bortézomib, Dexaméthaxone

CyBorD : Cyclophosphamide, Bortézomib, Dexaméthaxone

Dara : Daratumumab

Dex : Dexaméthaxone

Évolution des taux de chaînes légères libres et des taux de FX au cours du suivi thérapeutique des patients avec amylose AL

Nous avons étudié l'impact des traitements administrés aux trois patients, depuis leur admission jusqu'à récemment, sur la variation de leurs taux circulants de chaînes légères libres et de FX coagulant.

Patient 1 :

Pour le patient 1, la trithérapie initiale de CyBorD, administrée sur une période de 8 mois (9 cycles), a induit une réponse hématologique quasi immédiate. Les taux de chaînes légères libres kappa ont chuté de manière significative dès le premier mois, passant de 110 à 58 mg/L, atteignant un minimum 4 mois après le début du traitement (voir Figure 1A). À la fin du traitement, le ratio des chaînes légères libres kappa/lambda est passé de 110/8,7 mg/L à 18,8/7,9 mg/L.

Cependant, moins de 18 mois après l'interruption du traitement, on a constaté une augmentation de la quantité de chaînes légères kappa libres. Cette augmentation s'est

accentuée au fil du temps, doublant à 20 mois après l'arrêt du traitement, passant de 18,8 à 50 mg/L (voir Figure 1A). Un pic à 110 mg/L a été observé 32 mois après l'arrêt du traitement. Ces observations ont montré une résurgence de la production excessive de chaînes légères libres kappa chez ce patient et ont justifié l'établissement d'un nouveau protocole thérapeutique.

La mise en place d'une nouvelle trithérapie comprenant Daratumumab, Lenalidomide et Dexaméthasone (sur une durée de 6 mois), a induit une nouvelle réponse hématologique immédiate aussi rapide que celle observée pour la thérapie initiale (CyBorD). Après 6 mois de traitement une réponse maximale a été atteinte, marquée par une diminution du ratio des chaînes légères libres kappa/lambda, passant de 110,1/11,9 mg/L à 13,9/3,7 mg/L, soit quasiment une réponse totale au traitement. Cette intensité de réponse s'est maintenue 24 mois. Par la suite, une augmentation légère mais progressive des taux de chaînes légères a été observée (Figure 1).

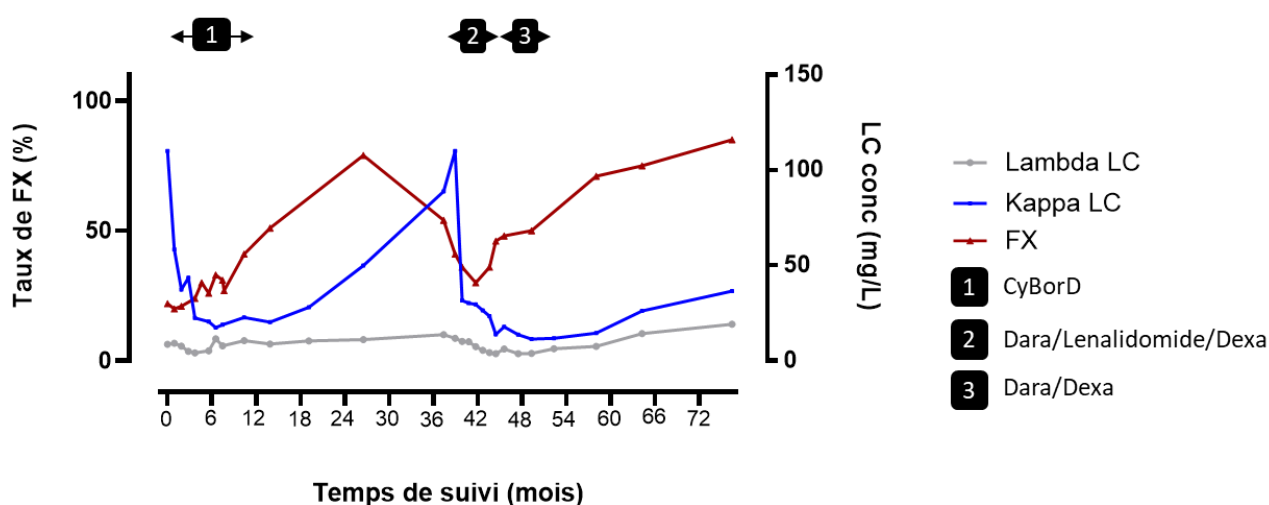


FIGURE 1 : SUIVI DES VARIATIONS DES TAUX DE FX ET DE CHAINES LEGERES LIBRES DANS LE TEMPS (PATIENT 1)

Les taux circulants de chaînes légères libres et de FX coagulant ont été dosés au cours du temps de suivi chez le patient 1. L'axe vertical de gauche correspond aux taux de FX (%) tandis que celui de droite est réservé aux taux de chaînes légères (en mg/L). La courbe bleue représente le suivi au cours du temps de la chaîne légère pathogène tandis que le suivi des taux de FX est représenté par une courbe rouge. 1, 2 et 3 désignent les combinaisons thérapeutiques reçus par les patients au cours du temps. CyBorD : Cyclophosphamide, Bortezomib et Dexaméthasone ; Dara : Daratumumab; Dexa : Dexaméthasone

Ces observations montrent que les thérapies utilisées chez ce patient ont permis une réponse hématologique immédiate a effet plus ou moins prolongé mais pas définitif.

Contrairement aux chaînes légères, il a été observé un délai entre les variations des taux de FX et l'administration d'une trithérapie. Pour la première trithérapie (CyBorD), les taux de FX ont commencé à augmenter significativement 12 mois après la première administration pour atteindre des valeurs normales (> 60%) 18 mois après (Figure 1A). Un délai dans l'augmentation des taux de FX a aussi été observé lors de l'administration de la deuxième trithérapie. Il était 2 fois moins important que lors de la première thérapie (6 mois versus 12 mois). Cependant, comme pour la première trithérapie, il a fallu attendre 18 mois pour que le FX atteigne des valeurs normales (>60%) (Figure 1).

Ces résultats démontrent que chez le patient 1, tous les traitements administrés ont induit une réponse hématologique immédiate. De plus, tous ont conduit à une normalisation des taux de chaînes légères, même si cette normalisation n'a pas été durable dans le temps, notamment avec CyBorD. De manière similaire, chacun de ces traitements a permis de rétablir les taux de FX à des valeurs normales, bien que ce rétablissement ait demandé un laps de temps beaucoup plus long. En effet, dans chaque cas, il a fallu attendre 18 mois pour observer un effet significatif sur les taux de FX, généralement détectable à 6 mois voire 12 mois.

Patiente 2 :

Comme pour le patient 1, une trithérapie CyBorD a été administrée à la patiente 2, sur une période de 6 mois (6 cycles). Cette fois, il a été observé une réponse hématologique légèrement retardée de 2 mois. Le taux de chaînes légères lambda libres est passé de 745,5 mg/L à un minimum de 23,6 mg/L, environ 6 à 7 mois après le début du premier traitement (voir Figure 2). Malgré une réponse hématologique initiale, le tableau clinique de la patiente ne s'est pas amélioré. Les taux de chaînes légères lambda libres sont remontés à 97,8 mg/L après l'arrêt du premier traitement, et par conséquent une deuxième trithérapie (BorD + Lenalidomide) a été instaurée. Ce nouveau protocole thérapeutique, d'une durée de 6 mois, a entraîné une réponse hématologique immédiate et complète, avec des taux de chaînes légères libres inférieurs à 5 mg/L. Comme constaté chez le patient 1, l'augmentation significative des taux de FX est survenue bien après l'apparition de la réponse hématologique

induite par le traitement (voir Figure 2). Ils ont significativement augmenté, plus de 12 mois après le début du traitement, passant de 9 à 26%. Cependant, même avec une réponse hématologique complète persistante jusqu'à 3 ans après la deuxième thérapie, les taux de FX continuent d'augmenter sans toutefois atteindre des valeurs normales. En revanche, les taux des autres facteurs de coagulation sont restés normaux, aussi bien lors de l'inclusion que tout au long du suivi de la patiente 2. Aucune réponse anti-FX n'a été détectée chez cette patiente pendant toute la durée de son suivi. En conclusion, chez le patient 2 contrairement au patient 1, la trithérapie CyBorD n'a pas entraîné de réponse hématologique immédiate et cette réponse a été partielle. De plus, la trithérapie BorD + Lenalidomide qui a induit une réponse hématologique immédiate avec normalisation des taux de chaînes légères, a permis une augmentation des taux de FX mais avec une cinétique beaucoup plus lente que celle observée avec le patient 1.

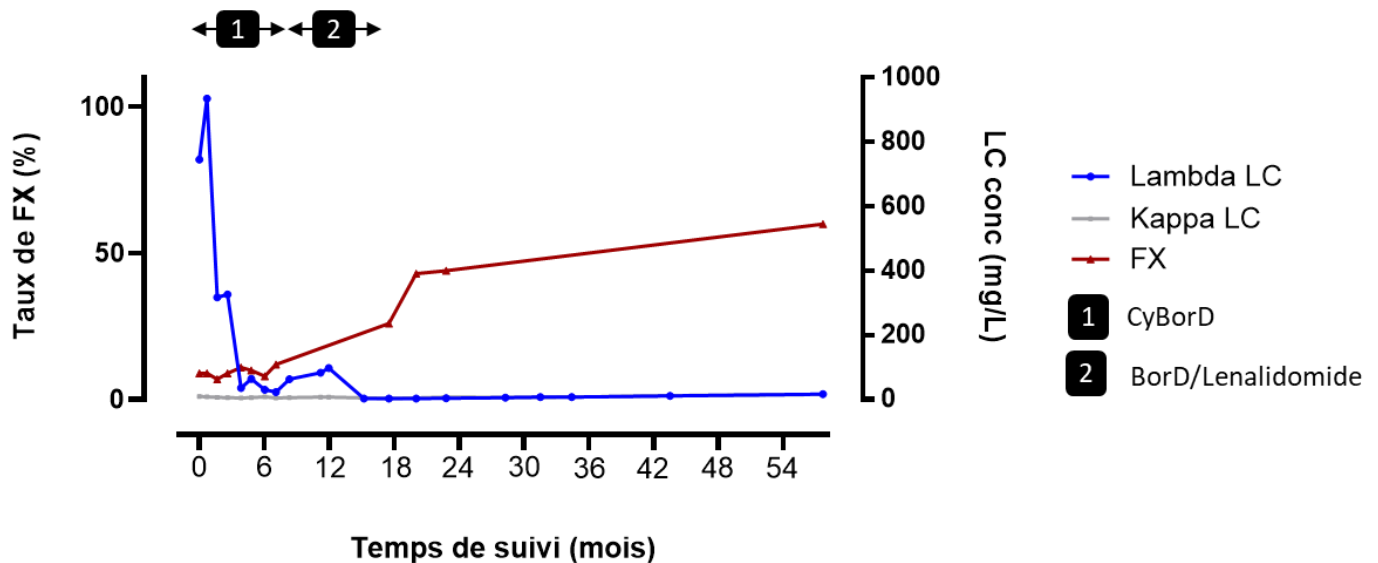


FIGURE 2 : SUIVI DES VARIATIONS DES TAUX DE FX ET DE CHAINES LEGERES LIBRES DANS LE TEMPS (PATIENT 2)

Les taux circulants de chaînes légères libres et de FX coagulant ont été dosés au cours du temps de suivi chez le patient 2. L'axe vertical de gauche correspond aux taux de FX (%) tandis que celui de droite est réservé aux taux de chaînes légères (en mg/L). La courbe bleue représente le suivi au cours du temps de la chaîne légère pathogène tandis que le suivi des taux de FX est représenté par une courbe rouge. 1, 2 et 3 désignent les combinaisons thérapeutiques reçus par les patients au cours du temps. CyBorD : Cyclophosphamide, Bortezomib et Dexaméthasone ; BorD : Bortezomib et Dexaméthasone.

Patient 3 :

Comme les patients 1 et 2, le patient 3 a initialement reçu un traitement combiné CyBorD (6 mois, 6 cycles). Comme observé chez le patient 1, cette combinaison thérapeutique a immédiatement entraîné une réponse hématologique, avec les taux de chaînes légères lambda libres chutant de 326,6 mg/L à 120,8 mg/L en un mois (Figure 3). Cependant, ces taux ne sont pas descendus plus bas, ce qui indique une réponse hématologique partielle. Une deuxième trithérapie (BorD + Lenalidomide) a été immédiatement administrée, mais elle n'a pas eu d'effet sur les taux de chaînes légères libres. Ce n'est qu'après une troisième trithérapie (BorD + Venetoclax), d'une durée de 6 mois, que le patient a finalement atteint une rémission complète. Contrairement aux deux autres patients, le patient 3 présentait des taux de FX dans les limites normales lors du diagnostic d'amylose AL. Malgré trois traitements successifs, ce patient n'a pas manifesté de fluctuations significatives de ses taux de FX. Les variations observées étaient minimales ($73 < x < 101\%$, soit $\pm 16\%$ par rapport à la moyenne), comparées aux patients 1 et 2 ($21 < x < 75\%$, soit $\pm 56\%$ et 7 à 60% , soit $\pm 79\%$, respectivement).

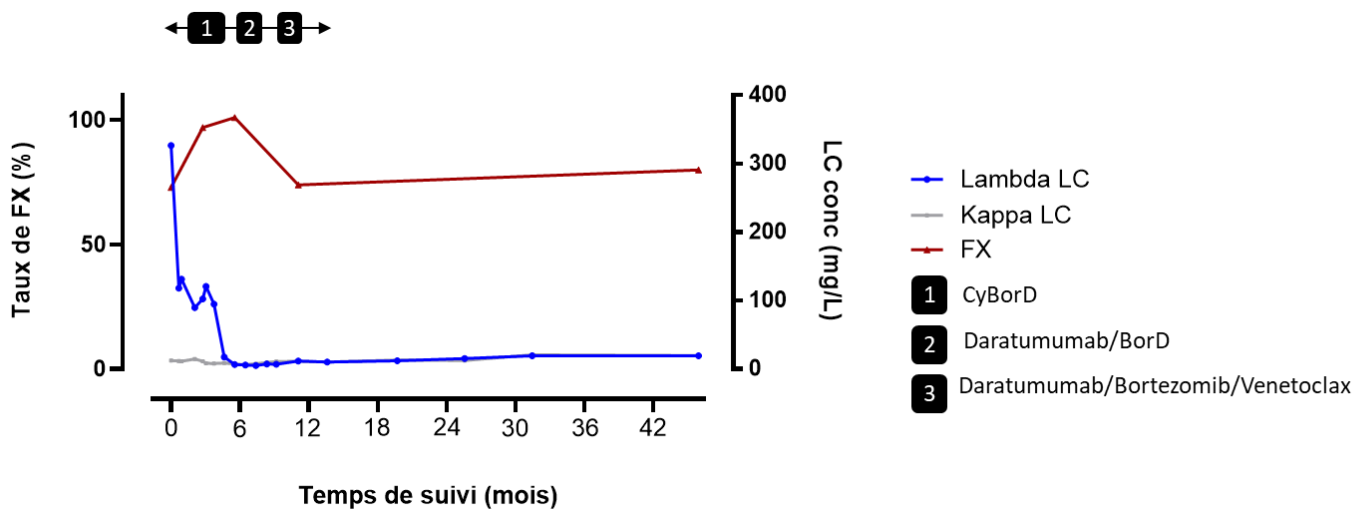


FIGURE 3 : SUIVI DES VARIATIONS DES TAUX DE FX ET DE CHAINES LEGERES LIBRES DANS LE TEMPS.

Les taux circulants de chaînes légères libres et de FX coagulant ont été dosés au cours du temps de suivi chez le patient 3 (C). L'axe vertical de gauche correspond aux taux de FX (%) tandis que celui de droite est réservé aux taux de chaînes légères (en mg/L). La courbe bleue représente le suivi au cours du temps de la chaîne légère pathogène tandis que le suivi des taux de FX est représenté par une courbe rouge. 1, 2 et 3 désignent les combinaisons thérapeutiques reçus par les patients au cours du temps. CyBorD : Cyclophosphamide, Bortezomib et Dexaméthasone ; BorD : Bortezomib et Dexaméthasone ; Dara : Daratumumab; Dexta : Dexaméthasone

En conclusion, les résultats obtenus mettent en évidence que bien que la trithérapie CyBorD ait induit une réponse hématologique chez tous les patients, son efficacité varie d'un individu

à l'autre et n'a jamais été permanente. Elle a été avantageusement remplacée par d'autres schémas thérapeutiques, tels que l'association Daratumumab, Lenalidomide et Dexaméthasone pour le patient 1, ou BorD + Lenalidomide pour le patient 2, et BorD + Venetoclax pour le patient 3. Dans tous les cas où la thérapie a engendré une réponse hématologique avec une normalisation des taux de chaînes légères libres, une observation ultérieure, généralement après plus d'un an, a révélé une augmentation voire une normalisation des taux de FX précédemment diminués.

Détection des plaques amyloïdes dans les coupes de tissus des patients atteints d'amylose AL

Afin de déterminer si on pouvait retrouver du FX dans les structures amyloïdes présentes dans les organes atteints des 3 patients, nous sommes partis de nouvelles coupes en série issues des biopsies qui avaient permis d'établir le diagnostic d'amylose AL. Pour le patient 1, les échantillons de biopsie ont été prélevés sur le tissu digestif, tandis que pour les patients 2 et 3, les biopsies ont été réalisées sur les glandes salivaires et sur de la graisse abdominale.

Lors de cette biopsie, le patient 1 avait déjà été traité (voir plus haut) et présentait un taux réduit de chaînes légères libres par rapport au taux mesuré lors de son inclusion (<25 mg/L versus 110 mg/L), tandis que pour les patients 2 et 3, les valeurs de chaînes légères libres étaient nettement plus élevées, s'établissant respectivement à 745 mg/L et 326,6 mg/L. En ce qui concerne le taux de FX:C, il était particulièrement bas pour la patiente 2 (<10%), restait en dessous de la normale pour le patient 1 (<50%), et atteignait 73% chez le patient 3, se situant ainsi dans les limites normales pour ce dernier.

Pour détecter la présence de structures amyloïdes dans les coupes obtenues, celles-ci ont été colorées au rouge Congo et observées sous un microscope en utilisant une lumière polarisée. Il a été observé chez tous les patients, à travers toutes leurs coupes, la présence de vastes zones colorées en rouge Congo, accompagnées d'une biréfringence jaune-verte, indiquant ainsi la présence de dépôts amyloïdes (Figures 4A, 4B, 5A, 6A et 6C). Pour le patient 1 ces dépôts biréfringents ont été principalement localisés dans les régions basales des muqueuses du système digestif (Figures 4A, 4B). En ce qui concerne les glandes salivaires, les dépôts amyloïdes ont été principalement limités dans les régions extracellulaires au niveau des

travées de conjonctif (patients 2 et 3, respectivement Figures 5A et 6A) mais également, au niveau de zones hautement vascularisées (Figure 6A). Alors que les structures amyloïdes ont été trouvées concentrées dans des zones délimitées des glandes salivaires pour le patient 2 (Figure 5A), elles ont été observées sur la quasi-totalité de la coupe pour le même tissu chez le patient 3 (Figure 6A). Plusieurs zones, de petite surface, négatives à la biréfringence jaune-verte ont néanmoins été trouvées. En ce qui concerne les biopsies de la graisse abdominale, les structures des coupes marquées au rouge Congo ont été assez endommagées mais il a été possible sur au moins 1 coupe des patients 2 et 3 de différencier des zones positives où de la biréfringence était visible de zones négatives où elle était absente (Figure 6B). En conclusion, l'examen des coupes colorées au rouge Congo a révélé que les tissus des régions riches en structures amyloïdes étaient plus gravement altérés que les régions dépourvues de ces structures, indépendamment de l'organe examiné. Globalement, des zones positives contenant des structures amyloïdes ont été clairement identifiées dans toutes les coupes, tandis que des zones négatives, sans biréfringence et donc sans amyloïdes, ont également été observées.

Le FX est présent dans les plaques amyloïdes de patients atteints d'amylose AL

Pour détecter, au niveau des zones amyloïdes précédemment identifiées, l'éventuelle présence de FX et sa colocalisation avec les chaînes légères nous avons utilisé des coupes issues des mêmes biopsies faites en série en même temps que celles utilisées pour la coloration du rouge Congo. Nous avons ainsi pu reporter par superposition des coupes, des zones positives et négatives correspondant à celles identifiées au rouge Congo dans les coupes utilisées pour détecter la présence de FX et de chaînes légères.

Pour le patient 1 on a observé dans les zones positives la forte présence de chaînes légères par rapport à ce qui est observé dans les zones négatives en utilisant un anticorps anti-chaîne légère kappa (Figure 4C). Dans ces mêmes zones positives, on a visualisé une superposition du signal du FX avec le signal de la chaîne légère (Figure 4C) qui induit d'ailleurs, l'acquisition d'une coloration jaune (Figure 4C). On a déterminé que cette superposition de signal dans les zones positives correspondait à la présence d'une quantité plus importante de chaîne légère

et de FX par rapport à ce qui était trouvé dans les zones négatives. Pour cela, nous avons comparé pour chaque canal, le vert pour les chaînes légères et le rouge pour le FX, les valeurs de l'intensité de fluorescence moyenne de l'image ou « mean gray value » entre les zones positives et négatives de même taille. Dans le canal vert, nous avons déterminé que la valeur moyenne des « mean gray value » des zones positives (918 ± 612) est significativement supérieure à celle des zones négatives (334 ± 204 , $P < 0,0001$, $n=37$; Figure 4D). De la même façon dans le canal rouge, nous avons calculé que la valeur moyenne des « mean gray value » dans les zones positives est significativement supérieure à celle trouvée dans les zones négatives (2153 ± 2110 versus 543 ± 361 ; $P < 0,0001$, $n=37$; Figure 4D).

Ensuite, pour évaluer si cette accumulation de chaînes légères et de FX dans les zones positives ou amyloïdes correspondait à une colocalisation des signaux de FX et de chaîne légère kappa nous avons déterminé pour chaque zone sélectionnée (positives et négatives) dans les différentes coupes disponibles un coefficient de Manders appelé M1 quand il indique la part du signal rouge de FX colocalisé avec le signal vert de la chaîne légère et M2 quand il indique l'inverse (la part du signal vert de la chaîne légère dans le signal rouge du FX). Dans les zones positives, nous avons trouvé une valeur moyenne de M1 égale à $0,59 \pm 0,28$ qui indique une colocalisation majoritaire du FX sur les chaînes légères. De plus, cette valeur est significativement supérieure à celle des zones négatives ($0,12 \pm 0,13$, $P < 0,0001$; Figure 4E). De la même façon, nous avons calculé que la valeur moyenne de M2 dans les zones positives est significativement supérieure à celle trouvée dans les zones négatives ($0,81 \pm 0,19$ versus $0,28 \pm 0,14$; $P < 0,0001$; Figure 4E) indiquant une colocalisation des chaînes légères de zones positives avec le FX. En conclusion, l'ensemble de ces résultats montrent que dans les intestins du patient 1 il y a une accumulation et une colocalisation du FX et des chaînes légères uniquement dans les zones riches en structures amyloïdes

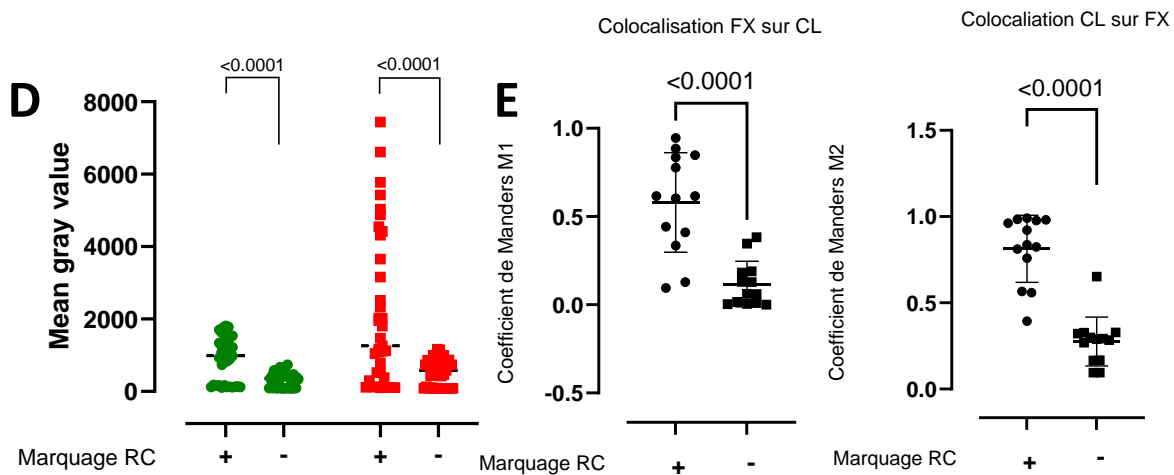
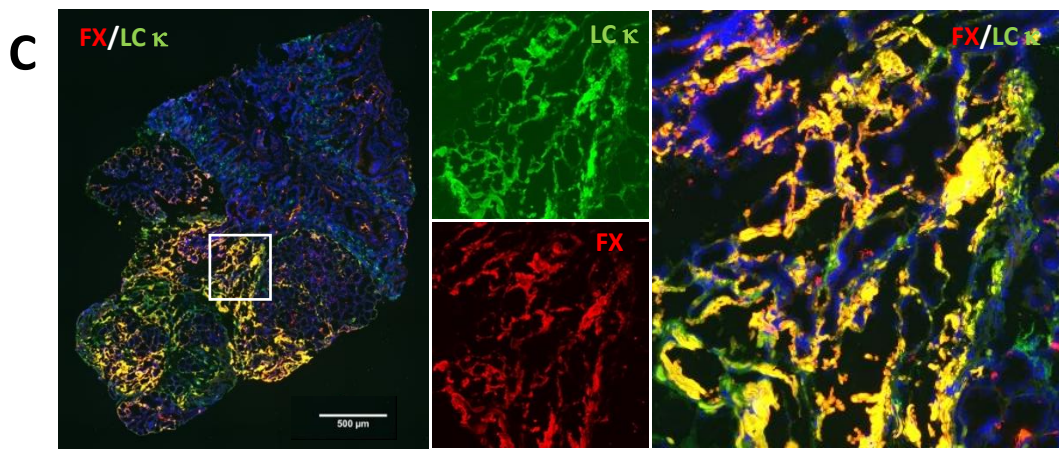
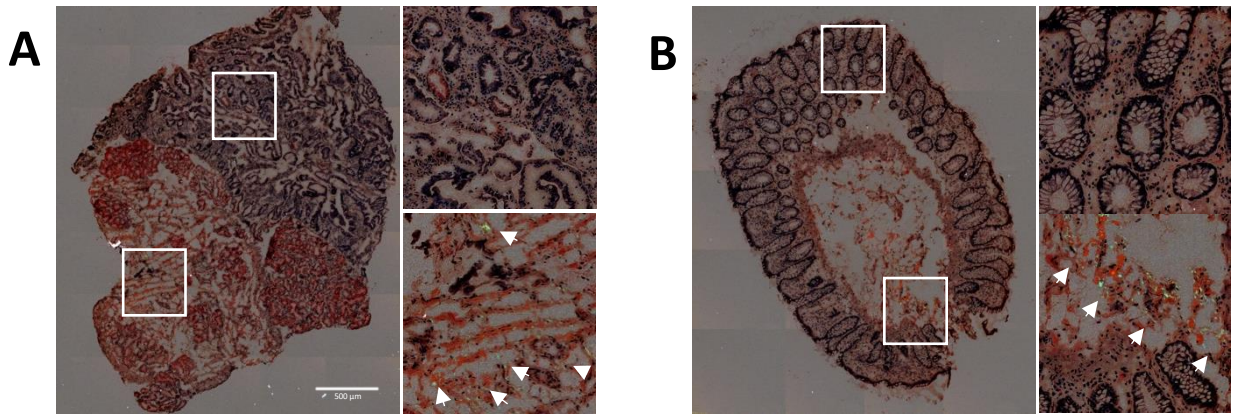


FIGURE 4 : LE FX EST COLOCALISE AVEC LES PLAQUES AMYLOÏDES DANS LES ORGANES ATTEINTS DU PATIENT 1.

Histologies de la biopsie intestinale, (A) de l'antre, (B) et du colon. Les photomicrographies à 63x des coupes colorées avec le rouge Congo sous lumière polarisée, révèlent l'apparence de biréfringence verte comme caractéristique de la présence de structure amyloïdes dans les parties apicales des muqueuses (flèches blanches). (A et B) L'encadré blanc inférieur délimite une zone positive (présence de structures amyloïdes pointées avec des flèches) alors que l'encadré supérieur délimite une zone négative (absence de structures amyloïdes). (C) Microscopie en champ large, images du FX (rouge) et de chaîne légère kappa (Vert) immunomarqués sur une coupe issue de l'antre du patient. Objectif 63x, les barres représentent 500 µm. (D) Comparaison de l'intensité moyenne de fluorescence pour chaque canal, le vert (chaînes légères) et le rouge (FX), des valeurs de l'intensité de fluorescence moyenne de l'image ou « mean gray

value » entre les zones positives (+) et négatives (-) au rouge Congo (RC). (E) La colocalisation du FX sur les chaînes légères kappa dans les zones positives (+) au rouge Congo (RC) ou dans les zones négatives (-) a été quantifiée en calculant les valeurs des coefficients de Manders M1 et M2, respectivement (voir méthodes pour les détails). Les résultats sont exprimés sous forme de points individualisés représentant un champ où la valeur moyenne est indiquée ainsi que l'écart-type par des barres d'erreur. Un test t non apparié a été utilisé pour les calculs statistiques.

Chez la patiente 2, nous avons également observé un phénomène d'accumulation et de colocalisation du FX et des chaînes légères dans les zones identifiées positives (Figures 5B et 5E) que nous n'avons pas retrouvé dans les zones négatives. Ces observations ont été objectivées par la comparaison de l'intensité de fluorescence moyenne ou « mean gray value » entre les zones positives et négatives et par la détermination des coefficients de Manders M1 et M2. Ainsi, pour le canal vert et le canal rouge, nous avons trouvé que les valeurs moyennes des « mean gray value » des zones positives étaient significativement plus élevées que celles des zones négatives que cela soit pour les coupes issues des glandes salivaires (canal vert : 1639 ± 302 versus 472 ± 51 , $P < 0,0001$, $n=15$; canal rouge : 643 ± 136 versus 434 ± 117 , $P=0,0002$, $n=15$; Figure 5C) que pour celles issues de la graisse abdominale (canal vert : 1411 ± 224 versus 714 ± 162 , $P < 0,0001$, $n=10$; canal rouge : 3100 ± 1135 versus 814 ± 253 , $P < 0,0001$, $n=10$; Figure 5F). En ce qui concerne les coefficients de Manders, nous avons trouvé que les valeurs moyennes de M1 et M2 dans les zones positives étaient significativement plus élevées que celles des zones négatives que cela soit pour les coupes issues des glandes salivaires (M1 = $0,661 \pm 0,099$ versus $0,539 \pm 0,106$; $P = 0,0068$, $n=12$; M2 = $0,467 \pm 0,133$ versus $0,159 \pm 0,092$; $P < 0,0001$, $n=12$; Figure 5D) que pour celles issues de la graisse abdominale (M1 = $0,978 \pm 0,037$ versus $0,372 \pm 0,275$; $P < 0,0001$, $n=9$; M2 = $0,867 \pm 0,062$ versus $0,444 \pm 0,260$; $P=0,0002$, $n=8$; Figure 5G).

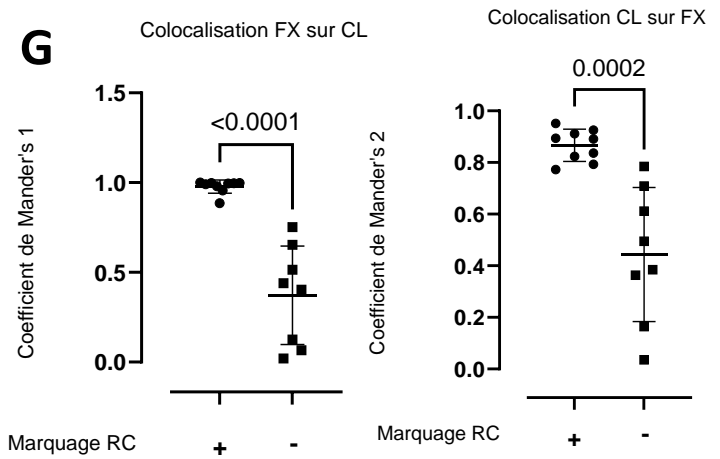
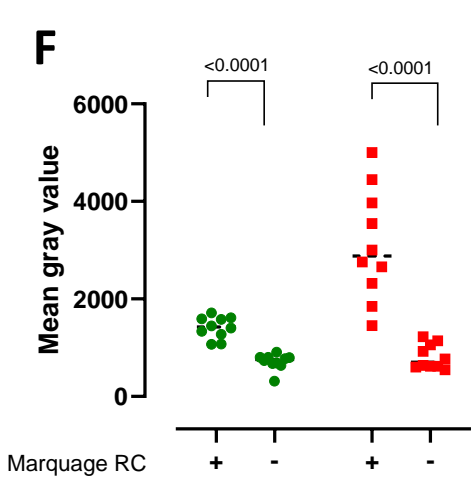
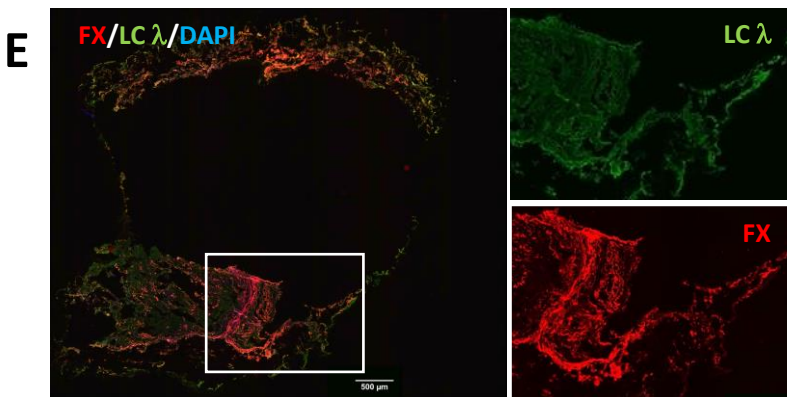
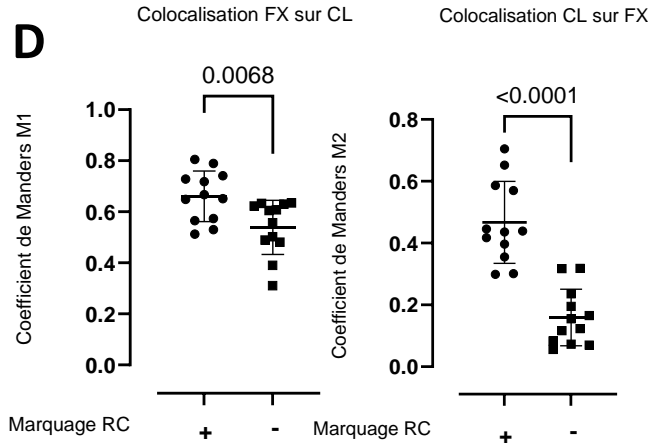
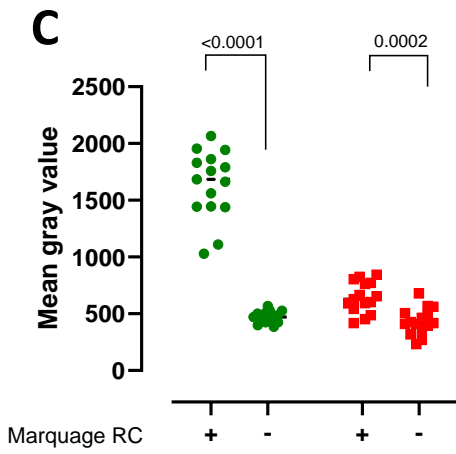
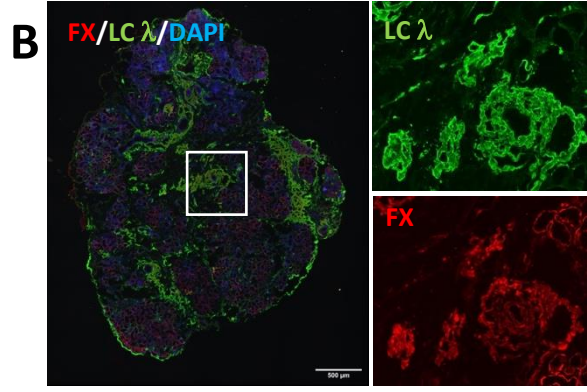
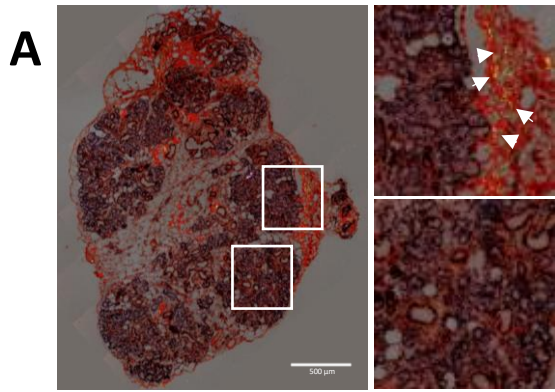


FIGURE 5 : LE FX EST COLOCALISE AVEC LES PLAQUES AMYLOÏDES DANS LES ORGANES ATTEINTS DU PATIENT 2.

(A) Histologies des biopsies de glandes salivaires colorées avec le rouge Congo sous lumière polarisée, révélant l'apparence de biréfringence vert-pomme caractéristique de la présence de structure amyloïdes (flèches blanches). L'encadré blanc supérieur délimite une zone positive (présence de structures amyloïdes) alors que l'encadré inférieur délimite une zone négative (absence de structures amyloïdes). **(B)(E)** Microscopie en champ large, images du FX (rouge) et de chaîne légère lambda (Vert) immunomarqués sur une coupe issue de glandes salivaires **(B)** et de la graisse abdominale **(E)**. Objectif 63x, les barres représentent 500 μm . **(B)(E)** L'encadré blanc dans l'image de gauche délimite une zone positive qui est élargie dans les images de droite du même panel. **(C)(F)** Comparaison pour chaque canal, le vert pour les chaînes légères et le rouge pour le FX, des valeurs de l'intensité de fluorescence moyenne de l'image ou « mean gray value » entre les zones positives (+) et négatives (-) au rouge Congo (RC). **(D)(G)** Les colocalisations du FX sur les chaînes légères (CL) lambda dans les zones positives (+) ou négatives (-) au rouge Congo (RC) et des CL lambda sur le FX ont été quantifiées en calculant, les valeurs des coefficients de Manders M1 et M2, respectivement (voir méthodes pour les détails). Les résultats sont exprimés sous forme de points individualisés représentant un champ où la valeur moyenne est indiquée ainsi que l'écart-type par des barres d'erreur. Un test t non apparié a été utilisé pour les statistiques.

L'ensemble de ces résultats démontrent que dans les tissus observés de la patiente 2, il y a une accumulation et une colocalisation du FX et des chaînes légères uniquement dans les zones riches en structures amyloïdes.

Dans les coupes issues des glandes salivaires du patient 3, une observation significative a été faite : la présence quasi-ubiquitaire de chaînes légères lambda à travers tout le tissu (voir Figure 6B). Cette distribution des chaînes légères lambda semble suivre étroitement la répartition des structures amyloïdes identifiées, comme illustré dans la Figure 6A. Lorsqu'une observation plus minutieuse a été réalisée dans les zones riches en structures amyloïdes, une corrélation intéressante a été constatée : le signal du FX était plus intense dans les structures où le signal de la chaîne légère était également plus prononcé. Par exemple, cette corrélation était nettement discernable à la périphérie des vaisseaux sanguins (voir Figure 6B), où des structures amyloïdes étaient détectables (voir Figure 6A). Cependant, il est également important de noter qu'une absence de signal rouge a été observée dans ces mêmes zones positives où un signal vert élevé était présent (voir Figure 6B). L'absence d'accumulation significative du FX dans les zones positives par rapport aux zones négatives a été démontré par le calcul des « mean gray values ». Si dans le canal vert (chaîne légère), on a déterminé que les « mean gray value » étaient significativement supérieures dans les zones positives par rapport aux zones négatives (1373 ± 198 versus 791 ± 44 , $P < 0,0001$, $n=6$; Figure 6C) au contraire dans le canal rouge (FX), ces valeurs ont été trouvées identiques dans les 2 types de

zones (zone positives : 583 ± 79 versus zones négatives : 579 ± 81 , $P=0,9334$, $n=6$; Figure 6C). En conclusion, s'il y a bien une accumulation des chaînes légères dans les zones positives par rapport aux zones négatives, il n'y a pas d'accumulation de FX et donc pas de colocalisation significative du FX avec les chaînes légères accumulées dans les zones positives. En analysant les coupes de graisse abdominale de ce patient, une observation notable a été faite : dans les zones positives renfermant des structures amyloïdes (voir Figures 6D et 6E), les signaux vert et rouge sont significativement plus intenses que dans les zones négatives (voir Figures 6D et 6F). Cette constatation est étayée par les valeurs plus élevées des "mean grey values" du canal vert et du canal rouge dans les zones positives par rapport aux zones négatives (canal vert : 1029 ± 190 versus 679 ± 88 , $P < 0,0001$, $n = 11$; canal rouge : 887 ± 385 versus 646 ± 177 , $P = 0,0520$, $n = 11$; voir Figure 6G). Tout aussi remarquable, on a observé que les valeurs moyennes de M1 et M2 dans les zones positives étaient significativement plus élevées que celles des zones négatives dans les coupes de graisse abdominale (M1 = $0,45 \pm 0,19$ versus $0,12 \pm 0,14$; $P = 0,0004$, $n=11$; M2 = $0,85 \pm 0,14$ versus $0,17 \pm 0,16$; $P < 0,0001$, $n=11$; Figure 6H). En conclusion, concernant le patient 3, bien qu'une accumulation de dépôts de chaînes légères amyloïdes ne semble pas coïncider avec la présence de FX, comme cela a été observé dans les glandes salivaires, une tendance à l'accumulation de FX à proximité des dépôts amyloïdes peut être observée au niveau des tissus de la graisse abdominale qui semble entraîner une colocalisation des 2 protéines. Ainsi, la colocalisation du FX et des chaînes légères chez le patient 3 semble être tissu dépendant, contrairement aux observations faites chez les patients 1 et 2.

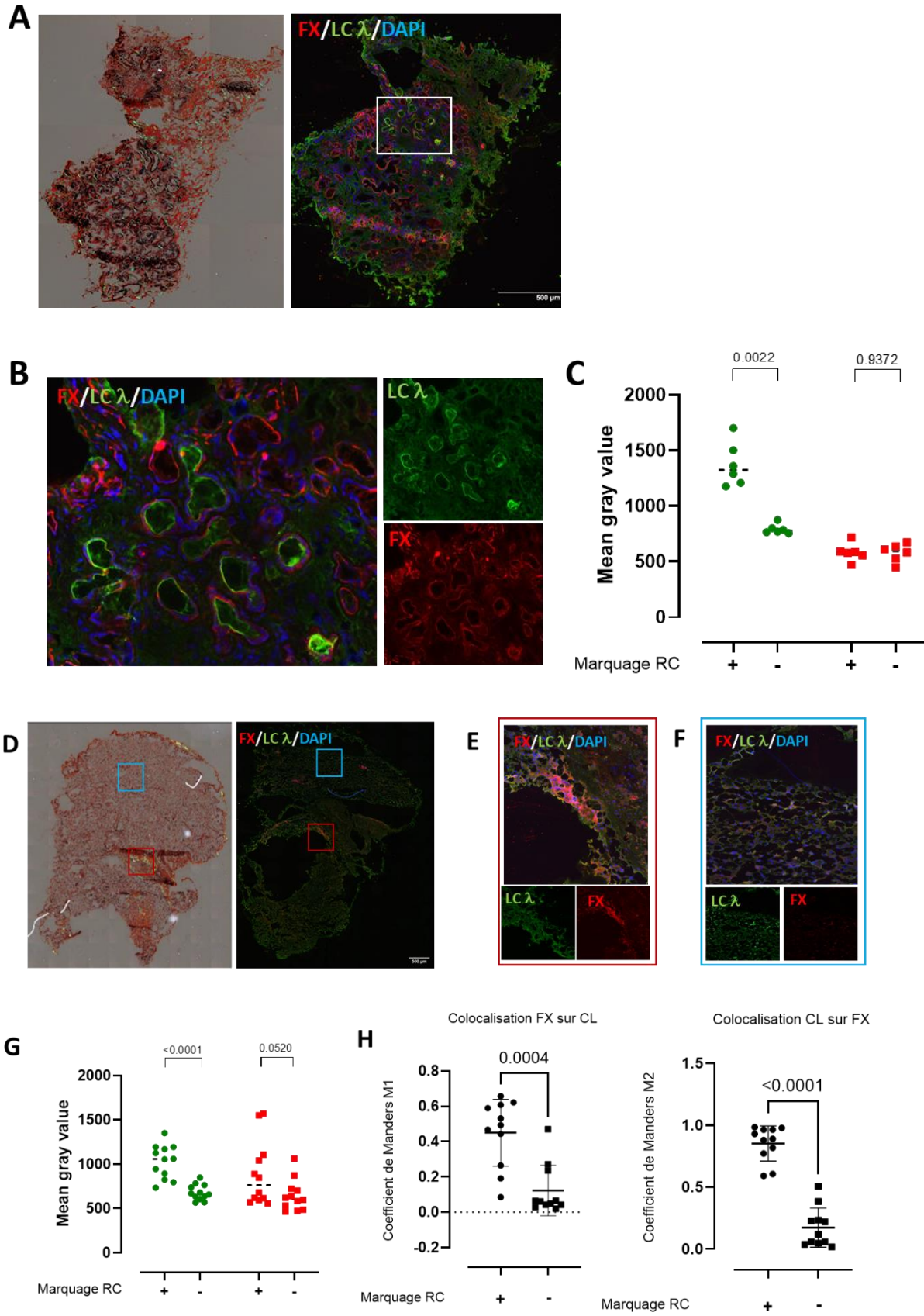


FIGURE 6 : LE FX EST COLOCALISE AVEC LES PLAQUES AMYLOÏDES DANS LES ORGANES ATTEINTS DU PATIENT 3.

Histologies des biopsies de glandes salivaires (A) et de graisse abdominale (D) colorées avec le rouge Congo sous lumière polarisée, révélant l'apparence de biréfringence vert pomme caractéristique de la présence de structure amyloïdes. Microscopie en champ large, images du FX (rouge) et de chaîne légère lambda (Vert) immunomarqués sur une coupe issue de glandes salivaires (A) (B) et de la graisse abdominale (D)(E)(F). Objectif 63x, les barres représentent 500 µm. (A) L'encadré blanc délimite une zone positive (présence de structures amyloïdes) correspondant aux images du panel (B). (D) L'encadré rouge délimite une zone positive (présence de structures amyloïdes) correspondant aux images du panel (E), l'encadré bleu une zone négative (pas de structures amyloïdes) correspondant aux images du panel (F). (C)(G) Comparaison pour chaque canal, le vert pour les chaînes légères et le rouge pour le FX, des valeurs de l'intensité de fluorescence moyenne de l'image ou « mean gray value » entre les zones positives (+) et négatives (-) au rouge Congo (RC) (H) Au niveau de la graisse abdominale, les colocalisations du FX sur les chaînes légères (CL) lambda dans les zones positives (+) ou négatives (-) au rouge Congo (RC) et des CL lambda sur le FX ont été quantifiées en calculant, les valeurs des coefficients de Manders M1 et M2, respectivement (voir méthodes pour les détails). Les résultats sont exprimés sous forme de points individualisés représentant un champ où la valeur moyenne est indiquée ainsi que l'écart-type par des barres d'erreur. Un test t non apparié a été utilisé pour les statistiques.

Conclusions et perspectives

Au cours de cette partie de mon projet, les résultats de diverses approches analytiques en microscopie de biopsies de deux patients atteints d'amylose AL et de déficit acquis en FX révèlent une colocalisation du FX avec les chaînes légères amyloïdes. Nos observations confirment les 2 seules études précédentes^{266,279} qui ont montré une liaison directe du FX aux structures amyloïdes de patients atteints d'amylose AL et d'un déficit en FX et qui servent de base au postulat que le déficit en FX est dû à l'adsorption du FX par les structures amyloïdes l'éliminant ainsi de la circulation.

L'observation d'une colocalisation entre le FX et les chaînes légères amyloïdes chez un patient présentant des taux normaux de FX (73%) constitue alors une interrogation.

Aujourd'hui on estime de 8 à 14% le nombre de patients d'amylose AL présentant un déficit en FX selon les principales cohortes rapportées dans la littérature en considérant les patients avec un taux de FX coagulant < 50 %.²⁶⁷⁻²⁶⁹ Dans une population normale, l'activité du FX varie généralement entre 70 et 150 %. La limite inférieure dépend de caractéristiques de chaque laboratoire et de la population de référence utilisée. Si on considère un déficit comme étant un abaissement du taux de FX en dessous de 70%, correspondant à la limite inférieure de la population normale, le pourcentage de patients atteints d'amylose AL présentant un déficit en FX augmente significativement, atteignant 62 % et non pas 14 % dans une étude chinoise et 43% et non pas 14% dans une étude de la clinique Mayo.^{269,270} Cela pourrait expliquer pourquoi le patient présentant un FX à 73% présentait malgré tout une légère adsorption de FX sur les plaques amyloïdes de sa graisse abdominale. Pour confirmer explorer cette observation, nous envisageons d'inclure plus de patients présentant des taux de FX supérieurs à 50 %, procéder au suivi de la fluctuation du taux de FX au cours du temps et des traitements et rechercher l'adsorption du FX sur les biopsies.

Par ailleurs, nous avons montré dans des précédents travaux que le FX circule, associé à la SAP dans le plasma.¹¹⁰ Il a été démontré par de nombreuses études par ailleurs que la SAP est une protéine retrouvée dans toutes les plaques amyloïdes.²¹⁸ Une question pertinente se pose alors de savoir si le FX se retrouve dans les plaques amyloïdes de chaînes légères par l'intermédiaire de la SAP et si oui pourquoi le déficit en FX n'est pas retrouvé dans les autres

formes d'amylose. Pour adresser cette question, nous prévoyons d'inclure dans notre étude, en collaboration avec le centre de référence des amyloses, des patients diagnostiquées avec d'autres amyloses comme l'amylose inflammatoire (AA).

Enfin, notre étude souligne l'importance de surveiller régulièrement les taux de FX chez les patients atteints d'amylose AL, non seulement lors du diagnostic initial, mais également tout au long de leur suivi thérapeutique. Cette surveillance offre des informations supplémentaires cruciales sur l'évolution de la maladie. Alors que plusieurs approches thérapeutiques visant à traiter l'amylose AL peuvent entraîner une augmentation de l'activité coagulante du FX, l'association entre ces variations et les résultats du traitement reste largement inexplorée. Une analyse rétrospective, menée sur une cohorte de patients consécutifs présentant à la fois une amylose AL et un déficit en FX, où l'activité du FX, la réponse hématologique et la réponse des organes touchés auraient été mesurées, pourrait offrir des éclaircissements précieux.

Chapitre 2 :

Exploration biochimique du mécanisme de déficit en FX dans l'amylose à chaînes légères

Introduction

L'amylose AL repose sur une gammopathie monoclonale acquise, avec de fortes concentrations circulantes de chaînes légères anormales d'immunoglobulines monoclonales issues de plasmocytes. Ces chaînes légères, instables s'agrègent en protofibrilles puis en fibrilles insolubles et se déposent dans la matrice extra cellulaire des organes. Au cours de leurs différents états structuraux, les chaînes légères anormales sont capables d'interagir avec différents ligands. On retrouve ainsi, beaucoup de ses ligands dans les fibrilles insolubles des matrices extracellulaires qui sont généralement formées d'environ 80 % de la chaîne légère responsable et de 20 % d'autres molécules. Il est intéressant de noter que ces ligands, dans une grande majorité, sont retrouvés dans les fibrilles d'autres types d'amyloses. Ces molécules communes, parmi lesquelles les apolipoprotéines E (ApoE), A-I et A-IV, la serum amyloid P (SAP), différents protéoglycanes contribuent à stabiliser les fibrilles, à favoriser leur formation et/ou à empêcher leur dégradation.^{171,284,285} Les fibrilles insolubles de l'amylose AL se distinguent par la présence du facteur X (FX) de la coagulation sanguine. Bien que plusieurs études aient suggéré ou montré la présence du FX dans les plaques amyloïdes chez les patients atteints d'amylose AL, aucune publication ou communication connue à ce jour n'a signalé sa présence dans les structures amyloïdes associées à d'autres pathologies. Nous nous sommes posés la question de savoir comment le FX se retrouvait dans les plaques amyloïdes uniquement de patients avec une amylose AL. Il est généralement admis qu'il interagit directement avec les plaques amyloïdes dans l'amylose AL et que probablement cette capture entraîne un déficit en FX quand cette adsorption est suffisamment importante pour déséquilibrer la balance entre la production et la clairance du FX. Cependant avant de se retrouver dans les plaques amyloïdes, ces deux entités spécifiques de l'amylose AL que sont le FX et la chaîne légère pathogène, libre, ont la possibilité de se rencontrer dans la circulation,

avant que la chaîne légère n'adopte la structure compacte des fibrilles amyloïdes matures. Cela soulève la question d'un impact éventuel de cette potentielle interaction sur la biologie du FX, notamment sur son activité coagulante. Ce qui pourrait conduire à un déficit en FX par défaut d'activité comme décrit dans la cohorte de *Mumford*.²⁷¹ Par ailleurs, nous avons récemment mis en évidence un mécanisme de régulation du taux de FX au niveau des macrophages impliquant la SAP.¹¹⁰ Une potentielle interaction de la chaîne légère pathogène avec le FX pourrait également, en perturbant ce mécanisme régulateur des taux de FX, conduire à son déficit. Pour explorer ces différentes interrogations, nous avons étudié l'interaction en solution entre le FX et deux chaînes légères, l'une provenant d'un patient présentant une amylose AL compliqué d'un déficit sévère en FX et l'autre d'un patient amylose AL sans déficit de la coagulation, mais avec le même isotype de chaîne légère. À travers divers tests fonctionnels, nous avons examiné l'influence de ces chaînes légères sur les fonctions biologiques du FX, telles que son activité et son interaction avec les macrophages. Nos résultats pourraient contribuer à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au déficit acquis en FX observé chez certains patients atteints d'amylose AL, en proposant des explications alternatives à celles généralement admises.

Matériels et Méthodes

1. Patients

Nous avons opté pour une production recombinante par des bactéries des chaînes légères de deux patients, anonymisés Ma et Sa dans ce projet. Ces patients ont été suivis par le Centre National de Référence Maladie rare, amyloses AL et autres maladies de dépôts d'immunoglobulines monoclonales (labellisé en juillet 2006). Au moment de leur diagnostic, ils ont présenté des chaînes légères libres de même type, lambda, mais un profil hémostatique différent (Tableau I). Alors que le patient Sa ne présentait pas de déficit global de la coagulation, le patient Ma présentait un déficit majeur de l'activité coagulante du FX. Tous les patients ont donné leur consentement éclairé conformément aux principes de la déclaration d'Helsinki.

TABLEAU I : DONNEES AU DIAGNOSTIC DES PATIENTS

Caractéristiques	Patient Ma	Patient Sa
Diagnostic spécifique	MGCS	MGCS
Coagulation	FX.C = 7% ; TP anormal	FX.C = ND; TP normal
Type de chaîne légère (germinale)	Lambda (V λ 2-14*03- J λ 3*02)	Lambda (V λ 6-57*01- J λ 3*02)
Taux de chaînes légères libres (mg/L)	745	128

MGCS : gammopathie monoclonale de signification clinique ; TP : taux de prothrombine ; ND = non déterminé

2. Constructions génétiques des chaînes légères et de leurs variants moléculaires

2-a. Génération des constructions génétiques de chaînes légères

Les ADN codant pour les chaînes légères des deux patients, Ma et Sa, ont été produits synthétiquement par Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany). Les chaînes légères complètes (VLCL) mais aussi les domaines variables seuls (VL) ont été synthétisés. Toutes les constructions ont été pensées pour s'exprimer avec des étiquettes, ou « Tags », cMyc et 6X-histidine (HisX₆) pour permettre la purification et la caractérisation des protéines. Afin de

pouvoir cliver les « Tags », un site de clivage spécifique à la thrombine (Ila) a été inséré entre l'extrémité C-terminale de VLCL ou de VL et la séquence des « Tags ». La séquence de « Tags » fait partie des plasmides qui ont été utilisés pour exprimer les différentes constructions de chaînes légères de ce projet (voir description des plasmides).

De nombreuses publications ont établi l'instabilité des VL isolés et purifiés ainsi que des difficultés rencontrées lors de leur production et purification. Afin de contourner cet obstacle, nous avons généré un type de construction intermédiaire incluant un site de clivage à la thrombine entre la partie variable et la partie constante afin de pouvoir obtenir le VL seul après purification et digestion à la thrombine. La Figure 1 récapitule les différentes constructions générées.

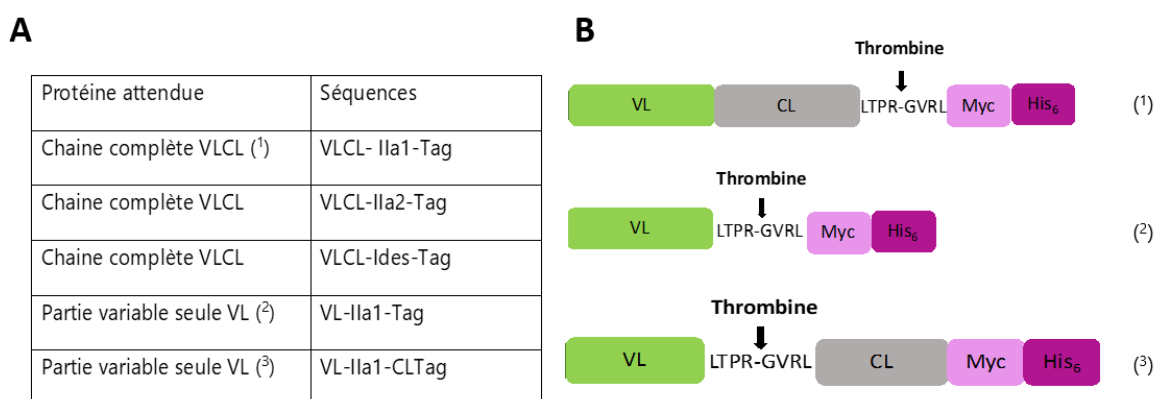


FIGURE 1 : PANEL EXPLICATIF DES CONSTRUCTIONS DES ADNc

(A) Le tableau récapitule l'ensemble des constructions ayant été générés lors des essais de production des chaînes légères. VLCL : chaîne légère complète ; VL : partie variable de la chaîne légère ; CL : partie constante de la chaîne légère ; Ila1 : 1^{ere} séquence d'un site de clivage à la thrombine (LTPR-GVRL) ; Ila2 2^e séquence d'un site de clivage à la thrombine (LVPR-GS) ; Ides : enzyme dégradant l'immunoglobuline extraite du streptocoque pyogène **(B)** Schéma des modèles (1) ; (2) et (3) décrits dans le tableau A.

2-b. Génération génétique des chimères inter chaînes des chaînes légères

Des chimères par interversion des parties variables des deux chaînes légères Ma-LC et Sa-LC ont été générées par assemblage de produits de PCR (Figure 2). Brièvement, les parties variables et les parties constantes ont été amplifiées grâce à une ADN polymérase de haute fidélité selon le protocole du fabricant (Hifi-PCR polymérase ; New England Biolabs, Évry-

Courcouronnes, France). Les fragments amplifiés ont été purifiés avant d'être assemblés et clonés dans un vecteur d'expression bactérien d'intérêt en utilisant le NEBuilder HIFI DNA assembly Master Mix (New England Biolabs).

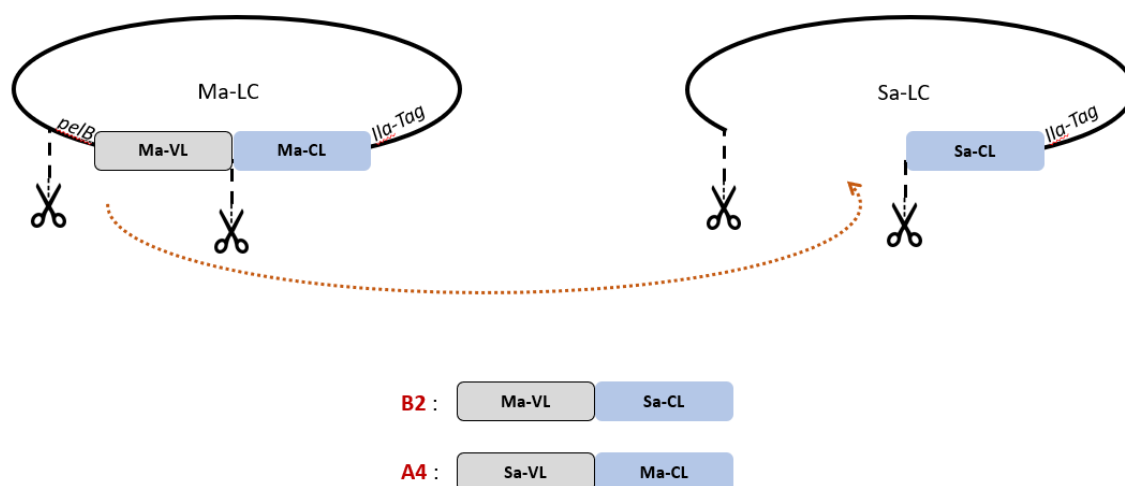


FIGURE 2 : REPRESENTATION DU PROCESSUS D'INTERVERSION DE PARTIES VARIABLE

Ila-Tag : site de clivage à la thrombine (Ila) accolé aux tags cMyc et His-6.

2-c. Génération des variants de chaînes légères mutées

Des mutants de la chaîne légère du patient Ma (Ma-LC) ont été générés par mutagenèse dirigée multisite en utilisant le Lightning QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit et les instructions du fabricant (Agilent technologies, France). Brièvement, les amorces complémentaires de l'ADNc et contenant les bases à muter sont ajoutés à de faibles concentrations à l'ADNc d'origine (matrice). Une PCR permet d'amplifier le mutant généré et une digestion par l'endonucléase Dpn1 (contenu dans le kit) permet d'éliminer par digestion la matrice. L'ADNc muté résultant est utilisé pour transférer des bactéries.

Les sites de mutation ont été sélectionnés en utilisant les séquences de références du système d'information international ImMunoGeneTics (IMGT). Pour les immunoglobulines, les séquences de référence IMGT sont définies pour les V-GENE, D-GENE et J-GENE de la lignée germinale, ainsi que pour les C-GENE. En entrant la séquence de Ma-LC dans le serveur IMGT/V-QUEST on a identifié comme séquence la plus proche celle de la séquence germinale non pathogène IGLV2-14*03. Ainsi, après alignement de la séquence en acides aminés de

d'anticorps composé d'un seul domaine d'anticorps variable monomère capable de se lier sélectivement à un antigène spécifique.²⁸⁶ Les vecteurs pHEN6 (Figure 4) pET22 (Figure 5) et pET28 (Figure 6) possèdent des propriétés communes. Pour pHEN6 et pET22 on retrouve en commun un gène de résistance à l'ampicilline (*ampR*) alors que c'est un gène de résistance à la kanamycine pour pET28. Pour pHEN6 et pET22 il y a une séquence nucléotidique codant pour un peptide signal pelB. La fusion de la séquence pelB avec celle du gène codant pour la chaîne légère d'intérêt permet l'expression de celle-ci dans le périplasme d'*E.coli* ce qui facilite la formation de ponts disulfures. Avec pET28, les protéines produites ont été extraites par lyse du cytoplasme bactérien lors de la production par une bactérie *E.coli* appelée Shuffle (voir production) qui possède notamment un cytoplasme favorisant la formation de ponts disulfure. Dans les 3 vecteurs, le gène d'intérêt est sous le contrôle de l'opérateur lac, système inductible à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG).²⁸⁷ Dans les 3 vecteurs il y a des séquences codant pour un Tag HisX6 qui se retrouvera dans la partie N-terminale de nos protéines d'intérêt avec le vecteur pET28 et dans la partie C-terminale avec les vecteurs pHEN6 et pET22. Dans le vecteur pHEN6 un Tag cMyc est co-présent avec le Tag HisX6. Les tags HisX6 ont été utilisés pour la purification par affinité (voir production des chaînes légères).

3-b. Sous-clonage des constructions génétiques des chaînes légères dans le vecteur pHEN6

Les constructions génétiques des chaînes légères ont été clonées dans PHEN6 après digestion par les enzymes de restriction *HindIII* et *NotI* (New England Biolabs) des constructions synthétisées par Eurofins dans un plasmide pEX-A128 et d'un plasmide PHEN6 contenant le gène d'un nanobody. Brièvement, le vecteur pHEN6 linéarisé et libéré du gène du nanobody ainsi que les fragments de chaînes légères d'intérêts générés par digestion par les enzymes *HindIII* et *NotI* ont été séparés sur gel d'agarose. Les bandes d'ADN correspondant ont été découpées du gel, et l'ADN extrait a été purifié en utilisant le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) en suivant les instructions du fabricant. Ces éléments ont ensuite été assemblés par ligation avec la Quick ligase (New England Biolabs) selon le protocole du fabricant. Les produits de ligation ont été utilisés pour transformer des bactéries *E.coli* DH5 α .

compétentes (ThermoFisher, Harz, Germany) par choc thermique afin d'amplifier les nouveaux plasmides (pHEN6-VLCL, pHEN6-VLIIaCL ou pHEN6-VL) générés. Les clones résistant à l'ampicilline ont été analysés par digestion avec les enzymes de restriction *HindIII* et *NotI* afin de vérifier la présence du gène encodant pour les chaînes légères. Les clones positifs à cette digestion ont été séquencés avant d'être utilisés pour l'expression recombinante des chaînes légères dans *E.coli*.

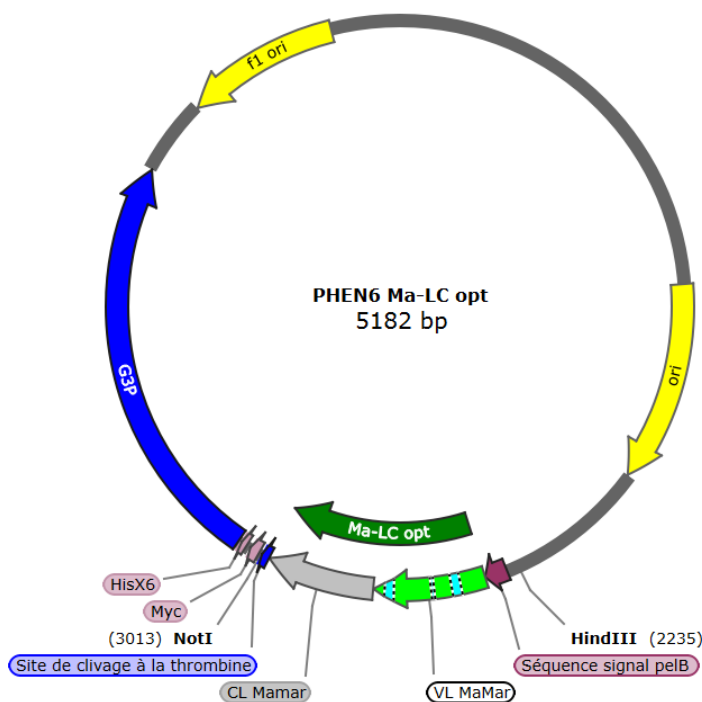


FIGURE 4 : CARTE DE LA CONSTRUCTION PHEN6 MA-LC

HINDIII ET NOTI SONT LES ENZYMES DE RESTRICTION PERMETTANT LE SOUS CLONAGE DANS LE PLASMIDE PHEN6. MYC ET 6XHis SONT LES TAGS ACCOLES A LA SEQUENCE.

3-c Sous-clonage des constructions génétiques des chaînes légères dans le vecteur pET22

Le clonage des chaînes légères dans le vecteur pET22 s'est fait après digestion des constructions pHEN6-VLCL et d'un vecteur pET22 vide avec les enzymes *XbaI* et *XhoI* (New England Biolabs). Comme décrit précédemment, après séparation sur gel d'agarose et purification des fragments d'ADN d'intérêts, le nouveau plasmide est assemblé avec la Quick ligase (New England Biolabs,) et amplifié avec les bactéries *E.coli* DH5 α (ThermoFisher,).

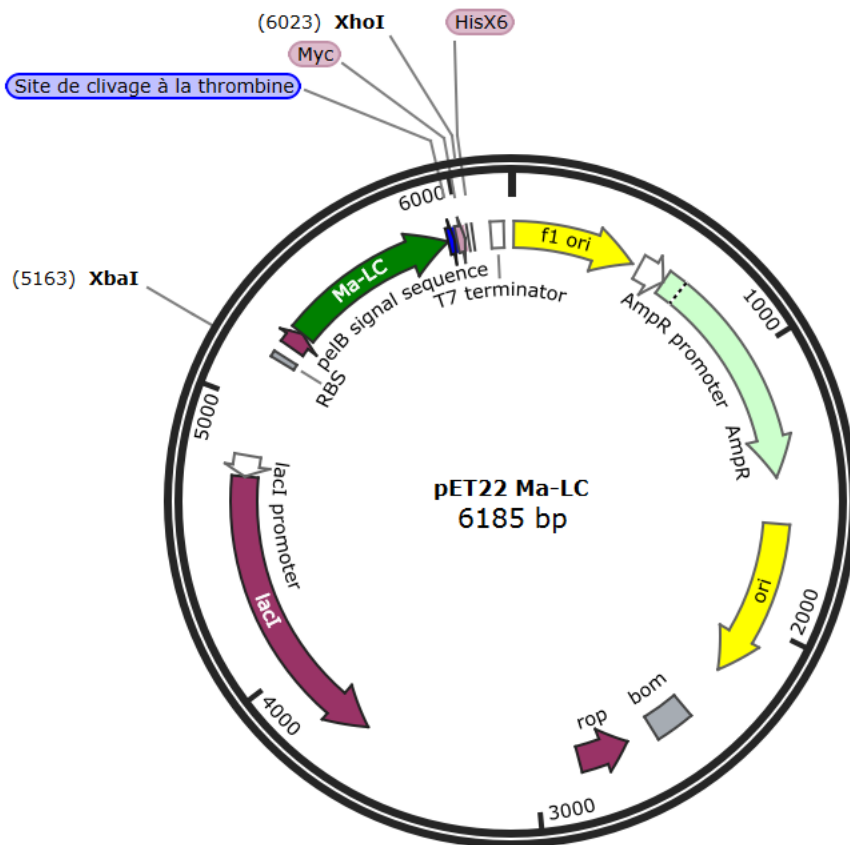


FIGURE 5 : CARTE DE LA CONSTRUCTION PET22 MA-LC

XbaI et *XhoI* sont les enzymes de restriction permettant le sous clonage dans le plasmide pET22. Myc et 6XHis sont les tags accolés à la séquence.

3-d. Sous-clonage des constructions génétiques VL dans le vecteur pET28

Les constructions pET28 ont été obtenus par un assemblage de fragments d'ADN produits par PCR comme décrit pour la génération des chimères en utilisant le NEBuilder HiFi assembly Master Mix. Les fragments assemblés ont été générés par PCR avec la polymérase Phusion (New England Biolabs) à partir des constructions pHEN6 VL pour générer les inserts d'intérêt (VL) et à partir d'une construction pET28 pour générer le vecteur pET28.

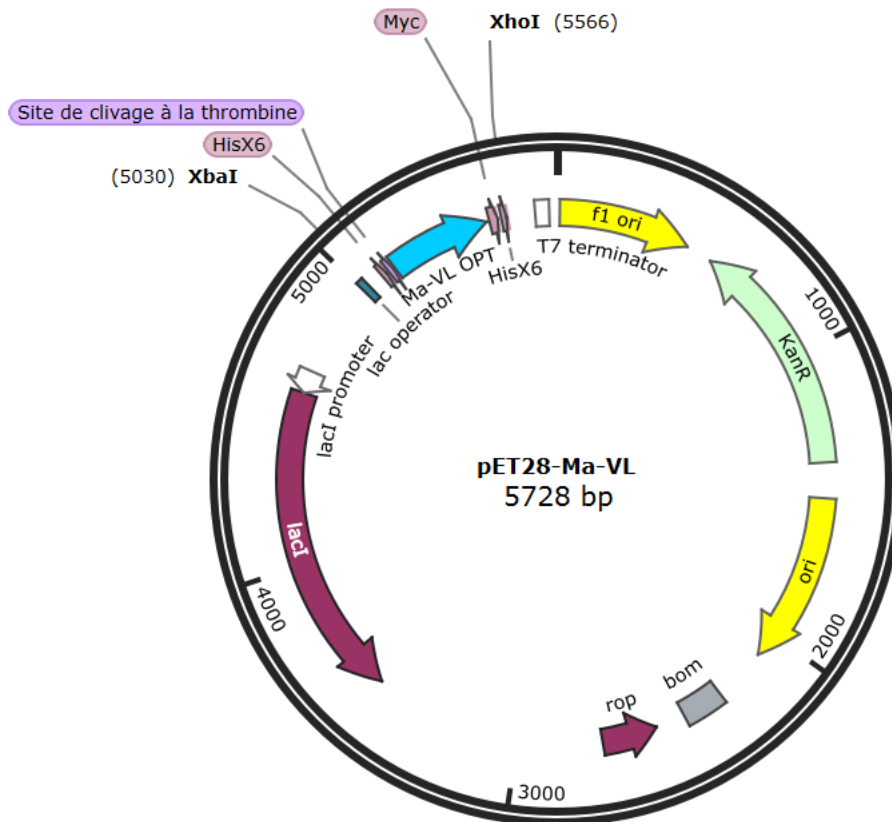


FIGURE 6 : CARTE DE LA CONSTRUCTION PET28 MA-VL

XbaI et *XhoI* sont les enzymes de restriction permettant le sous clonage dans le plasmide pET22. *Myc* et 6XHis sont les tags accolés à la séquence.

4. Production des chaînes légères recombinantes

Dans le cadre de la production et de la purification des différentes constructions de chaînes légères, nous avons bénéficié de l'expertise du laboratoire dans la production de nanobodies recombinants par des bactéries notamment en ce qui concerne les constructions clonées dans pHEN6 et dans pET28. Nous avons aussi utilisé le vecteur pET22 car de nombreuses publications s'intéressant aux relations structures-fonctions des chaînes légères dans l'amylose AL ont utilisé ce vecteur pour exprimer des chaînes légères recombinantes. Trois souches bactériennes ont été utilisées, WK6, SHuffle et BL21DE3 (New England Biolabs), une pour chacun des vecteurs d'expression. Les WK6 sont des bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) de la souche K12 avec un périplasme permettant la formation des ponts disulfures et un bon repliement des protéines produites. Elles sont adaptées pour la production des constructions

contenues dans des plasmides PHEN6. Les BL21DE3 sont des E. coli de souche B, disposant également de périplasme permettant le bon repliement des protéines recombinantes. Les bactéries de cette souche ont la particularité d'être dépourvues de certaines protéases qui, dans les souches K-12, servent à dégrader les protéines mal repliées et à empêcher l'accumulation de certaines protéines spécifiques du cycle cellulaire. Les bactéries SHuffle sont des bactéries au cytoplasme modifié pour permettre les modifications post traductionnelles et nécessitent pour ce faire des conditions de culture particulières.

Les constructions dans le plasmide PHEN6, les plasmide pET22, et les plasmide pET28 ont été utilisées pour transformer, respectivement, les bactéries WK6, BL21DE3, et SHuffle. Le tableau II récapitule les conditions de croissance et les milieux de culture pour chaque souche bactérienne transformée.

TABLEAU II : RECAPITULATIF DES CONDITIONS DE CULTURE DES ENSEMBLES VECTEURS/BACTERIES

Souche bactérienne / vecteur	T° de croissance	Agitation	Milieu de culture	Antibiotique
pET22 / BL21DE3	37 °C	170 à 180 RPM	TB	Ampicilline
PHEN6 / WK6	37 °C	170 à 180 RPM	TB	Ampicilline
pET28 / SHuffle	30 °C	120 RPM	LB	Kanamycine

TB: Terrific Broth; LB: Lysogeny Broth; RPM: Rotation par minute

Brièvement, les bactéries compétentes ont été transformées avec les plasmides, puis étalées sur une gélose contenant de l'antibiotique. Une seule colonie résistante par transformation est transférée dans le milieu de culture adéquat (Voir tableau 2). Elles ont ensuite été incubées à 30°C pour les SHuffle et 37°C pour les WK6 et les BL21DE3, sous agitation pour permettre une croissance exponentielle. La croissance des bactéries est suivie par mesure de la densité optique à 600 nm jusqu'à un niveau de croissance qui a été déterminé expérimentalement avant l'induction de la synthèse protéique par l'IPTG.

Ainsi, pour chaque chaîne légère de patient, les conditions de culture pour leur production ont été mises au point et optimisées. Les points d'optimisation ont été :

- Le niveau de croissance avant induction (OD 600 nm à 1 ; 0,6 ou 0,4)
- La concentration en IPTG (induction forte 1 mM, ou faible 0,5 mM/0,4 mM)
- la température de production après induction (4°C, 20°C et 30°C)
- Le temps de production après induction (4h, 16 h)

4. Extraction des chaînes légères des bactéries

4-a Extraction des chaînes légères produites avec adressage périplasmique

Après le temps de production défini, les milieux de culture bactériens ont été centrifugés à 4500 RPM pendant 15 min (rotor Sorvall SLA-1500). Les culots bactériens ont été remis en suspension dans du Tris 200 mM EDTA 0,5 mM et Saccharose 500 mM (TES) pH 8,4 additionné d'inhibiteurs de protéase pendant 1h en rotation pour déstabiliser la paroi bactérienne. Du TES dilué au ¼ a ensuite été ajouté pendant une heure supplémentaire. Le surnageant a été recueilli et filtré (0,22 µm) après centrifugation à 4500 RPM, 45min à 4°C (rotor Sorvall SLA-1500).

4-b. Extraction des chaînes légères produites dans le cytoplasme bactérien

Après le temps de production défini, les bactéries ont été culottées par centrifugation (15 min 4500 RPM ; Sorvall, SLA-1500 rotor) et le culot bactérien a été remis en suspension dans 10 ml de PBS + 0,3M NaCl + 10 µg/ml de lysozyme + cocktail d'inhibiteurs de protéase sans EDTA. (Invitrogen ; ThermoFischer Scientific, Harz, Germany) La suspension cellulaire a subi une sonication pendant 15 min (40% d'amplitude, 10 sec ON, 10 sec OFF à 4°C). La mesure de la densité optique à 600 nm a permis de suivre le pourcentage de lyse des bactéries. Les lysats ont été ensuite centrifugés pendant 30 min à 13.000 x g à 4°C (rotor SS34 Sorvall). Les surnageants ont été collectés et filtrés à 0,22µm.

5. Purification des chaînes légères par chromatographie d'affinité

Une fois que les extractions cytoplasmique et périplasmique des protéines ont été effectuées, deux systèmes de chromatographie d'affinité ont été utilisés pour purifier les constructions de chaînes légères produites.

5-a. Utilisation du Système Fabsselect

Les chaînes légères d'immunoglobulines ont été purifiées par chromatographie d'affinité en utilisant une résine Lambda FabSelect, paquée dans une colonne de 1 ml, commercialisée par Cytiva. Lambda FabSelect est une résine de chromatographie d'affinité pour la purification des fragments Fab Lambda. Ces résines permettent une capture efficace avec une pureté et un rendement élevé. En résumé, les extraits bactériens filtrés ont été chargés à 1 ml/min sur une colonne HiTrap Lambda Fabsselect préalablement équilibrée dans un tampon d'écoulement (25 mM HEPES, 125 mM NaCl, pH 7,4 ou HBS). La colonne a ensuite été lavée dans le tampon HBS avant le chargement de 15 nM de thrombine sur la résine afin de cliver le site LTPR-GVRL et ainsi libérer les chaînes légères de leurs tags. La thrombine a été incubée sur la colonne à 4°C pendant une nuit. La thrombine a été éliminée de la colonne, avec les tags, et son site actif bloqué en passant sur la colonne 10 ml de tampon HBS contenant 10 mM de benzamidine. La CL a été éluée avec de l'acide citrique à 0,1 M, pH de 2,5. Plusieurs fractions de 500 µl ont été recueillies dans des tubes « low binding protein » et directement neutralisées par 100 µl de Tris 1 M à un pH de 8,5. La teneur en protéines de chaque fraction a été déterminée par le test de Bradford et les fractions d'intérêt ont été regroupées et dialysées dans un tampon HBS puis stockées en aliquote à -20 °C. De plus, l'absence d'activité résiduelle a été évaluée par un test d'activité résiduelle de thrombine.

5-b. Utilisation du Système Cobalt/ HisX6

Les parties variables (VL) ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne Cobalt (HiTrap Talon Crude 1 ml, Cytiva, USA). Les colonnes sont équilibrées avec un tampon d'équilibration (sodium phosphate 50 mM, chlorure de sodium 500 mM, pH 7,4) à 1 ml/min avant le chargement de l'échantillon précédemment filtré. Les protéines se lient au cobalt de la résine par l'intermédiaire des Tags histidine (HisX6). La colonne est ensuite lavée avec le tampon d'équilibration supplémenté de 5 mM d'imidazole pour décrocher les protéines liées

de façon non spécifique avant l'éluion des VL par un tampon d'éluion (sodium phosphate 50 mM, chlorure de sodium 500 mM, Imidazole 150 mM pH 7,4). Les protéines éluées sont dialysées contre un tampon HBS puis stockées à +4 °C.

5-c. Caractérisation biochimique des chaînes légères purifiées

- SDS-PAGE

La pureté des chaînes légères purifiées présentes dans les dialysats a été évaluée par électrophorèse sur gel SDS-PAGE. Les échantillons de protéines ont été préparés par chauffage à 95 °C pendant 10 min dans un tampon d'échantillons Laemmli SDS, 4X (ThermoFischer Scientific) contenant du DTT à 100 mM. Ils ont ensuite été séparés sur un gel pré coulé de polyacrylamide 12 % Bis-Tris SDS-PAGE (NuPAGE ; Invitrogen ; ThermoFischer). La migration se fait en fonction du poids des protéines à 200 V pendant 35min. Le gel est ensuite coloré au bleu instantané de Coomassie (InstantBlue, Abcam, Paris, France) pour détecter les protéines. L'échelle de poids moléculaire Spectra™ Multicolor Broad Range de ThermoFischer Scientific a été utilisée pour permettre l'estimation de la taille des protéines purifiées.

- Western blot

Nous avons également réalisé des Western Blot de manière à vérifier la présence de nos chaînes légères dans les fractions de protéines purifiées par chromatographie d'affinité. Après séparation sur SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane nitrocellulose. Les sites non spécifiques sont d'abord bloqués dans un tampon de blocage (HEPES 25 mM ; NaCl 125 mM ; pH 7,4 ; lait à 5%) à température ambiante pendant 30min. Après lavage dans un tampon de lavage (HEPES 25 mM ; NaCl 125 mM ; Tween 20), les protéines sont détectées par un anticorps anti chaîne légère (lambda/kappa) couplé à une peroxydase (respectivement 2070-05 / 2060-05 Southern biotech, USA) dilué au 1/4000^e dans un tampon (HEPES 25 mM ; NaCl 125 mM ; pH 7,4 ; BSA 1 %). Les bandes correspondantes aux chaînes légères sont révélées par chimiluminescence après application d'un substrat sur la membrane (SuperSignal West Pico Plus, ThermoFischer Scientific, Harz, Germany) et les résultats visualisés grâce au système d'imagerie G :Box (Syngene, USA).

- Spectrophotométrie

Les concentrations des chaînes légères purifiées ont été quantifiées par l'utilisation d'un spectrophotomètre UV-visible (NanoDrop ND-1000, ThermoFischer Scientific, USA). La valeur de la concentration est obtenue grâce au logiciel installé sur le système du spectrophotomètre après mesure de l'absorption à 280 nm d'un échantillon de protéine purifiée et grâce aux caractéristiques spécifiques de chaque chaîne légère que sont le poids moléculaire et le coefficient d'extinction molaire. Ces paramètres sont déterminés à partir de la séquence des chaînes légères et l'utilisation des portails de ressources bioinformatique Expasy et EMBOSS Pepstat.

6. Tests de la liaison

La capacité des chaînes légères à lier le FX a été évaluée par trois techniques, une technique d'adsorption et détection immunoenzymatique, une technique de résonance plasmonique de surface (SPR) et par co-immunoprécipitation.

6-a. Test de liaison par ELISA

Nous avons opté pour un schéma d'expérimentation où le FX a été immobilisé sur une plaque de microtitration demi-puits (Greiner x96, Dutscher, France) toute la nuit à 4°C dans un tampon Na₂CO₃ 50 mM pH 9,6. Les sites résiduels ont été bloqués pendant 1 h à température ambiante avec le tampon de travail HEPES (HEPES 25mM, NaCl 125mM, 0,1% Tween 20 à pH 7,4) contenant 3 % d'albumine sérique bovine (BSA). Les chaînes légères diluées dans un tampon HEPES 25mM, NaCl 125mM, 0,1% Tween 20 à pH 7,4 contenant 0,1 % de BSA. Les chaînes légères sont testées 1h à 37 °C dans une gamme de dilutions successives au 1/2 de d:1/1 à d:1/1024 soit 11 dilutions au total en partant de 100 µg/ml. Chaque dilution est testée en duplicate au moins 3 fois. Les protéines non liées sont éliminées par 3 lavages successifs en tampon de travail. La détection des chaînes légères liées se fait grâce à l'incubation 1h à 37 °C d'un anticorps anti-chaîne légère Lambda ou Kappa, couplé à une peroxydase (respectivement 2070-05 / 2060-05 Southern biotech, USA) dilué au 1/4000 dans le tampon de travail contenant 1% de BSA. Le clivage d'un substrat, la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB, Thermo Fischer Scientific, Harz, Germany) par la peroxydase permet une conversion

chromogénique dont la densité optique mesurée à 450 nm sera proportionnelle à la quantité de chaînes légères liées au FX immobilisé. La liaison semi-maximale a été calculée à l'aide d'un modèle de régression non linéaire et du logiciel GraphPadPrism.

6-b. Test de liaison par résonance plasmonique de surface (SPR)

La cinétique des interactions protéiques a été déterminée par analyse SPR avec un système de biocapteur BIAcore™ 3000 (BIAcore AB, Breda, Pays-Bas) à 25 °C. L'instrument est équipé de 4 canaux d'écoulement qui peuvent être utilisées en série. Le FX, la chaîne légère ont été liés de manière covalente à la surface de puces de détection (sensorchip) C1 de 04 canaux, (Cytiva, USA) à une concentration de 10 µg/ml dans un tampon de sodium acétate à pH 5. La puce C1 est carboxyméthylée et a une faible capacité de liaison. Un canal est resté libre comme contrôle négatif. Les adsorptions qui y ont été mesurées ont été systématiquement soustraites des adsorptions dans les autres canaux. L'association d'un analyte à la protéine immobilisée a été évaluée dans un tampon HEPES (HEPES 25 mM, NaCl 125 mM, pH 7,4 contenant 0,005 % de Tween 20). Diverses concentrations de chaîne légère ou de FX (analyte) a ensuite été passé dans les canaux à un débit de 5, 10 ou 40 µL/min pendant 4 minutes, et la masse surfacique de ligand adsorbée sur la puce a été mesurée en temps réel et exprimée en unités de résonance (RU). La dissociation a été autorisée pendant 5 min dans le même flux de tampon HEPES. Après chaque passage, les puces de détection ont été régénérées en injectant 5 µL de thyocyanate de sodium 3M à 10 µL/min et les 04 canaux ont ensuite été rééquilibrés avec 20 µL de tampon HEPES à 10 µL/min. Les expériences ont été réalisées pour 10 concentrations différentes de ligand. Les constantes de vitesse d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) ont été déterminées à l'aide du logiciel BIAevaluation Version 3.1 (BIAcore AB). Les données ont été corrigées pour tenir compte des variations de l'indice de réfraction global et ajustées par analyse de régression non linéaire selon un modèle de liaison à un site. Les constantes de dissociation à l'équilibre (K_d) ont été calculées à partir du rapport k_{off}/k_{on} . La valeur de K_d pour les interactions de faible affinité a été estimée par l'analyse de l'affinité à l'état d'équilibre à l'aide du logiciel BIAevaluation.

6-c. Co-immunoprécipitation

Les interactions entre le FX et les chaînes légères ont également été étudiées par co-immunoprécipitation. Brièvement, l'anticorps monoclonal anti FX (KB008, conçu et élaboré par notre laboratoire) a été couplé à des billes magnétiques NHS activées (88826, Pierce, ThermoScientific, Harz, Germany). Parallèlement, différents complexes ont été préformés entre le FX (80 nM, concentration finale) et différentes chaînes légères (2 μ M, concentration finale) pendant 1h à 37°C dans un tampon HEPES 25 mM, NaCl 125 mM, Calcium 2,5 mM). Les billes couplées à l'anticorps de capture ont ensuite été incubées avec le milieu réactionnel préparé en parallèle sous légère agitation par rotation à température ambiante pendant 1h. Les billes ont été ensuite lavées dans un tampon HEPES contenant 0,1% de tween 20 puis remises en suspension dans un tampon Laemmli 4X. Les protéines ont ensuite été séparées sur un gel de polyacrylamide 4-12% précoulé SDS-PAGE (Invitrogen, ThermoFischer Scientific, Harz, Germany) puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le complexe est mis en évidence par la révélation de la chaîne légère par un anticorps anti chaîne légère (lambda/kappa) couplé à une peroxydase (respectivement 2070-05 / 2060-05 Southern biotech, USA).

7. Préparation de FX N-deglycosylé

Des expériences de digestion par glycosidase dans des conditions douces sur les glycanes N- liés au FX purifié de plasma (Cryopep) ont été réalisées en utilisant la PNGase F (N-Glycosidase F de New England Biolabs Inc, Essex Junction, MA, USA) de *Chryseobacterium*, comme décrit précédemment.²⁸⁸ La pureté des protéines (>95%) et l'élimination complète des N-glycanes ont été évaluées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS à 15% (gel NuPAGE Bis-Tris d'Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) dans des conditions non réductrices, suivie d'une coloration au bleu brillant de Coomassie R-250.

8. Dosages du FX

8-a. Activité chronométrique du FX

La technique chronométrique de dosage du FX est réalisée sur l'automate STA R (Stago, Asnières-sur-Seine, France) avec le réactif STA - PTT (Stago). Elle consiste à mesurer le temps de coagulation d'un plasma pauvre en plaquettes (PPP) après activation des facteurs de la phase contact par du kaolin en présence de la céphaline (phospholipide provenant du cerveau du lapin) et du calcium, dans un système où tous les facteurs de la coagulation sont présents en excès, apportés par le mélange (v/v 1/1) du PPP à analyser avec un plasma déficient en FX par immunoabsorption (Stago, Asnières-sur-Seine, France). Le temps mesuré est converti en taux de FX grâce à une courbe de calibration.

8-b. Dosage antigénique du FX par ELISA

Nous avons développé au sein de notre unité un dosage antigénique du FX. Il consiste en un ELISA sandwich avec des anticorps spécifique du FX. L'anticorps polyclonal de chèvre anti-FX humain purifié par affinité CL20245K-C (Cedarlane, Burlington, USA) est immobilisé sur une plaque de microtitration demi-puits (Greiner x96, Dutscher, France) toute la nuit à 4°C dans un tampon Na₂CO₃ 50 mM pH 9,6. Les sites résiduels non spécifiques sont ensuite bloqués pendant 1 h à température ambiante avec le tampon de travail (HEPES 25mM, NaCl 125mM, 0,1% Tween à pH 7,4) contenant 3 % de BSA. Puis le plasma à doser est distribué dans les puits suivant une gamme de dilution. Les protéines non liées sont éliminées par 3 lavages successifs et le FX est détecté par l'anticorps polyclonal de chèvre anti-FX humain CL20245K-D conjugué à la peroxydase (Cedarlane) suivi d'une conversion chromogénique du tétraméthylbenzidine et d'une lecture à 450nm. La densité optique (DO) est proportionnelle à la quantité de FX capturé. Elle DO mesurée est convertie en taux de FX grâce à une courbe de calibration établie sur la même plaque avec un plasma normal. Les puits ont été lavés trois fois avec le tampon de travail (HEPES 25mM, NaCl 125mM, 0,1% Tween à pH 7,4) entre chaque étape.

8-c. Dosage de l'activation du FX par le complexe tenase FIXa/FVIIIa/PL

La formation de FXa a été déterminée comme décrit précédemment²⁸⁹ avec de légères modifications. En bref, les vésicules phospholipidiques (20:20:60 mol% ; 50 µM concentration finale), le FIXa (9 nM final) et les ions calcium ont été pré-incubés pendant 10 minutes à 37 °C dans des tubes « low binding » dans 60% du volume final avant l'ajout séquentiel (avec des intervalles de 60 secondes) du FVIII (0.25U/mL final), puis de la thrombine et du FX avec un peu d'hirudine. Le FX (120 nM concentration finale) d'origine plasmatique (Cryoep) a été au préalable incubé 30 min à température ambiante avec les chaînes légères Ma-LC, Sa-LC (8 µM final) ou seul. Les vésicules phospholipidiques ont été préparés à partir de Phosphatidylcholine (PC), de PhosphatidylSerine (PS) et de Phosphatidylethanolamine (PE) de Avanti Polar Lipids (Albaster, AL, Etats-Unis). D'un diamètre nominal de 100 nm, elles ont été synthétisées par la méthode d'extrusion membranaire.²⁹⁰ Le tampon de cinétique utilisé est un tampon HEPES (HEPES 25 mM (pH 7,4)/NaCl 125 mM/CaCl₂ 2,5 mM/PEG 8000 0,1%/BSA 0,1%). La progression de la formation de FXa a été suivie pendant 15 minutes. Des aliquotes du mélange réactionnel ont été prélevées à des moments précis et la réaction a été arrêtée dans de l'EDTA (10 mM final). La formation de FXa dans chaque aliquote a été déterminée en mesurant l'activité amidolytique du FXa. Moins de 5 % FX ont été convertis en FXa, et la formation de FXa a été linéaire. Les concentrations de FXa générées dans les réactions d'activation ont été déterminées à partir d'une courbe standard préparée à partir du taux de clivage du substrat chromogène pNAPEP-1065 (Cryoep) par des concentrations connues de FXa humain (Cryoep) dans les mêmes conditions.

8-d. Dosage de l'activation du FX par le complexe tenase FVIIa/FT/PL

La comparaison des taux initiaux d'activation du FX seul ou en présence de Ma-LC et de Sa-LC par le complexe FVIIa/FT a été réalisée comme suit. Brièvement, 8 nM de FVIIa ont été ajoutés à 500 pM de FT relipidé en présence de 30 µm de vésicules de phospholipides (PS/PE/PC, 20:20:60 mol%). Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 20 minutes dans le tampon de cinétique HEPES (HEPES 25 mM (pH 7,4)/NaCl 125 mM/CaCl₂ 2,5 mM/PEG 8000 0,1%/BSA 0,1%) afin d'établir un complexe FVIIa-TF. Parallèlement le FX (120 nM) a été pré-

incubé seul, en présence de chaîne légère (5 μ M) Ma-LC, ou Sa-LC. La réaction a été déclenchée par l'ajout du FX (120 nM) seul ou en présence de LC (4 μ M) au complexe FVIIa/FT/PL. Comme décrit précédemment pour l'activation du FX par le complexe FIXa/FVIIIa/PL, après divers temps d'incubation, des aliquotes ont été prélevées, diluées dans une solution d'arrêt contenant de l'EDTA (10 mM final) et testées pour la formation de FXa en utilisant le substrat synthétique pNAPEP-1065, 500 μ M (Cryo pep). La conversion du substrat a été contrôlée à 405 nm. La concentration de FXa générée dans la réaction d'activation a été déterminée à partir d'une courbe standard préparée à partir du taux de clivage du pNAPEP-1065 par des concentrations connues de FXa titré dans les mêmes conditions.

8-e. Dosage de l'activité du FXa au sein du complexe prothrombinase

Du FXa (20 pM) humain (Cryo pep) a été au préalable incubé 30 min à température ambiante avec les chaînes légères Ma-LC, Sa-LC (4 μ M final). Ensuite, des vésicules phospholipidiques (20:20:60 mol%) et du FXa (20 pM) ont été incubés à 37 °C pendant 5 min avec 25 nM de FVa humain (Cryo pep). La réaction a été déclenchée par l'ajout de 1,5 μ M de prothrombine, et le dosage a été effectué à 37 °C dans un tampon de cinétique HEPES (HEPES 25 mM (pH 7,4)/NaCl 125 mM/CaCl₂ 2,5 mM/PEG 8000 0,1%/BSA 0,1%). Des aliquotes du mélange réactionnel ont été prélevées et arrêtées dans de l'EDTA (concentration finale de 10 mM) aux temps spécifiés. Au cours de tous les essais, on s'est assuré que moins de 10 % de la prothrombine était convertie en thrombine et que la formation de thrombine était linéaire. Les concentrations de thrombine générées dans les réactions d'activation ont été déterminées à partir d'une courbe standard préparée à partir du taux de clivage du substrat chromogène pNAPEP-0238 (Cryo pep) par des concentrations connues de thrombine dans les mêmes conditions.

9. Clairance du FX dans un modèle murin de déficit sévère en FX

9-a. Déclaration d'éthique

L'hébergement des animaux et les expériences ont été réalisés conformément à la réglementation française (décret #2013-118 ; <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000027037840>) et aux directives expérimentales de la Communauté européenne (directive 2010/63/EU ; <https://faolex.fao.org/docs/pdf/eur98296.pdf>). Les souris sont maintenues dans des cages ventilées individuellement (3-4 souris/cage), avec un enrichissement fourni par de la litière, du matériel de nidification et des briques de tremble. Ce projet a été approuvé par le comité d'éthique local de l'Université Paris-Saclay (Comité d'Éthique en Expérimentation Animale n°26, protocole APAFIS#40259-2022-123015559850 v4).

9-b. Description du modèle murin

La génération de souris avec un déficit inductible sévère en FX ou souris MX1Cre+f10flox/flox a été confiée à Genoway (Lyon, France). Des souris exprimant un gène f10 « floxé » (F10tm1a(EUCOMM)Hmgu) ont été obtenues à partir des Archives européennes des mutants de souris (06365 ; HEPD0602_2_G07)¹⁴ et croisées avec des souris C57Bl/6 exprimant la flippase pour générer un allèle f10 conditionnel (f10flox/flox). Ensuite, ces souris ont été croisées avec la lignée transgénique MX1-Cre (B6.Cg-Tg(Mx1-Cre)1CgnJ ; Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA). Ces dernières expriment la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur MX1 inductible par l'interféron. La déficience en FX a été induite par trois injections intrapéritonéales subséquentes d'acide polyinosinique:polycytidylique (pl:pC 10 mg/kg ; Invivogen, San Diego, CA, USA) à 48 heures d'intervalle. Les souris étaient âgées de 6 à 8 semaines au moment du traitement au pl:pC, et des souris mâles et femelles ont été utilisées dans cette étude. Les niveaux de FX ont été mesurés 3 semaines après la dernière injection chez toutes les souris utilisées dans l'étude. Les souris MX1Cre+f10flox/flox traitées par pl:pC ont montré une activité coagulante FX pratiquement indétectable (FX <1%). En outre, aucun antigène FX n'a pu être détecté dans le plasma de ces souris. Il est important de noter qu'en plus d'une activité FX fortement réduite, aucune réduction du nombre de

globules rouges, de globules blancs ou de plaquettes n'a été détectée, et que les niveaux de FVII, FVIII ou FIX n'ont pas été affectés.

9-c. Prélèvements de sang

Des échantillons de sang ont été prélevés par ponction rétro-orbitaire sur des souris anesthésiées à l'isoflurane. Le sang a été prélevé dans de l'EDTA (1 vol EDTA 0,5 M + 9 vol de sang) pour la numération sanguine ou dans du citrate (1 vol citrate 0,138 M + 9 vol de sang) pour les tests d'activité et d'antigène.

9-d. Cinétique de clairance du FX en présence de chaînes légères

Nous avons évalué la cinétique de clairance du FX dans le modèle souris MX1Cre+f10flox/flox induit. Les souris ont été séparées en 4 groupes identiques en ce qui concerne l'âge (10 à 14 semaines) et le sexe (3 femelles pour 1 mâle). Elles ont ensuite reçu par injection intraveineuse une dose équivalente de FX humain (10 µg), préalablement pré-incubé avec des 250 µg de chacune des différentes chaînes légères, Ma-LC et Sa-LC. Pour rappel, Ma-LC et Sa-LC sont des chaînes légères recombinantes libres respectivement des patients Ma et Sa (Tableau 1). Ces doses permettent de retrouver des concentrations de chaînes légères libres dans le plasma des souris équivalentes à celles dosées en moyenne chez les patients Ma et Sa avant leurs traitements. Les plasmas ont été prélevés 3 minutes, 1h puis 4h après l'injection. L'évolution du taux de FX humain dans la circulation murine a été suivie par dosage antigénique et activité coagulante du FX dans les plasmas collectés.

10. Culture cellulaire et expériences d'endocytose du FX en présence de chaînes légères

Des macrophages humains ont été différenciés à partir de la lignée cellulaire de leucémie monocyttaire aiguë THP1 comme décrit précédemment (Muczynski et al, Blood 2016) avec quelques modifications. Brièvement, les cellules THP1 ont été induites avec 100 nM de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA ; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri) pendant 2 jours et différenciées pendant 5 jours avec 10 ng/mL de facteur de stimulation des colonies de macrophages humains (hM-CSF) et 1 ng/mL de facteur de stimulation des colonies de granulocytes humains (hGM-CSF) (R&D System, Minneapolis, Minnesota). Les macrophages

dérivés de THP1 ont été incubés pendant 2 jours supplémentaires avec un milieu sans cytokine pour produire principalement des macrophages M0 au repos. Pour les expériences d'endocytose du FX, les cellules ont étéensemencées sur des lamelles de verre dans une plaque de 24 puits. Les lamelles ont été pré-incubées dans du DMEM:F12 additionné de 0,5% d'Albumax II (Life Technologies, ThermoFischer Scientific Harz, Germany) pendant 1 heure à 37°C. Les cellules ont ensuite été incubées avec 10 µg/ml de facteur X humain dérivé du plasma (FX, Cryopep, Montpellier, France), 300 µg/ml de chaîne légère recombinante, ou un complexe préformé des deux (30 min à température ambiante) pendant 1h à 4°C puis 1h à 37°C dans le milieu DMEM:F12/Albumax. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois dans le milieu et fixées pendant 15min avec du paraformaldéhyde 4%.

11. Analyses microscopiques et quantification par immunofluorescence

Les lamelles de verres ont été incubées dans un tampon Phosphate contenant 5% de BSA (PBS/BSA 5%) 30 min à température ambiante pour saturer les sites résiduels non spécifiques. Il a ensuite été réalisé des expériences de dosage de proximité du FX avec l'antigène 1 de l'endosome précoce (EEA-1) en utilisant les réactifs et le protocole du système de ligature de proximité (PLA) Duolink® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) qui permet d'étudier les interactions protéine-protéine. Pour cela, les anticorps primaires, l'anticorps polyclonal de lapin anti-FX humain (PA5-22059 ; Invitrogen, ThermoFischer Scientific) et l'anticorps polyclonal de chèvre anti-EEA-1 (Ab206860, Abcam, Cambridge, United-Kingdom) ont été ajoutés 2 heures à température ambiante. Il a ensuite été ajouté les sondes PLA du kit spécifiques des anticorps primaires. L'hybridation entre les deux sondes PLA conduisant à un signal fluorescent ne se produit que lorsque la distance entre les deux sondes détectées est inférieure à 40nm. Le kit de détection de la longueur d'onde de 550 nm a été utilisé. Les contrôles, sans anticorps primaire ou avec un seul anticorps primaire ont été réalisés conformément aux recommandations du fabricant. Tous les marquages ont été réalisés en même temps. Les images de microscopie à grand champ ont été acquises sur un microscope MICA Microhub (Leica, Wetzlar, Allemagne) et le logiciel LAS-X V2021, 2.0. Les acquisitions des images ont été faites en utilisant les mêmes paramètres d'acquisition (temps d'exposition,

intensité des longueurs d'onde). Les images ont été analysées par ImageJ. Le contour de cellules bien isolées a été effectué sur une image merge (superposition d'image du noyau et du signal rouge). Définition d'un seuil sur l'image du signal rouge (seuil identique pour toutes les conditions). Le procédé « analyse particule » d'Image J a été appliqué : il décompte tous les points au-dessus de 5 μm^2 de surface.

12. Analyses statistiques

Dans toutes les figures, les données sont exprimées en moyennes \pm SD. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de tests t non apparié non paramétrique avec le logiciel GraphPad Prism (San Diego, CA, USA). Le nombre d'expériences réalisées ainsi que la signification statistique sont indiqués dans le texte et/ou les légendes des figures.

Résultats

1. Production et purification des chaînes légères complètes (VLCL)

Différents systèmes ont été testés pour optimiser la production et la purification des chaînes légères recombinantes.

1-a. Système WK6 / PHEN6VLCLIIa₍₁₎-Tag/purification par chromatographie d'affinité His-6/Cobalt

Dans un premier temps, nous avons testé la production des constructions VLCL clonées dans un vecteur PHEN6. Ce vecteur permet l'insertion en C-terminal de la protéine d'intérêt d'un tag cMyc-His6 avec une production dans le périplasme des bactéries WK6. Après avoir exploré divers paramètres de production, notamment : i) la concentration des bactéries au moment de l'induction, ii) la concentration d'IPTG, iii) la température de production, et iv) la durée de production, nous avons identifié les conditions optimales pour la production des chaînes légères (LC) des patients Ma et Sa (Tableau III). On a observé que ces conditions sont différentes d'une chaîne légère à l'autre alors que ces deux chaînes sont du même isotype lambda.

TABLEAU III : CONDITIONS MISES AU POINT DE PRODUCTION OPTIMALE DE MA-LC ET SA-LC.

Paramètres de production	Ma-LC	Sa-LC
Croissance avant induction (OD 600 nm)	0,6	1
Concentration d'IPTG	1 mM	1 mM
Température de production après induction	30 °C	20 °C
Temps de production après induction	4 h	16 h

Cependant, malgré un rendement acceptable de production déterminé après purification (environ 3,2 mg de protéine/L de milieu de culture), la caractérisation par gel SDS-PAGE en milieu réducteur et coloration au bleu de Coomassie des chaînes légères purifiées a révélé

deux bandes de protéines proches présentant une légère différence de poids moléculaire (bande 1 : 28 kDa et bande 2 : 27 kDa ; Figure 7A), quel que soit la chaîne légère produite, suggérant une protéine partiellement dégradée. La caractérisation des protéines purifiées par Western blot a montré qu'en utilisant l'anticorps anti-cMyc, seule la bande protéique supérieure est détectée (bande 1 : 28 kDa; Figure 7B). Au contraire, l'anticorps anti-chaîne légère lambda a révélé les deux bandes protéiques (Figure 7C). En condition de SDS-PAGE non réductrice, nous avons observé en bleu de Coomassie 2 bandes aux alentours de 55 kDa.

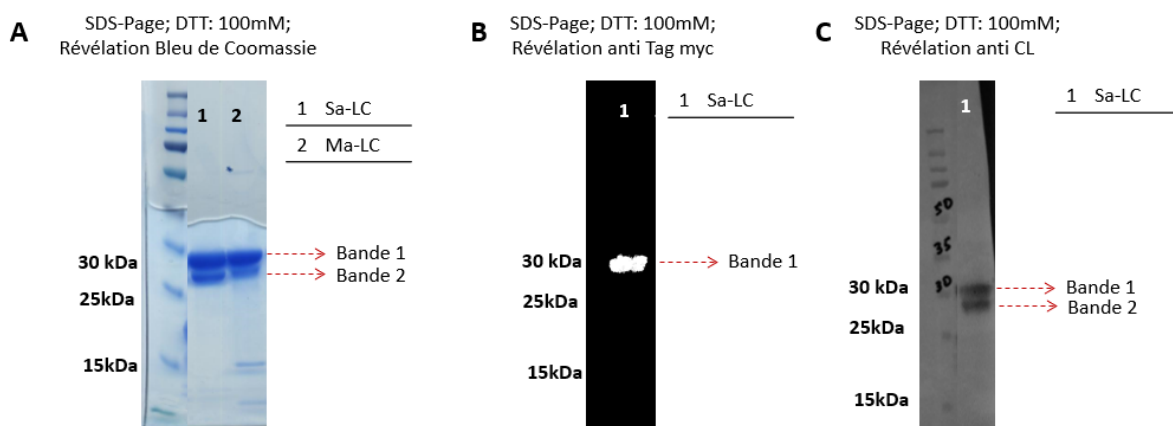


FIGURE 7 : MISE EN EVIDENCE DU CLIVAGE DES CONSTRUCTIONS VLCL-IIA-TAG PRODUITES PAR LES BACTERIES WK6

Les figures montrent les caractéristiques des chaînes légères PHEN6-VLCL-IIa-Tag purifiés sur colonne cobalt dans des conditions réductrices. **A** : image du gel SDS-PAGE en condition réductrice, révélation par Bleu de Coomassie montrant les deux bandes de VLCL. **B** : représente le résultat du western blot révélé par l'anticorps anti-cMyc montrant uniquement la bande non clivée. **C** : représente le résultat du western blot révélé par l'anticorps anti-chaîne légère montrant la chaîne légère clivée et non clivée. DTT : dithiothreitol. CL : chaîne légère.

L'ensemble de ces observations nous ont permis de conclure que les deux bandes observées sur SDS-PAGE dans les Figures 7A et 7C correspondent à un monomère de chaîne légère lambda, la bande inférieure étant dépourvue du tag cMyc-His6. Ce monomère de chaîne légère a été séparé de son tag au cours du processus de production très probablement par une activité « thrombine-like » dans les bactéries WK6 utilisées. Le processus de purification, facilité par le tag-HisX6, ainsi que la propension des chaînes légères à se former

majoritairement sous forme de dimères, grâce à la présence d'une cystéine libre dans la région constante des chaînes légères lambda favorisant cette association dans le périplasma bactérien, expliquent la présence de cette chaîne hétérogène et partiellement clivée dans le produit final purifié (Figure 8). Le clivage et le processus de purification ont probablement entraîné la perte d'une partie de la production qui ne peut pas être purifiée faute de présence de tag.

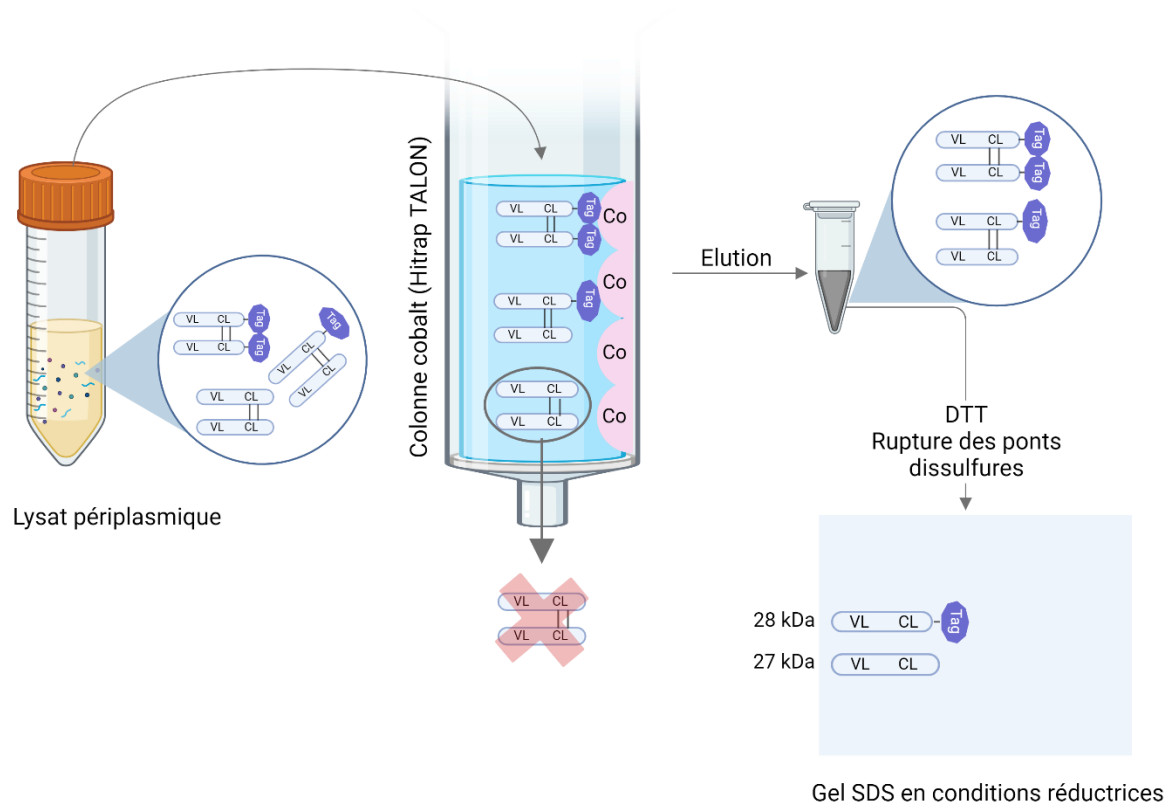


FIGURE 8 : SCHEMA EXPLICATIF DE LA PURIFICATION DES CHAINES LEGERES PAR CHROMATOGRAPHIE D’AFFINITE HIS-6X/COBALT

La figure montre le processus de purification des chaînes légères dimérisées par chromatographie d’affinité avec une résine cobalt. Les dimères comportant au moins un Tag sont retenus par la résine tandis que l’homodimère dépourvu de ses deux tags est perdu dans le processus de purification. VLCL : chaîne légère ; Co : Cobalt ; DTT : dithiothréitol (agent réducteur)

1-b Système WK6/PHEN6 VLCLIIa₂-Tag/purification par chromatographie d’affinité His-6/Cobalt

Afin de contourner ce problème de clivage, nous avons conçu et produit de nouvelles constructions incorporant un site de clivage à la thrombine différent de celui utilisé (IIa₂),

LVPR-GS versus LVPR-GVRL. Cependant, les protéines issues de ces constructions ont également été soumises au clivage « thrombin-like ». Nous avons aussi exploré l'utilisation d'un site de clivage par l'enzyme dégradant l'immunoglobuline extraite du streptocoque pyogène (Ides) en remplaçant par mutagenèse le site de la thrombine sur nos constructions par le site reconnu par Ides. On a alors également observé, une dégradation partielle des chaînes légères modifiées produites et purifiées.

1-c. Système BL21DE3/pET22 VLCLIIa1-Tag/purification par chromatographie d'affinité His-6/Cobalt

Pour éviter la potentielle action de ces deux enzymes sur les chaînes légères, nous avons choisi de produire nos constructions dans des bactéries de souche BL21DE3 en les clonant dans le plasmide pET22. En effet, les bactéries de souche WK6 produisent deux enzymes, Lon et OmpT qui sont susceptibles de dégrader les protéines produites. Lon est une protéase ATP-dépendante et OmpT est une enzyme de type sérine protéase.²⁹¹ Cependant, la caractérisation de notre production dans les BL21D3 a révélé un clivage toujours présent au même site que celui observé avec les WK6 ainsi qu'un rendement plus faible de chaînes légères purifiées par rapport à la production obtenue avec PHEN6/WK6. Nous avons obtenu seulement 0,8 mg / L contre 3,2 mg / L précédemment.

1-d. Système WK6/PHEN6 VLCLIIa1-Tag/purification par chromatographie d'affinité FabSelect

Sur la base des résultats précédents, et dans le but d'obtenir des chaînes légères homogènes pour les étapes ultérieures de caractérisation de leurs propriétés fonctionnelles, le système de production des différentes constructions dans le plasmide pHEN6 par les bactéries WK6 a été gardé mais le processus de purification a été modifié. Les chaînes légères produites ont été purifiées par chromatographie d'affinité sur une résine « Fabselect » et une étape de protéolyse à la thrombine a été ajoutée. Cette étape supplémentaire permet de libérer les chaînes légères de leur tag en C-terminal (voir méthodes). Grâce à cette approche on a obtenu des chaînes légères homo-dimériques et purifiées, sans impuretés notables comme cela a été observé après analyse de 5 µg de protéine purifiée par SDS-PAGE et coloration au

bleu de Coomassie (Figure 9). Un bon rendement a été observé quel que soit la chaîne légère produite. Ainsi, un rendement d'environ 3,4 mg et 2,5 mg de protéines pour 1 L de production a été obtenu pour respectivement la chaîne légère Ma-LC et la chaîne légère Sa-LC. Par ailleurs, une fois les chaînes légères purifiées, nous avons vérifié l'absence d'activité résiduelle de thrombine dans les fractions éluées par un test chromogénique spécifique.

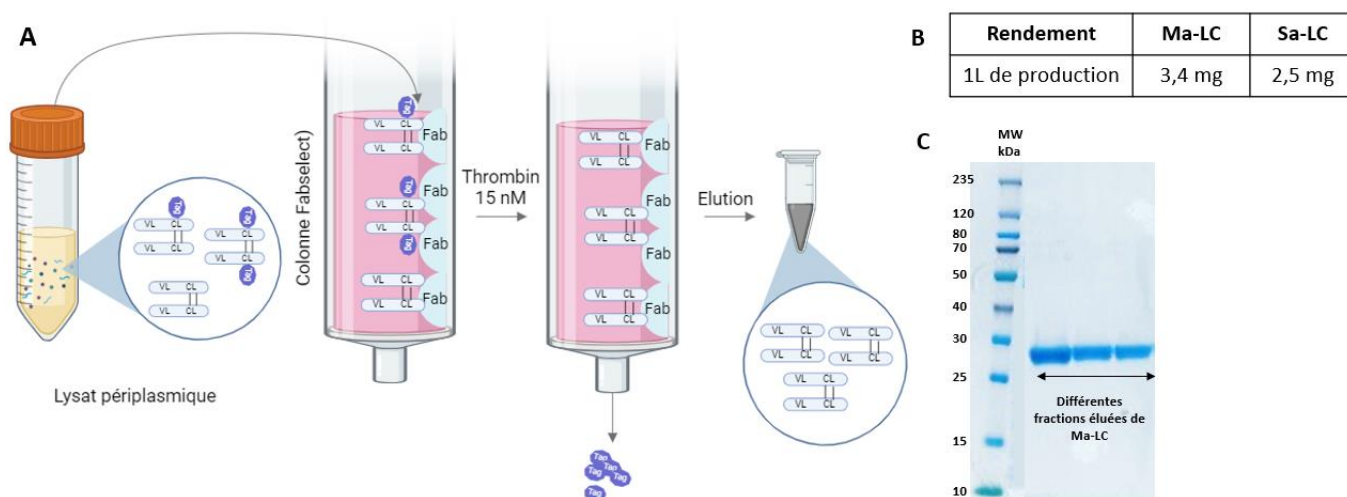


FIGURE 9 : SCHEMA EXPLICATIF DU PROTOCOLE DE PURIFICATION ET CARACTERISATIONS DES PRODUCTIONS DE CHAÎNE LEGERE

A : processus de purification des dimères de chaînes légères par chromatographie d'affinité avec une résine Lambda Fabselct ; **B** : Tableau représentatif des rendements de production des deux chaînes légères ; **C** : Gel SDS-PAGE en conditions réductrices, coloré au bleu de Coomassie caractérisant l'homogénéité de la production de Ma-LC. 5, 2,5 et 2,5 μ g de protéines ont été déposées sur respectivement les fractions a, b et c.

2. Production et purification des parties variables des chaînes légères (VL)

Après de nombreux essais infructueux où différents paramètres de production pour produire les parties variables des chaînes légères par les bactéries WK6, en utilisant soit les constructions plasmidiques pHEN6-VL ou pHEN6-VL-IIa-CL et où différentes approches de purification comme décrit pour les chaînes légères complètes ont été employées, les parties variables ont finalement été produites dans le système pET28/SHuffle. La souche E. Coli SHuffle est particulièrement adaptée car elle possède un cytoplasme spécifique qui permet les modifications post-traductionnelles nécessaires au bon repliement des protéines. Contrairement au système pHEN6/WK6 qui favorise une production périplasmique, les

chaînes légères produites par le système pET28/Shuffle ont été purifiées à partir d'une lyse bactérienne favorisant la récupération du cytoplasme de la cellule. La purification a été réalisée sur résine de Cobalt via les tags HisX6 des protéines (voir la partie Méthodes). Les protéines obtenues à l'issue de ce processus se sont avérées difficiles à caractériser. Pour la partie variable de la chaîne légère du patient Sa, Sa-VL, la dialyse des fractions éluées a systématiquement conduit à la formation d'agrégats d'aspect « nuageux » visibles à l'œil nu. Le gel SDS-PAGE réalisé après re-suspension des agrégats a montré une bande prépondérante à 18 kDa après révélation au bleu de Coomassie, correspondant potentiellement à la partie variable mais accompagné de multitudes d'autres bandes. En ce qui concerne Ma-VL, (la partie variable de la chaîne légère du patient Ma) le même résultat a été révélé par SDS-PAGE et coloration. De plus, pour Ma-VL et Sa-VL, la caractérisation par Western blot avec un anticorps de révélation dirigé contre leur tag a montré la production et la purification de VL multimériques.

3. Production et purification des variants moléculaires des chaînes légères : mutants et chimères

Sept différents variants de la chaîne légère Ma-LC ont été produits pour déterminer quelle région de Ma-LC était responsable de son interaction avec le FX (Figure 10)

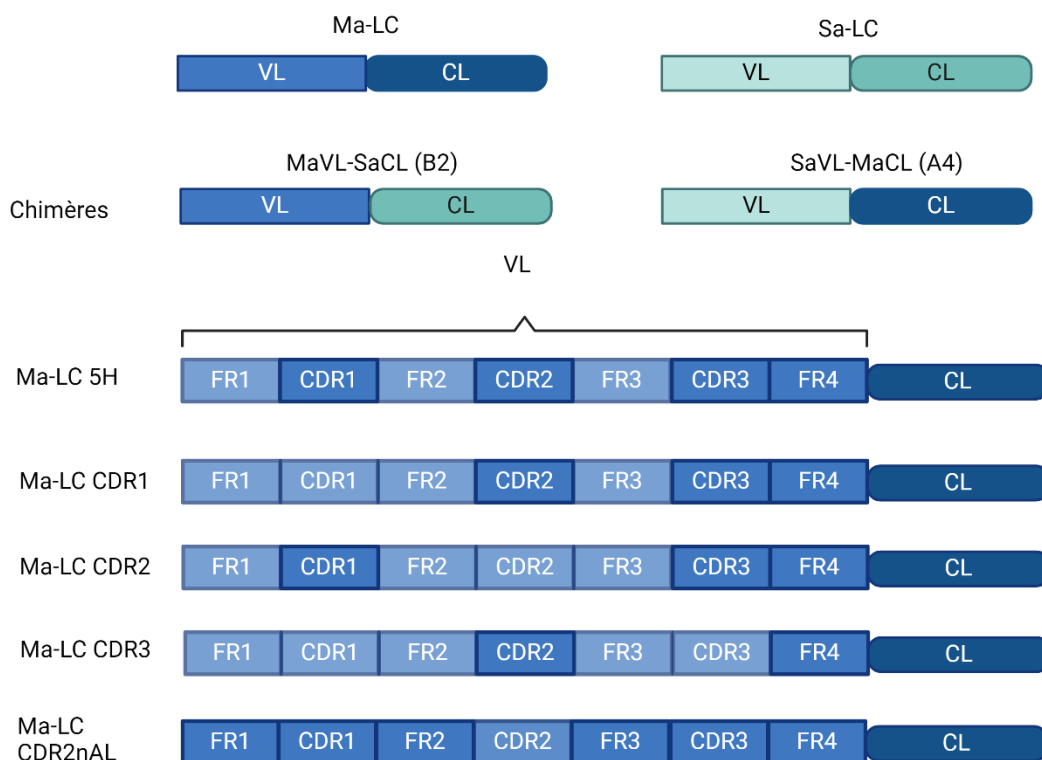


FIGURE 10 : RESUME SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS VARIANTS DE LA CHAÎNE LÉGERE.

Les chimères résultent de l'intervention des parties variables (VL) des deux chaînes légères (Ma et Sa Lc). Le premier variant porte le VL de Ma et la partie constante (CL) de Sa, le deuxième variant porte le VL de Sa et le CL de Ma. Les variants 5H, CDR1, CDR2, CDR3 et CDR2nAL sont issues de mutagenèse dirigée dans le VL de Ma-LC. Les rectangles transparents indiquent les régions modifiées par mutagenèse.

Tout d'abord, en raison des difficultés rencontrées pour générer les parties variables individuelles de nos chaînes légères et face au besoin d'étudier leurs fonctions spécifiques, nous avons choisi de produire des chimères de nos deux chaînes légères par intervention des parties variables des deux chaînes légères Ma-LC et Sa-LC. Les constructions chimériques ont été produites dans les mêmes conditions que les protéines d'origine, et ont été obtenues sans impuretés notables, avec des rendements similaires à ceux des chaînes légères d'origine. La chimère A4 comprend la partie constante de Ma-LC et la partie variable de Sa-LC, notée Sa VL-Ma CL, tandis que la chimère B2 est constituée de la partie constante de Sa-LC et la partie variable de Ma-LC, désignée Ma VL-Sa CL. La production de A4 a atteint environ 3 mg par litre de production tandis que celle de B2 a été jusqu'à 4 mg pour 1 L de production.

a été capturé par un anticorps monoclonal dirigé contre le FX (KB-FX008). Par la suite, une analyse par Western blot de l'immunoprécipité a permis d'identifier Ma-LC. Dans les mêmes conditions expérimentales Sa-LC n'a pas été identifiée (Figure 14F). En conclusion, ces résultats, montrent que Ma-LC contrairement à Sa-LC se lie à différentes formes immobilisées de FX (FX, FXa et FXdeg) et au FX d'origine plasmatique en solution. Afin de s'assurer de la spécificité de l'interaction de la chaîne légère Ma-LC au FX, nous avons testé la capacité d'un anticorps polyclonal anti FX (PoAb) et de FX en solution à déplacer la liaison de Ma-LC au FX immobilisé. Nous avons ainsi montré que le FX en solution mais aussi l'anticorps PoAb anti FX peuvent déplacer à plus de 90% l'interaction de Ma-LC au FX immobilisé (Figure 14 D et E) ;

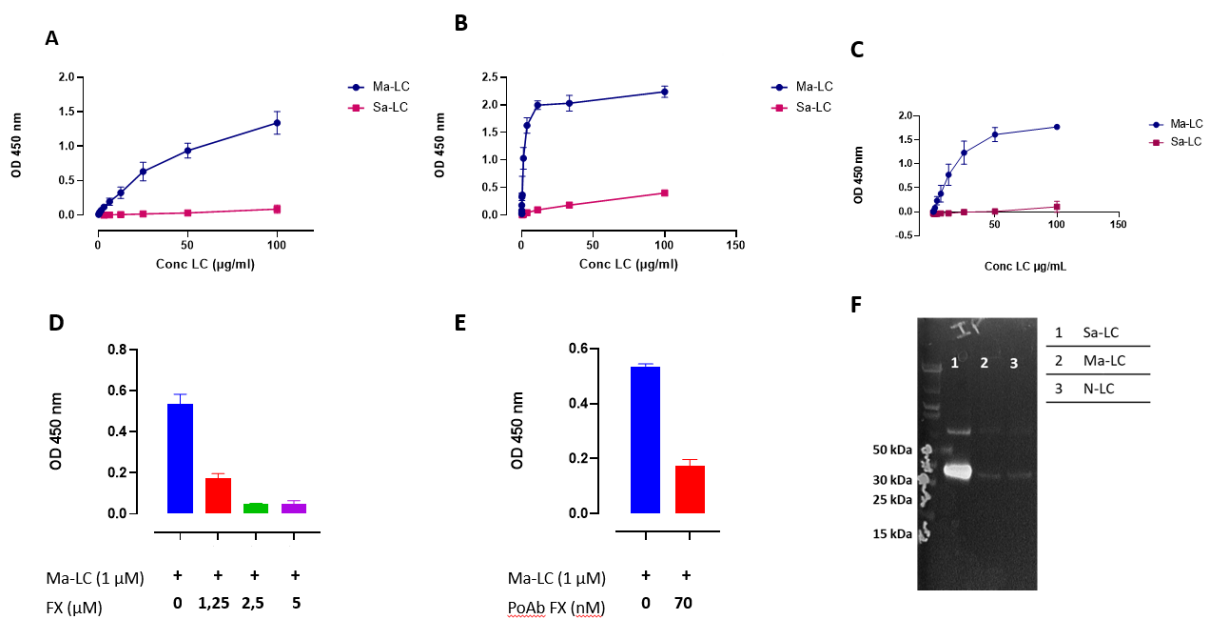


FIGURE 14 : LIAISON DES chaînes LEGERES AU FX

Panneau A : Ma-LC purifié (ronds bleus) ou Sa-LC purifié (carrés rouges), tous deux 0-100 µg/ml, ont été incubés avec le FX immobilisé (5 µg/ml) dans un tampon HEPES 25 mM (pH 7,4)/NaCl 125 mM/ Tween 20 0,1%/BSA 0,1%. Les LC liées ont été détectées par un anticorps anti-chaîne légère lambda humaine couplé à la peroxydase. *Panneau B* : Ma-LC purifié (ronds bleus) ou Sa-LC purifié (carrés rouges), tous deux 0-100 µg/ml, ont été incubés avec le FXa immobilisé (5 µg/ml) comme décrit dans le panneau A. Les LC liées ont été détectées comme décrit dans le panneau A. *Panneau C* : Ma-LC purifié (ronds bleus) ou Sa-LC purifié (carrés rouges), tous deux 0-100 µg/ml, ont été incubés avec le FXdeg immobilisé (5 µg/ml) comme décrit dans le panneau A. Les LC liées ont été détectées comme décrit dans le panneau A. *Panneaux D et E* : Ma-LC (1 µM) a été incubé en l'absence ou en présence de différentes concentrations molaires de FX (1,25 ; 2,5 ; 5 µM) ou de (70 nM) d'anticorps anti-FX polyclonal (PoAb). Après 30 minutes d'incubation, les mélanges ont été ajoutés à des puits recouverts de FX (5 µg/ml). Ma-LC liée a été détectée comme décrit dans le panneau A. *Panneau F* : Ma-LC purifié ou Sa-LC purifié tous deux à 2 µM ont été incubés avec le FX (80 µM) en solution. Le complexe est immunoprécipité par des billes magnétiques couplées à un anticorps monoclonal anti FX. Les précipités sont analysés par western blot et révélés

par un anticorps anti chaîne légère. La bande autour de 30 kDa correspond au monomère de la chaîne légère et la bande autour de 60 kDa au dimère de la chaîne légère. Pour tous les panneaux, les données représentent la moyenne \pm SD de 3-4 expériences.

Pour renforcer nos conclusions précédentes, l'interaction de Ma-LC au FX a été étudiée par SPR. A cette fin Ma-LC a été comparée à Sa-LC et une chaîne légère contrôle, N-LC dans leur capacité à se lier au FX immobilisé à une concentration équivalente aux concentrations trouvées dans le plasma pour Ma-LC et Sa-LC. Ma-LC a affiché une liaison au FX contrairement à Sa-LC et NLC (Figure 15A). Pour étudier plus en détail l'interaction de Ma-LC avec le FX, les paramètres cinétiques qui décrivent cette interaction ont été déterminés. Ma-LC a lié le FX avec une affinité de 620 nM ($k_{off} = 3,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $k_{on} = 5,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$). Les résultats obtenus confirment que Ma-LC se lie au FX et la cinétique de dissociation du complexe observée grâce à la SPR montre que le complexe FX/Ma-LC formé est très stable.

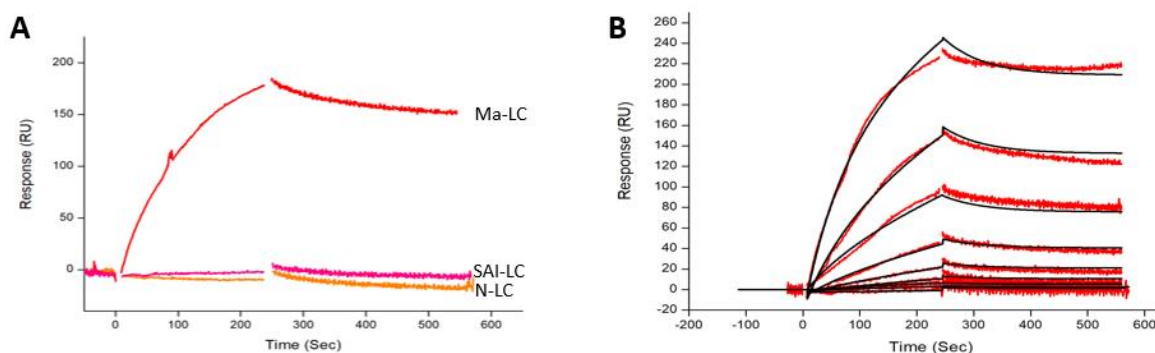


FIGURE 15 : LIAISON DES LC AU FX EVALUE PAR SPR

Panneau A : Liaison de Ma-LC, de SA-LC et de N-LC (LC contrôle) au FX immobilisé. N-LC est comme Ma-LC et Sa-LC une chaîne légère Lambda mais purifiée d'un myélome humain (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) et sert de contrôle négatif. Les LC (250 nM) ont été passés dans un tampon HPES (HEPES 25 mM, NaCl 125 mM, pH 7,4 contenant 0,005 % de Tween 20) sur des canaux séparés sur une puce de détection C1 où a été immobilisé le FX à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ jusqu'à une densité de 1000 RU. L'association des LC est faite pendant 4 min (0-240 sec) à un débit de 20 $\mu\text{l/min}$ à 25 °C et la dissociation observée pendant 5 min. La réponse est indiquée en unités de résonance (RU) et est corrigée pour la liaison non spécifique. **Panneau B :** Différentes concentrations de Ma-LC (250 ; 125 ; 62,5 ; 31,2 ; 15,6 ; 7,8 et 3,9 nM) ont été passés sur du FX immobilisé comme décrit pour le panneau A afin de déterminer une constante d'affinité, estimée ici à 620 nM par le modèle mathématique de Langmuir. Les panneaux présentent les résultats d'une expérience représentative parmi trois réalisées.

5. La partie variable de Ma-LC est responsable de la liaison au FX

Pour identifier les régions de Ma-LC impliquées dans son interaction avec le FX, nous avons testé une série de variants moléculaires de cette LC pour leur capacité à lier le FX immobilisé en utilisant des conditions de liaison similaires à celles décrites précédemment pour la figure 12. Nous avons émis l'hypothèse que la partie variable seule et non la chaîne complète était responsable de l'interaction observée avec le FX. Nos essais de production de la partie variable seule n'ayant pas été concluants, pour tester notre hypothèse, nous avons d'abord testé des chimères de Ma-LC et Sa-LC par échange des parties variables. Ces chimères ont été appelées respectivement « VL Ma-CL Sa » pour la chimère qui possède la partie variable de Ma-LC et la partie constante de Sa-LC et « VL Sa-CL Ma » pour la chimère complémentaire. Alors qu'aucune liaison de VL Sa-CL Ma n'a été observée, VL Ma-CL Sa a montré une association dose-dépendante et saturable avec le FX (Figure 16). Ces expériences nous ont permis de conclure à la responsabilité spécifique et essentielle de la partie variable quant à l'activité de liaison de la chaîne légère Ma-LC au FX.

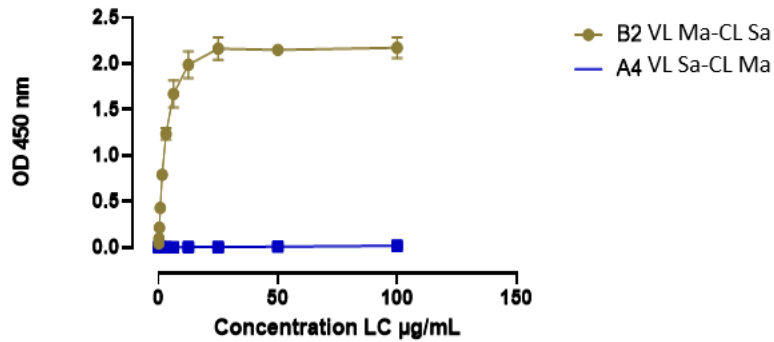
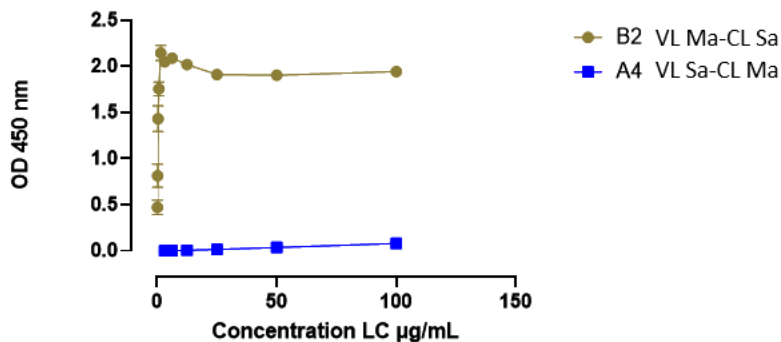
A**B**

FIGURE 16 : INTERACTION DES chaînes LEGERES CHIMERIQUES AU FX ET AU FXA

Panneau A : VL Ma-CL Sa purifié (ronds vert) ou VL Sa-CL Ma purifié (carrés bleu), tous deux 0-100 µg/ml, ont été incubés avec le FX immobilisé (5 µg/ml) dans un tampon HEPES 25 mM (pH 7,4)/NaCl 125 mM/ Tween 20 0,1%/BSA 0,1%. Les LC liées ont par un anticorps anti-chaîne légère lambda humaine couplé à la peroxydase. Panneau B : VL Ma-CL Sa purifié (ronds vert) ou VL Sa-CL Ma purifié (carrés bleu) ont été incubés avec le FXa immobilisé (5 µg/ml) et leur interaction révélée comme décrit dans le panneau A. Pour tous les panneaux, les données représentent la moyenne ±SD de 3-4 expériences.

4-1. Localisation du site de liaison du FX sur la partie variable de Ma-LC

Pour préciser le site d'interaction du FX sur la partie VL de la chaîne légère Ma-LC, nous avons testé la capacité des variants de Ma-LC comportant des mutations sur le domaine VL à se lier au FX. En premier lieu, nous avons testé la capacité du variant, Ma-LC 5H qui possède au niveau des FRs la séquence germinale IGLV2. Aucune différence significative n'a été observée entre les capacités de liaison de Ma-LC et Ma-LC 5H avec le FX (Figure 17). La protéine retrouve une certaine stabilité et est mieux exprimée dans la bactérie mais conserve sa propriété de reconnaissance du FX. Les régions FRs de Ma-LC ne sont pas impliquées dans l'interaction observée avec le FX.

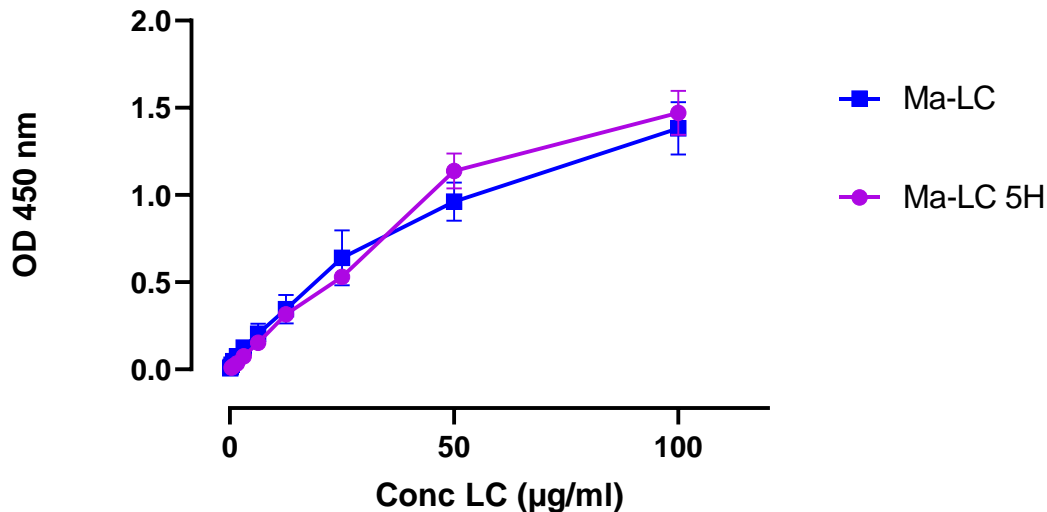


FIGURE 17 : INTERACTION DU MUTANT FRAMEWORK DE MA-LC AU FX

Ma-lc purifié (carrés bleu) ou ma-lc 5h purifié (ronds violet), tous deux 0-100 µg/ml, ont été incubés avec le FX immobilisé (5 µg/ml) dans un tampon hepes 25 mm (ph 7,4)/nacl 125 mm/ tween 20 0,1%/bsa 0,1%. Les lc liées ont été détectées par un anticorps anti-chaîne légère lambda humaine couplé à la peroxydase. Les données représentent la moyenne±sd de 3-4 expériences.

Pour aller plus loin dans l'identification de la région de Ma-LC responsable de son interaction au FX, nous avons évalué la capacité de liaison au FX des variants de Ma-LC qui, tout comme le variant Ma-LC 5H, présentent les FRs de IGLV2-14*03, correspondant au germline de Ma-LC. Ces variants Ma-LC CDR1, Ma-LC CDR2, et Ma-LC CDR3 possèdent respectivement le CDR1, le CDR2 et le CDR3 de IGLV2-14*03. Aucune liaison ou des liaisons très significativement diminuées au FX ont été observés pour les différents variants CDR de Ma-LC 5H (Figure 18). Une faible liaison, dose dépendante a été observée pour le variant Ma-LC CDR2, aucune pour le variant Ma-LC CDR1 et une liaison très faible mais significative a été observée pour le variant Ma-LC CDR3 aux concentrations testées les plus élevées. Nos résultats montrent que l'ensemble des CDRs est indispensable à la liaison de Ma-LC au FX puisque la mutation de chacun des CDRs suffit à rompre l'interaction observée avec la chaîne légère d'origine.

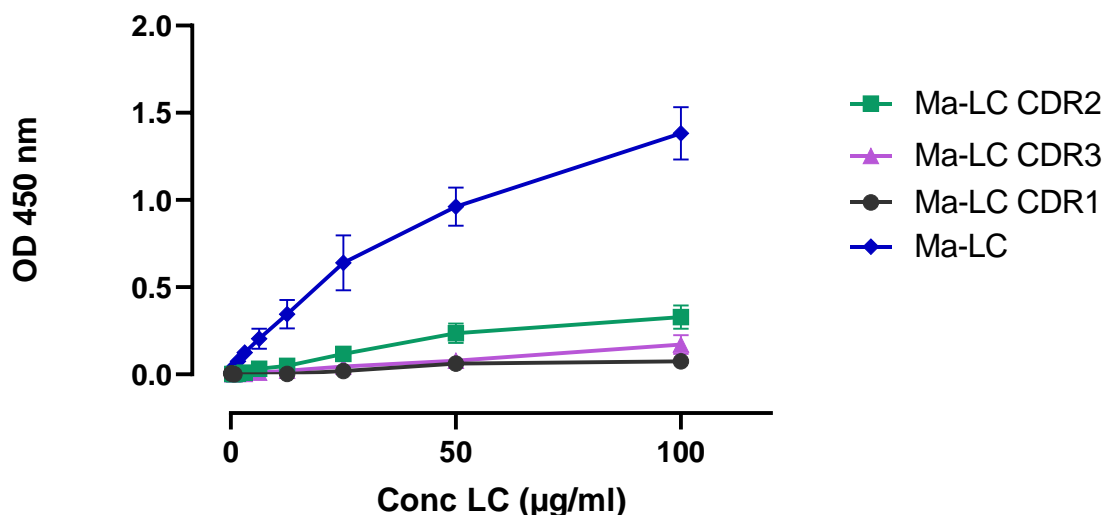


FIGURE 18 : INTERACTION DES MUTANTS DE MA-LC AU FX

Ma-LC purifié (losanges bleu), Ma-LC CDR1 purifié (ronds noir), Ma-LC CDR2 purifié (carrés vert), ou Ma-LC CDR3 purifié (triangles violet), tous entre 0-100 µg/ml, ont été incubés avec le FX immobilisé (5 µg/ml) dans un tampon HEPES 25 mM (ph 7,4)/nacl 125 mM/ Tween 20 0,1%/BSA 0,1%. Les LC liées ont été détectées par un anticorps anti-chaîne légère lambda humaine couplé à la peroxydase. Les données représentent la moyenne±SD de 3-4 expériences.

Le mutant « non amyloïdogène » conserve une liaison au FX

Ma-LC CDR2nAL a été prédit comme non amyloïdogène par le logiciel « VLAmy-Pred » (voir plus haut). Pour déterminer si la perte de la potentielle prédisposition de Ma-LC à former des structures amyloïdes avait une influence sur sa capacité à interagir avec le FX, nous avons tester en système ELISA la liaison du variant CFR2nAL au FX. CDR2nAL conserve une interaction avec le FX même si son taux de liaison apparait diminué par rapport à Ma-LC (Figure 19).

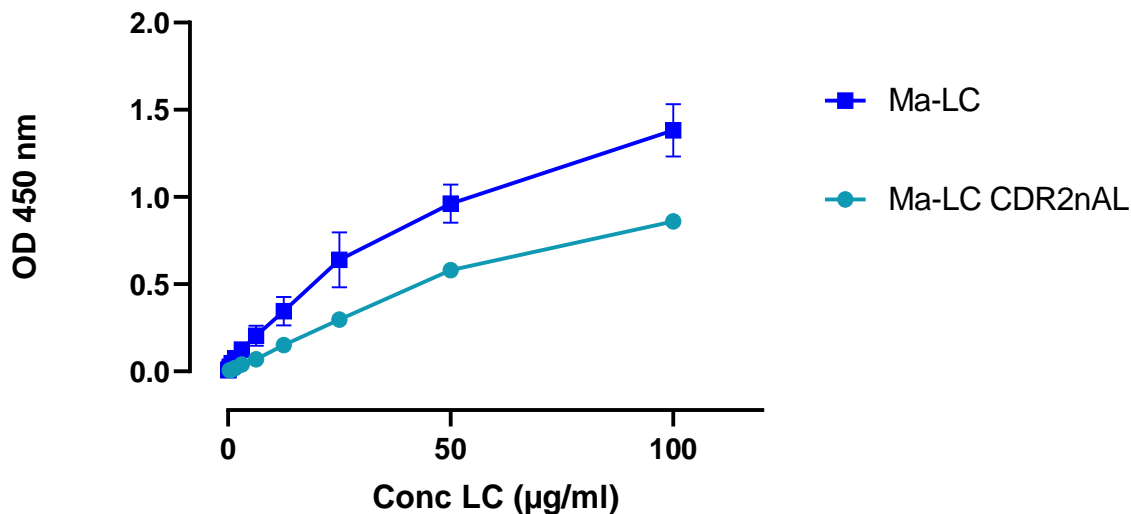


FIGURE 19 : INTERACTION DU MUTANT « NON AMYLOÏDOGENE » DE MA-LC AU FX

Ma-LC purifié (carrés bleu), ou Ma-LC CDR2nAL purifié (ronds vert), tous entre 0-100 µg/ml, ont été incubés avec le FX immobilisé (5 µg/ml) dans un tampon HEPES 25 mM (pH 7,4)/NaCl 125 mM/ Tween 20 0,1%/BSA 0,1%. Les LC liées ont été détectées par un anticorps anti-chaîne légère lambda humaine couplé à la peroxydase. Les données représentent la moyenne±SD de 3-4 expériences.

6. Effets de la liaison de Ma-LC sur le FX

6-1. La liaison de Ma-LC au FX n'affecte pas l'activité du FX

Afin de déterminer si la liaison de Ma-LC au FX plasmatique pouvait affecter l'activité procoagulante du FX de la patiente Ma et être à l'origine du dosage bas de l'activité du FX mesuré au diagnostic nous avons comparé les taux de FX antigénique et de FX coagulant d'un aliquot congelé de son plasma prélevé sur EDTA au moment du diagnostic. Nous avons mesuré un taux d'antigène de FX similaire à l'activité de FX qui avait été mesurée précédemment. (FX :C dosé sur prélèvement citraté 1 an après diagnostic 26% ; FX:Ag dosé sur prélèvement EDTA à la même date 28%). La faible activité procoagulante du FX observée chez cette patiente semble donc être le résultat d'une réelle absence de FX.

Pour tester si la chaîne légère Ma-LC que nous avons produit et que nous avons montré dans différents modes opératoires comme se liant au FX avait un effet sur la coagulation, nous l'avons mise en présence d'un plasma normal pendant 30 min à température ambiante pour permettre sa liaison au FX plasmatique. Au bout des 30min, nous avons mesuré l'activité du

FX dans un test modifié de mesure du temps de céphaline activée (test PTT) du plasma pré-incubé avec Ma-LC en le comparant à un plasma ayant été pré-incubé avec la même quantité de Sa-LC ou de NLC ou avec uniquement le tampon de dilution des LC. Nos résultats montrent une activité FX similaire dans toutes les conditions testées (Figure 20) démontrant ainsi que la liaison potentielle entre Ma-LC et le FX dans le plasma, n'empêche pas l'activité procoagulante du FX dans ce milieu.

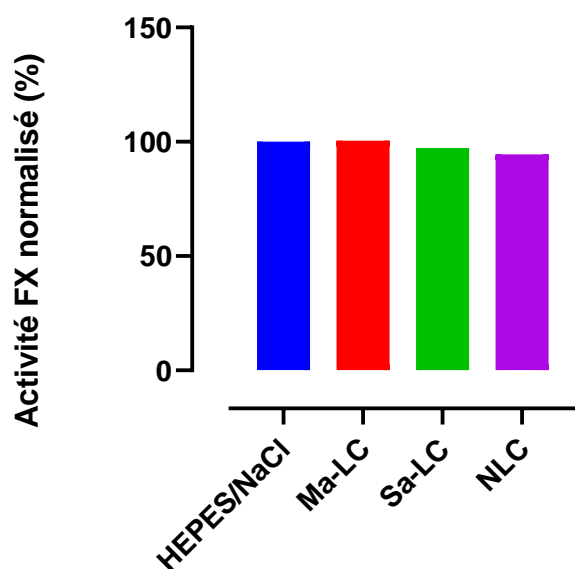


FIGURE 20 : ACTIVITE FX MESUREE EN PRESENCE DES chaînes LEGERES

L'activité procoagulante du FX a été testée dans un plasma en présence du tampon HEPES 25 mM (pH 7,4)/NaCl 125 mM (Bleu), de Ma-LC (rouge), de Sa-LC (vert) et de NLC (violet). La condition HEPES 25 mM (pH 7,4)/NaCl 125 mM est considérée niveau de base (100%).

Pour évaluer l'impact de la liaison de Ma-LC au FX sur son activité dans un système purifié, nous avons testé la capacité de Ma-LC à inhiber l'activation du FX soit par le complexe FVIIa/FT soit par le complexe FIXa/FVIIIa en présence de phospholipides. Le FX est un substrat naturel des complexes FVIIa/FT et FIXa/FVIIIa qui sont considérés comme respectivement le complexe d'initiation et le complexe d'amplification de la coagulation sanguine lors d'une brèche vasculaire. Les vitesses initiales de formation du FX activé (FXa) par le complexe FVIIa/FT et le complexe FIXa/FVIIIa ont été comparées entre le FX seul, le FX complexé à Ma-LC et le FX en présence de Sa-LC. Aucune distinction de vitesse initiale de formation du FXa

n'a été détectée que cela soit par le complexe FVIIa/FT (Figure 21A) ou le complexe FIXa/FVIIIa. Aucune inhibition de la vitesse initiale de formation du FXa par le complexe n'a été observée en présence de Ma-LC (Figure 21B). De même, aucune différence de la vitesse initiale de formation de la thrombine par le complexe prothrombinase (FXa/FVa/PL) n'a été observée dans un système in vitro entre la condition où le FXa avait été associé au FVa et aux phospholipides pour former le complexe prothrombinase et la condition où le FXa avait été pré-incubé avec une concentration saturante de Ma-LC avant d'être associé au FVa et aux phospholipides (Figure 21C). En conclusion, les différentes conditions expérimentales testées montrent que la chaîne légère recombinante Ma-LC n'a pas d'effet sur la transformation du FX en FXa par les complexes d'activation du FX de la coagulation ni sur l'activité enzymatique du FXa vis-à-vis de la prothrombine au cours de la coagulation. On peut conclure de l'ensemble de ces résultats que le déficit en FX mesuré chez la patiente Ma n'est pas dû à une inhibition de l'activité procoagulante du FX de la circulation par la chaîne légère pathogène mais à une diminution du taux antigénique de FX circulant.

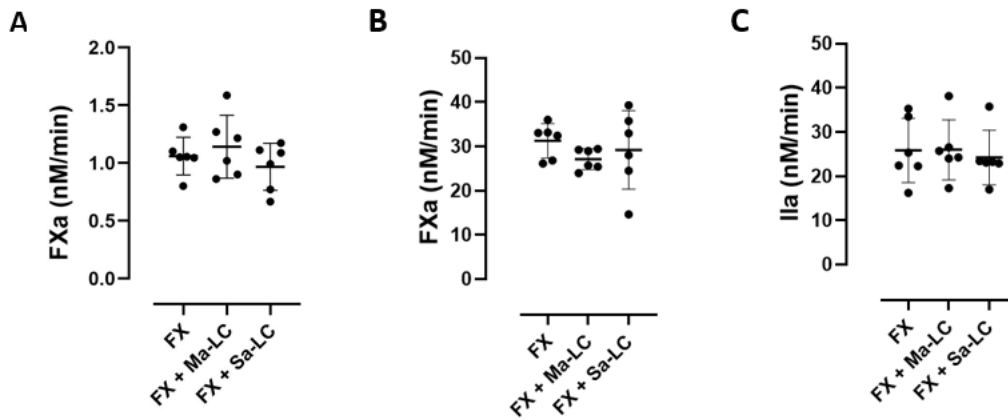


FIGURE 21 : EFFET DE MA-LC SUR L'ACTIVATION ET L'ACTIVITE DU FX AU SEIN DES COMPLEXES ENZYMATIQUES DE LA COAGULATION.

(A) Activation de FX par le complexe FVIIa/TF en présence ou en absence de chaîne légère (8 μ M) Ma-LC ou Sa-LC. L'activation de 120 nM de FX a été réalisée à 37 °C par 8 nM de FVIIa et 500 pM de TF en présence de vésicules de phospholipides (PS/PE/PC, 20:20:60 mol% ; 30 μ M concentration finale), et de 2.5 mM de CaCl_2 . La formation de FXa a été déterminée comme décrit dans la section « Matériels et méthodes ». Les données représentent les valeurs moyennes de trois expériences. **(B)** Activation de FX par le complexe FIXa/FVIIIa en présence ou en absence de chaîne légère (8 μ M) Ma-LC ou Sa-LC. L'activation de 120 nM de FX a été réalisée à 37 °C par 9 nM de FIXa et 0,25U/ml de FVIIIa en présence de vésicules de phospholipides (PS/PE/PC, 20:20:60 mol% ; 50 μ M concentration finale), et de 2.5 mM de CaCl_2 . La formation de FXa a été déterminée comme décrit dans la section « Matériels et méthodes ». Les données représentent les valeurs moyennes de trois expériences. **(C)** Activation de la prothrombine en thrombine par le complexe FXa/FVa en présence ou en absence de chaîne légère (4 μ M) Ma-LC ou Sa-LC. L'activation de 1,5 μ M de prothrombine a été réalisée à 37 °C par 20 pM de FXa et 25 nM de FVa en présence de vésicules de phospholipides (PS/PE/PC, 20:20:60 mol% ; 30 μ M concentration finale), et de 2.5 mM de CaCl_2 . La formation de thrombine (Ila) a été déterminée comme décrit dans la section « Matériels et méthodes ». Les données représentent les valeurs moyennes de trois expériences.

6-2. La liaison de Ma-LC au FX n'influe pas sur la cinétique de clairance du FX dans un modèle murin

Pour déterminer si la diminution du taux antigénique de FX dans la circulation de la patiente Ma pouvait être attribuable à une clairance augmentée, conséquence d'une interaction du FX avec les chaînes légères libres circulantes responsables des dépôts amyloïdes nous avons utilisé un modèle murin déficient en FX. Après avoir administré à ces souris du FX humain pré-incubé avec des concentrations élevées de Ma-LC, nous avons observé une cinétique d'élimination similaire du FX humain et de son activité dans le plasma des souris par rapport aux groupes de souris ayant reçu du FX humain pré-incubé dans les mêmes conditions avec Sa-LC ou avec le tampon d'injection dans les mêmes conditions volémiques (figure 22). Ces

résultats montrent que le complexe formé in vitro entre Ma-LC et le FX n'a pas d'incidence sur la cinétique d'élimination du FX humain in vivo une fois le complexe injecté. De plus, les données de mesure de l'activité du FX se superposent étroitement avec celles du dosage antigénique, confirmant ainsi que la présence de la chaîne légère ne modifie pas l'activité du FX dans le plasma.

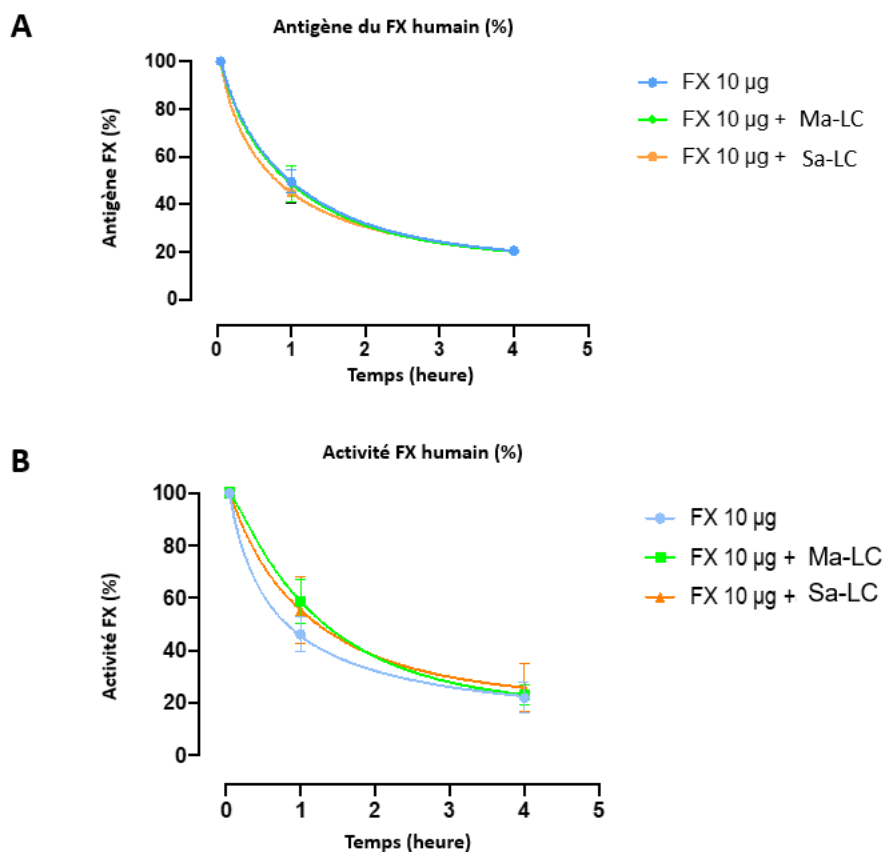


FIGURE 22: CINÉTIQUE D'ÉLIMINATION DU FX HUMAIN EN PRÉSENCE DES chaînes LÉGERES DANS UN MODÈLE MURIN

Des souris déficientes en FX ont été injectées par voie intraveineuse avec du FX humain (10 µg/souris) pré-incubé ou non (ronds bleus) avec les chaînes légères Ma-LC (carrés vert) ou Sa-LC (triangles rouge). Des échantillons de sang ont été prélevés aux moments indiqués et la quantité résiduelle d'antigène FX injecté dans le plasma (panneau A) et d'activité résiduelle coagulante de FX injecté dans le plasma (panneau B) en fonction du temps après l'injection ont été quantifiées. Trois souris ont été utilisées pour chaque point dans le temps. Les données représentent les valeurs moyennes en trois exemplaires \pm S.D.

6-3. Endocytose

Afin de déterminer si la formation d'un complexe entre Ma-LC et le FX pouvait inhiber le mécanisme de régulation des taux circulants du FX par les macrophages qui avait été mis en évidence au laboratoire, nous avons pré-incubé le FX avec Ma-LC pendant 30 minutes à 37°C pour permettre la formation du complexe FX/Ma-LC. Nous avons ensuite mis en contact le complexe FX/Ma-LC des cellules THP-1 différenciées en macrophages pendant 1h à 4°C pour permettre une liaison du FX aux macrophages, notamment au récepteur SR-AI, comme décrit précédemment. Puis nous avons incubé les cellules à 37°C pour remettre en route la machinerie cellulaire notamment l'endocytose des protéines par leurs récepteurs. Après 1h d'incubation, nous avons détecté une bien plus forte présence de complexes FX/EEA-1 (early endosome antigen-1) en utilisant le système de ligature de proximité (PLA) Duolink® quand les macrophages ont été mis en présence du complexe FX/Ma-LC que dans les conditions où le FX était seul ou en présence de N-LC (Figures 23A, B et C). Nous avons déterminé que la valeur moyenne du nombre de complexes FX/EEA-1 par macrophage était significativement supérieur quand le FX avait été pré-incubé avec Ma-LC que seul ou avec une LC contrôle, N-LC ($48,0 \pm 27,5$ versus $11,4 \pm 8,9$ ou versus $11,1 \pm 9,1$; $P < 0,0001$, $n=30$; Figure 23D). En conclusion, ces résultats montrent que quand un complexe est formé entre le FX et la chaîne légère Ma-LC, il y a une endocytose bien plus importante du FX par les macrophages que quand le FX est seul.

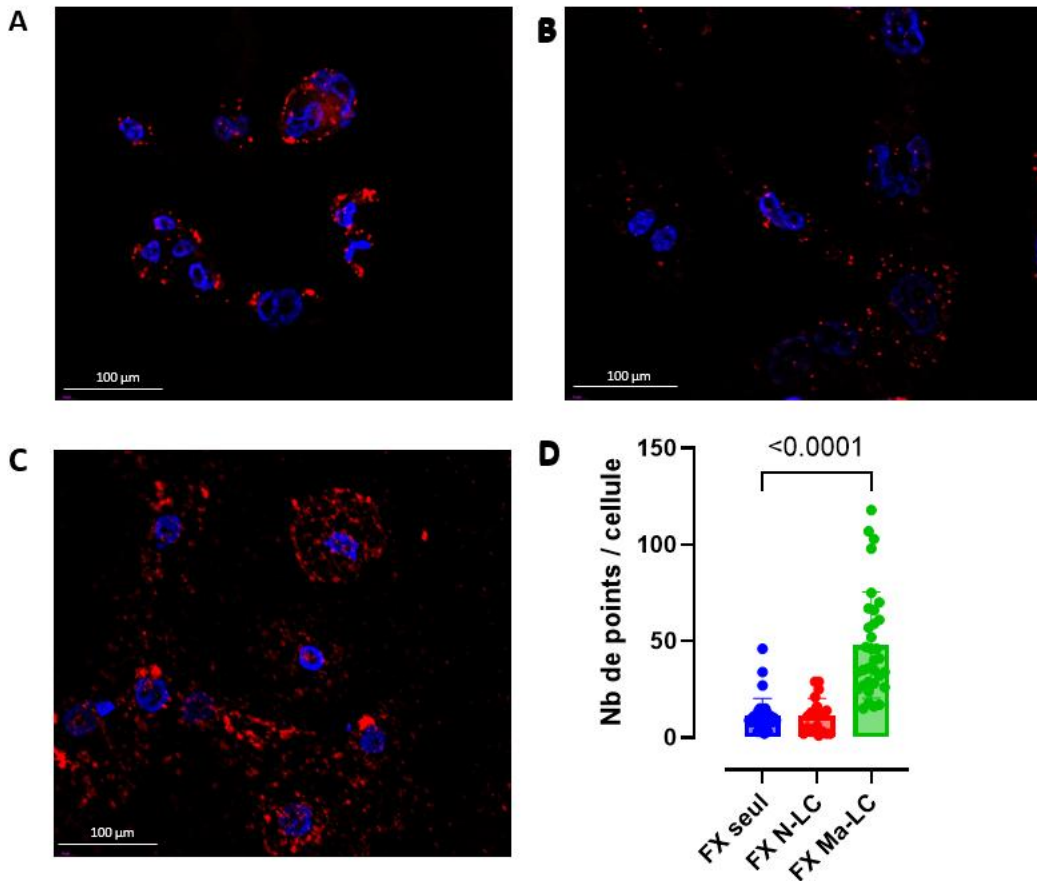


FIGURE 23 : MA-LC AUGMENTE LE NOMBRE D'INTERACTIONS DU FX AVEC EEA-1 DANS LES MACROPHAGES

Images de microscopie à grand champ du test Duolink-PLA entre le FX et l'EEA-1 sur des cellules THP-1 différenciées. Des cellules THP-1 différenciées en macrophages ont été incubées 1 h à 4°C puis 1h à 37°C en présence de (A) FX seul, (B) FX avec la chaîne légère contrôle N-LC, et (C) avec le FX pré-incubé avec Ma-LC. Les noyaux ont été colorés à l'aide de DAPI, les barres représentent 100 μm, objectif x63. Les taches rouges indiquent une distance inférieure à 40 nm entre les deux antigènes. Ici sont présentées des images représentatives de chacune des 3 conditions expérimentales comparées. La détection des antigènes et l'acquisition des images ont été faites dans des conditions identiques. (D) présente la comparaison du nombre de complexes FX/EEA-1 par THP-1 différenciés en macrophages et incubés (1h à 4°C puis 1h à 37°C) en présence de FX seul ou de FX pré-incubé avec Ma-LC ou de FX pré-incubé avec N-LC. Chaque point représente la valeur du nombre de complexe FX/EEA-1 détecté pour 1 cellule. Au total 3 lames de cellules ont été analysées pour chaque condition et dans chaque lame 10 cellules. Un test t non apparié a été utilisé.

Conclusion et perspectives

Dans cette étude nous avons mis pour la première fois en évidence l'existence d'une liaison spécifique au FX de la chaîne légère soluble d'un patient atteint d'amylose AL présentant un déficit en FX. Nous avons montré que la formation du complexe était due à la partie variable de la chaîne légère et spécifiquement aux mutations introduites dans la séquence de la chaîne légère pathogène, par rapport à la séquence germinale du même isotype.

Nous avons démontré que la complexation du FX par la chaîne légère pathogène nommée Ma-LC n'affectait pas l'activité coagulante du FX, que ce soit dans le plasma ou dans des systèmes purifiés. Cependant nous avons mis en évidence une endocytose significativement accrue du FX complexé à la chaîne légère par des macrophages en comparaison au FX seul. Ceci suggère que la formation de ce complexe pourrait perturber un mécanisme régulateur des taux circulants du FX que nous avons découvert et publié au sein du laboratoire.¹¹⁰ Néanmoins, lors d'expériences sur des souris, nous n'avons pas réussi à détecter d'influence de la chaîne légère liant le FX sur la clairance de la protéine. Pour confirmer l'hypothèse selon laquelle l'interaction que nous avons mise en évidence affecte les taux circulants du FX, il serait nécessaire d'utiliser un modèle animal reproduisant l'amylose AL chez l'homme. Heureusement, un tel modèle a été développé par l'équipe du Dr Christophe Sirac (UMR 7276, Université de Limoges – CNRS). Actuellement, ce modèle utilise la chaîne légère Sa-LC que nous avons employée dans notre étude, bien qu'elle ne présente pas d'interaction avec le FX et ne provienne pas d'un patient avec un déficit de la coagulation. Il serait intéressant de répliquer le même modèle avec la chaîne légère Ma-LC. Grâce à ce modèle nous pourrions mieux comprendre le rôle de l'interaction du FX avec la chaîne légère Ma-LC.

Il est possible que le mécanisme que nous avons observé avec les macrophages n'ait pas uniquement un rôle sur les taux circulants du FX mais aussi sur l'évolution de la pathologie, en permettant par exemple d'éliminer de la circulation les chaînes légères pathogènes ou au contraire en favorisant la formation de fibrilles amyloïdes comme montré sur d'autres modèles cellulaires. Ainsi, les travaux du groupe de Guillermo Herrera, travaillant essentiellement sur des cellules mésangiales ont montré que les chaînes légères de patients

AL induisent des changements vers un phénotype macrophagique.²⁹⁴ Les chaînes légères AL seraient largement internalisées dans les cavéoles et transportées vers les lysosomes où elles réunissent les conditions d'une amyloïdogénèse rapide (protéolyse, dénaturation et pH acide). Les agrégats amyloïdes sont alors extrudés des cellules pour envahir les espaces extracellulaires. Un processus similaire a également été démontré par le même groupe dans les cellules musculaires lisses vasculaires²⁹⁵ soulignant encore le rôle des lysosomes dans la formation de l'amylose AL, et est cohérent avec des observations antérieures dans les macrophages spléniques pendant la formation de l'amylose AA²⁹⁶

En plus du déficit en facteur de coagulation, plusieurs études de cas cliniques ont mis en lumière d'autres troubles de l'hémostase.^{269,271} Le développement d'un modèle animal d'amylose AL, tel que celui récemment mis au point par l'équipe du Dr Sirac (voir ci-dessus), permettra d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine de ces dysfonctionnements. Bien que chaque chaîne légère semble influencer les symptômes chez un individu donné, il existe probablement des mécanismes communs entre les patients présentant une altération de l'hémostase. La présence d'une chaîne légère amyloïdogène pourrait influencer la biologie de plusieurs protéines impliquées dans l'hémostase. Cette idée est étayée par l'observation selon laquelle les structures amyloïdes chez un patient sont capables d'interagir avec plusieurs facteurs de coagulation.²⁶⁶

L'étude portant sur la capacité des macrophages différenciés en THP1 à endocyter de manière plus importante que dans des conditions normales le FX quand celui-ci est complexé par la chaîne légère Ma-LC nécessite une meilleure caractérisation sur le plan mécanistique. Il reste à identifier les différents acteurs de l'endocytose notamment le récepteur SRA1 ainsi que la SAP lorsque le FX est ajouté en présence de Ma-LC. Par exemple, nous n'avons pas encore déterminé si l'endocytose accrue du FX en présence de Ma-LC se produit effectivement via SR-AI. De plus nous n'avons pas encore établi si lors de cette endocytose accrue due à la présence du complexe FX/Ma-LC, la SAP peut se lier au FX. Au cours d'expériences préliminaires non incluses dans ce manuscrit, nous avons observé que la formation du complexe FX/Ma-LC n'empêchait pas la liaison du FX à la SAP et inversement

que la présence du complexe FX/SAP n'entravait pas la liaison de Ma-LC au FX. Dans les deux cas, nous avons identifié la formation d'un tri-complexe. La découverte de ce tri-complexe dans la circulation sanguine constitue une avancée dans la compréhension des mécanismes de régulation de la concentration de ces protéines et de leurs fonctions biologiques au cours de l'amylose AL.

Notre projet s'est heurté à une difficulté majeure : la production dans des quantités suffisantes de chaînes légères amyloïdogènes. Cela a limité le nombre de chaînes légères que nous avons pu étudier se cantonnant à deux chaînes légères d'isotype lambda, l'une provenant d'un patient avec un déficit en FX et l'autre sans défaut de la coagulation. Avec davantage de chaînes légères provenant de différents patients, nous aurions pu déterminer si seuls les patients présentant un déficit en FX pouvaient présenter une interaction entre leur chaîne légère pathogène et le FX. Une autre difficulté rencontrée était la faible stabilité en forme soluble des chaînes légères amyloïdogènes, limitant ainsi le panel d'expériences présentées dans ce manuscrit. De plus, nous n'avons pas réussi à développer des conditions permettant d'induire la fibrillation de la chaîne Ma-LC sans agrégation. En effet, chaque chaîne légère nécessite ses propres conditions expérimentales pour fibriller. L'établissement de ces conditions aurait pu nous permettre de déterminer si le FX influence la fibrillation d'une chaîne légère, un aspect que nous n'avons pas abordé dans ces travaux.

Malgré ces limites le travail présenté a ouvert de nombreuses possibilités d'exploration pour l'avenir. Il a montré pour la première fois qu'une interaction stable pouvait exister entre le FX et une chaîne légère amyloïdogène encore soluble chez un patient atteint d'amylose AL. Compte tenu de la spécificité structurale de chaque chaîne légère, il est difficile de généraliser les phénomènes observés au cours de ce travail. Néanmoins, nos travaux suggèrent que de nombreuses pistes peuvent être explorées pour déterminer l'influence de la formation d'un tel complexe. Ils ouvrent également la voie à la possibilité d'utiliser cette observation comme un moyen de développer des outils de diagnostic peu invasifs et rapides pour cette pathologie rare, mais dont le diagnostic précoce est vital pour les patients.

Chapitre 3 :

Les cellules vasculaires comme support de la génération de thrombine d'un plasma hémophile A en présence de FVIII et ou d'emicizumab

Introduction

L'hémophilie A est une maladie hémorragique héréditaire rare due à un déficit congénital du Facteur VIII (FVIII) de la coagulation. Jusqu'à récemment, le traitement de l'hémophilie A, a consisté en une prophylaxie substitutive palliant au déficit en FVIII par administration intraveineuse de concentrés de FVIII dérivés du plasma ou recombinants. Ce traitement s'est avéré efficace dans la gestion des saignements dans l'hémophilie A. Toutefois, il engendre un certain nombre de difficultés dont l'observance. Les administrations étant fréquentes, les accès veineux peuvent devenir difficiles et mener à un niveau de soins insatisfaisant. Par ailleurs, 15 à 30 % de patients atteints d'hémophilie A développent des inhibiteurs du FVIII exogène et ces inhibiteurs compromettent la capacité du patient à gérer les hémorragies, ce qui entraîne une morbidité accrue et un coût élevé de traitement du patient.⁷⁷ Les épisodes hémorragiques et la nécessité d'une intervention chirurgicale chez les patients porteurs d'inhibiteurs sont gérés à l'aide d'agents « by-passants » ou de dérivation comme le facteur FVII activé recombinant (rFVIIa) et un concentré de complexe prothrombique activé (aPCC) qui agissent indépendamment du FVIII dans la cascade de la coagulation en générant de la thrombine.

Pour pallier aux limites du traitement substitutif, d'autres thérapies ont été développées plus récemment en s'affranchissant des schémas classiques basés sur l'utilisation du FVIII. Parmi eux, l'emicizumab, un anticorps bispécifique offre une nouvelle approche thérapeutique en favorisant le rapprochement du facteur IX (FIX) activé et du facteur X (FX) pour permettre l'activation de ce dernier et ainsi restaurer la fonction hémostatique du FVIII absent chez les patients atteints d'hémophilie A. La structure moléculaire unique de l'emicizumab signifie qu'il n'est pas soumis aux mêmes mécanismes physiologiques qui éliminent le FVIII de la

circulation, et qu'il persiste donc beaucoup plus longtemps dans la circulation que le FVIII. Il a une longue demi-vie d'environ 4 à 5 semaines, ce qui permet des schémas d'administration une fois par semaine, toutes les 2 semaines ou même tous les mois. L'absence de ressemblance moléculaire entre l'emicizumab et le FVIII permet également son utilisation chez les patients ayant des inhibiteurs du FVIII, ce qui en fait un outil thérapeutique utile lorsque l'induction de la tolérance immunitaire et la prophylaxie par les agents by-passants ont échoué. De plus, grâce à sa voie d'administration sous-cutanée, l'emicizumab peut réduire la charge de traitement associée aux fréquentes perfusions intraveineuses de facteur.⁶⁹ Cependant, bien qu'efficace en prophylaxie l'emicizumab nécessite l'ajout de FVIII ou d'agents « by-passants » dans la prise en charge des hémorragies ou lors des chirurgies. L'association de l'emicizumab à l'aPCC dans ce contexte a présenté un risque thrombotique lors des essais cliniques HAVEN-1.^{72,297} C'est pourquoi l'utilisation du FEIBA a été exclue des essais HAVEN 2 à 4, où aucun cas de microangiopathie thrombotique n'a été observé^{68,298,299} Cependant, malgré des avancées significatives, le mécanisme sous-jacent à cette complication singulière demeure largement méconnu, ce qui limite notre capacité à prédire et à prévenir efficacement les risques thrombotiques associés à l'utilisation de l'emicizumab et d'autres thérapies de remplacement. Bien que l'emicizumab favorise la génération de FX activé, il ne reproduit pas toutes les propriétés fonctionnelles du FVIIIa³⁰⁰ De plus, l'utilisation de l'emicizumab perturbe les tests classiques de coagulation tel que le temps de céphaline activée (TCA) ou le dosage de l'activité du FVIII ce qui complique le suivi des patients notamment dans les contextes chirurgicaux où des traitements hémostatiques d'appoint sont souvent nécessaires. Bien que le test de génération de thrombine (TGT) représente une alternative intéressante permettant d'évaluer l'activité coagulante globale du patient et son monitoring.³⁰¹ il présente ses propres limites. Comme la majorité des tests de laboratoire, le TGT ne prends pas en compte les composants cellulaires de la paroi vasculaire qui pourraient jouer un rôle dans l'apparition de complications thrombotiques observées lors des essais cliniques HAVEN-1.

Nous avons élaboré cette étude pour explorer la génération de thrombine en présence du FVIII et/ou de l'emicizumab à la surface de cellules vasculaires représentées par les cellules endothéliales aortiques humaines (hAECs) et les cellules musculaires lisses aortiques (hVSMCs).

Thrombin generation on vascular cells in the presence of factor VIII and/or emicizumab

Sénadé Atsou¹ | Célia Schellenberg² | Jeremy Lagrange² | Patrick Lacolley² | Peter J. Lenting¹ | Cécile V. Denis¹ | Olivier D. Christophe¹ | Véronique Regnault²

¹Université Paris-Saclay, INSERM, Hémostase Inflammation Thrombose HITH U1176, 94276, Le Kremlin-Bicêtre, France

²Université de Lorraine, INSERM, Défaillance Cardiovasculaire Aiguë et Chronique DCAC U1116, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Correspondence

Peter J. Lenting, INSERM U1176, 80 rue du Général Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France.

Email: peter.lenting@inserm.fr

Funding information

This study received funding from Institut Roche (Boulogne-Bilancourt, France).

Abstract

Background: The effect of factor VIII (FVIII) or emicizumab on thrombin generation is usually assessed in assays using synthetic phospholipids. Here, we assessed thrombin generation at the surface of human arterial cells (aortic endothelial cells [hAECs] and aortic vascular smooth muscle cells [hVSMCs]).

Objectives: To explore the capacity of hAECs (resting or stimulated) and hVSMCs to support thrombin generation by FVIII or emicizumab.

Methods: Primary hVSMCs and hAECs were analyzed for tissue factor (TF)-activity and antigen, phosphatidylserine (PS)-exposure, tissue factor pathway inhibitor (TFPI)-content and thrombomodulin expression. Cells were incubated with FVIII-deficient plasma spiked with FVIII, emicizumab, activated prothrombin complex concentrate (APCC) or combinations thereof.

Results: TF activity and PS-exposure were present on both hVSMCs and hAECs. In contrast, thrombomodulin and TFPI were expressed on hAECs, while virtually lacking on hVSMCs, confirming the procoagulant nature of hVSMCs. Tumor necrosis factor α -mediated stimulation of hAECs increased not only TF antigen, TF activity, and PS-exposure but also TFPI and thrombomodulin expression. As expected, FVIII and emicizumab promoted thrombin generation on nonstimulated hAECs and hVSMCs, with more thrombin being generated on hVSMCs. Unexpectedly, FVIII and emicizumab increased thrombin generation to a lesser extent on stimulated hAECs compared with nonstimulated hAECs. Finally, adding emicizumab to FVIII did not further increase thrombin generation, whereas the addition of emicizumab to APCC resulted in exaggerated thrombin generation.

Conclusion: Tumor necrosis factor stimulation of hAECs increases both pro- and anticoagulant activity. Unexpectedly, the increased anticoagulant activity is sufficient to limit both FVIII- and emicizumab-induced thrombin generation. This protective effect disappears when emicizumab is combined with APCC.

Manuscript handled by: Riitta Lassila

Final decision: Riitta Lassila, 18 September 2023

Sénadé Atsou and Célia Schellenberg contributed equally to this study as first authors.

Olivier D. Christophe and Véronique Regnault contributed equally to this study as senior authors.

© 2023 International Society on Thrombosis and Haemostasis. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

KEYWORDS

emicizumab, endothelial cells, factor VIII, smooth muscle cells, thrombin generation

1 | INTRODUCTION

Hemophilia A is an X-linked bleeding disorder caused by defects in the gene encoding factor VIII (FVIII), affecting 1 to 2 per 10 000 male births [1]. Replacement therapy using plasma-derived or recombinant FVIII concentrates has proven to be effective in the management of bleedings in patients with hemophilia A [2]. Nevertheless, replacement therapy is limited by the need for frequent i.v. administrations and the development of neutralizing antibodies (inhibitors) in 15% to 30% of the severe hemophilia A patients [3,4]. Bleeding episodes and the need for surgery in inhibitor patients were traditionally managed using bypassing agents that act independently of FVIII in the coagulation cascade in order to generate thrombin. These agents include recombinant activated factor VII (rFVIIa) and activated prothrombin complex concentrate (APCC). However, both APCC and rFVIIa do not eliminate bleeding or successfully control acute bleeds in all patients with inhibitors [5,6].

To overcome these limitations, novel treatment strategies that act independently of FVIII options have been or are becoming available. Some of these are based on restoring the hemostatic balance by targeting components of the anticoagulant pathway, such as tissue factor pathway inhibitor (TFPI), activated protein C or antithrombin [7–9]. Alternatively, bispecific antibodies have been developed that aim to mimic FVIII cofactor function. Examples hereof are emicizumab and Mim8 [10,11]. Emicizumab (approved for clinical use by both Food and Drug Administration and European Medicines Agency) has shown clinical efficacy in multiple clinical trials, with significantly reduced annual bleeding rates and improved quality of life [12–16].

In vitro activities of both FVIII and emicizumab are usually determined in assays using synthetic phospholipids, such as chromogenic activity assays and thrombin generation assays [17–22]. However, emicizumab and FVIII are exposed to vascular cells within the circulation, like endothelial cells and, upon vascular breaching, smooth muscle cells. These cells display a different phospholipid signature compared with synthetic phospholipids, while also expressing both procoagulant and anticoagulant proteins, including TFPI, thrombomodulin, and tissue factor (TF). In this study, we therefore aimed to explore the contribution of primary vascular arterial cells to emicizumab- and FVIII-supported thrombin generation. Our data show that both endothelial cells and vascular smooth muscle cells support FVIII- and to a lesser extent emicizumab-dependent thrombin generation. Interestingly stimulation of endothelial cells by tumor necrosis factor- α (TNF α) resulted in an increase of both procoagulant and anticoagulant activity, resulting in a net reduced potential to stimulate FVIII- and emicizumab-dependent thrombin generation. In all cases, combining emicizumab with APCC resulted in exaggerated thrombin generation.

Essentials

- Thrombin generation by factor (F) VIII and emicizumab on vascular cells was investigated.
- Endothelial and smooth muscle cells support FVIII- and emicizumab-mediated thrombin generation.
- Emicizumab activity is limited by an excess of FIX when phospholipids are limiting.
- Anticoagulant components play an important role in controlling FVIII and emicizumab activity.

2 | MATERIALS AND METHODS**2.1 | Cell culture**

Primary human aortic endothelial and vascular smooth muscle cells (hAECs and hVSMCs), human umbilical vein endothelial cells (hUVECs), and human microvascular endothelial cells (hMVECs) were purchased from Lonza and grown in Endothelial Cell Growth Medium-2 BulletKit and SmGM-2 Smooth Muscle Cell Growth Medium-2 BulletKit (Lonza), respectively, during 3 passages. Batches of 3 different individuals were used in this study. Cells were used between passages 3 to 7 to reduce phenotypic drift. Cells (6500-7500/well) were seeded in 96-well tissue culture flat-bottom plates (MICROTEST 96), grown to subconfluence a day before use. We have previously established that cells seeded above 2500/well generate homogeneous thrombin generation parameters [23]. Cells were washed with 20 mM 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethane-sulfonic acid (HEPES; Sigma-Aldrich), 140 mM NaCl, pH 7.35 containing 5 mg/mL albumin (HBS-buffer) before use. In some experiments, hAECs were activated by incubating with 5 nM TNF- α in growth medium for 4 hours before use.

2.2 | Flow cytometry

Cells were harvested with trypsin-EDTA and then incubated for 1 hour with an antiendothelial protein C receptor (EPCR) antibody (cat # 563624; BD Biosciences), an antithrombomodulin antibody (cat # MAB3947; R&D Systems), or an antiTFPI antibody (cat Ab260041; Abcam) in phosphate buffered saline (PBS) or bovine serum albumin (BSA) 1%. After washing, cells were resuspended in PBS or BSA 1% and measurement was performed with Celesta Sorp flow cytometer (BD Biosciences). Cells (10 000) were routinely counted,

and cell population was defined based on forward-side scatter characteristics. Data were analyzed with the Kaluza analysis 2.1 software (Beckman Coulter). Nonlabelled cells were used as negative controls

2.3 | Antigen and activity assays

TF and TFPI activities were measured in 200 μ L HBS incubated for 1 hour at room temperature with hAECs or hVSMCs using the Actichrome-TF and Actichrome-TFPI activity assay, respectively (American Diagnostica). To measure cell-surface TF or TFPI activity, washed adherent cells were overlaid with HBS-buffer. The reaction was stopped with glacial acetic acid and the absorbance read at 405 nm.

The chromogenic assay measuring the phosphatidylserine (PS)-equivalent in hAECs and hVSMCs was performed as described previously for vascular smooth muscle cells. Briefly, washed adherent cells were incubated with 50 μ L of 20 mM HEPES, pH 7.35 containing 60 mg/mL BSA, 50 μ L of FXa-FVa-CaCl₂, and 50 μ L of bovine prothrombin (6 μ M) plus Z-Gly-Gly-Arg-AMC substrate (1.25 mM) in 20 mM HEPES pH 7.35 containing 60 mg/mL BSA. The plate was placed in the Fluoroskan Ascent fluorometer (Thermo Fisher Scientific) and allowed to warm to 37 °C for 5 minutes before kinetic readings were recorded over 10 minutes. Phospholipid concentration was estimated from the initial rate of thrombin formation by reference to a standard curve constructed with a mixture of PS, phosphatidylethanolamine (PE), and phosphatidylcholine (PC) (20:20:60 mol%), and expressed as PS equivalents.

The Quantikine Human Thrombomodulin Immunoassay (cat # BDCA-3; R&D Systems) was used to measure human thrombomodulin in cell culture lysates as instructed.

2.4 | Thrombin generation

Lyophilized FVIII-deficient plasma (SYSMEX/HYPHEN Biomed) was reconstituted with distilled water and kept for 30 minutes at room temperature.

Thrombin generation was essentially performed as described by Hemker et al. [24]. In brief, 20 μ L of 20 mM HEPES (pH 7.4)/140 mM NaCl/5 mg/mL BSA (HBS-BSA) and 80 μ L of FVIII-deficient plasma, alone or supplemented with FVIII (0.25–1.5 U/mL), emicizumab (10–80 μ g/mL), or APCC (1 U/mL) was added to wells (polypropylene 96-well microtiter plates; Nunc, Thermo Fischer Scientific) containing non-stimulated hAECs, TNF α -stimulated hAECs, or hVSMCs previously washed with HBS-BSA. Cell-counts were between 10 000 and 11 000 hVSMCs/well and between 8000 and 9000 hAECs/well. After incubation for 5 minutes at 37 °C, thrombin generation was initiated by the addition of 20 μ L prewarmed Fluo-substrate (20 mM HEPES (pH7.4)/0.1 M Z-Gly-Gly-Arg-AMC/2.5 mM CaCl₂/60 mg/mL BSA). Thrombin generation curves were recorded continuously with a microtiter-plate fluorometer (Fluoroskan Ascent, Thermo Labsystems) under control of Thrombinoscope software (Thrombinoscope BV), filtered for excitation at 390 nm and emission at 460 nm. A calibrator

assay was done using FVIII deficient plasma included on wells with a 20- μ L solution that contained a known concentration of thrombin- α 2-macroglobulin complex (thrombin calibrator, Stago). In total, 4 to 6 experiments were performed in duplicate at 3 different dates (with 1–2 experiments/day) for each cell type. Control experiments using normal pooled plasma were performed to establish reproducibility of the cell-based thrombin generation assay. Intraassay coefficients of variability (CV) for hVSMCs based on 30 values were 6.1%, 2.5%, 6.4%, and 5.5% for lag-time, endogenous thrombin potential (ETP), peak height, and time to peak, respectively. Interassay CV for hVSMCs based on 35 values were 13.0%, 8.6%, 10.8%, and 7.9% for lag-time, ETP, peak height, and time to peak, respectively. Intraassay CV for hAECs based on 30 values were 5.8%, 7.6%, 8.1%, and 6.0% for lag-time, ETP, peak height, and time to peak, respectively. Interassay CV for hAECs based on 35 values were 10.3%, 9.9%, 13.7%, and 11.8% for lag-time, ETP, peak height, and time to peak, respectively.

2.5 | FX activation

Phospholipid vesicles (60% PC, 20% PS, 20% PE) were incubated in 25 mM HEPES pH 7.2, 120 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 0.1% BSA with FIXa in the absence or presence of FIX for 10 minutes at 37 °C in 60% of the final volume. We then added FVIII in the presence of thrombin or emicizumab. After 1 minute, FXa generation was initiated by the addition of the substrate FX and hirudin (to inactivate thrombin). At this point, volume was at 100% for all incubations, with the final concentrations being: phospholipids 50 nM or 1 μ M, 9 nM FIXa, 90 nM FIX, 0.1 nM FVIII, 5 nM thrombin, 50 μ g/mL emicizumab, 120 nM FX, and 2 U/mL hirudin. At various times after initiation, samples were taken and FXa generation was quenched by the addition of EDTA (10 mM), and FXa concentrations were determined using the synthetic substrate pNAPEP-1065. An active-site titrated FXa preparation was used to relate substrate hydrolysis to FXa concentrations.

2.6 | Data analysis

All data were presented as mean \pm SD unless stated otherwise.

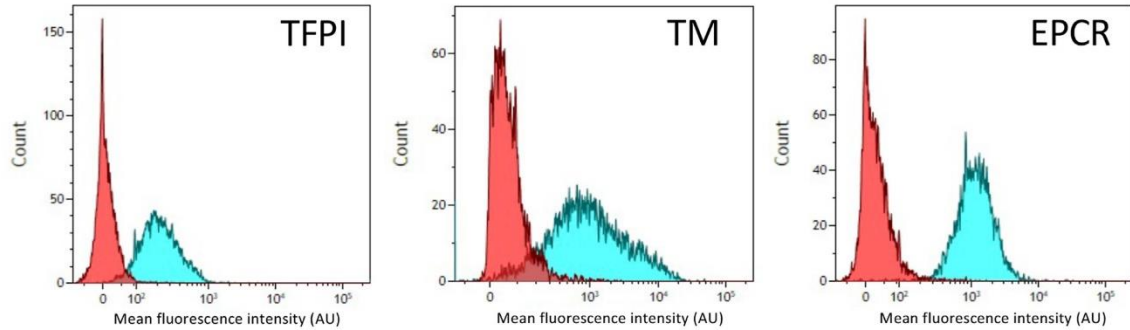
The statistical analyses were performed using Prism-9 for MacOS (Graphpad Software) as specified in the legends.

3 | RESULTS

3.1 | Characterization of vascular cells

Two types of human cells of aortic origin were used in this study: endothelial cells (hAECs) and vascular smooth muscle cells (hVSMCs). Flow cytometric analysis showed that hAECs were positive for thrombomodulin, TFPI, and EPCR, whereas hVSMCs only proved positive for EPCR (Figure 1). Quantitative analysis further revealed that hVSMCs displayed about 10-fold more TF antigen than hAECs

hAECs



hVSMCs

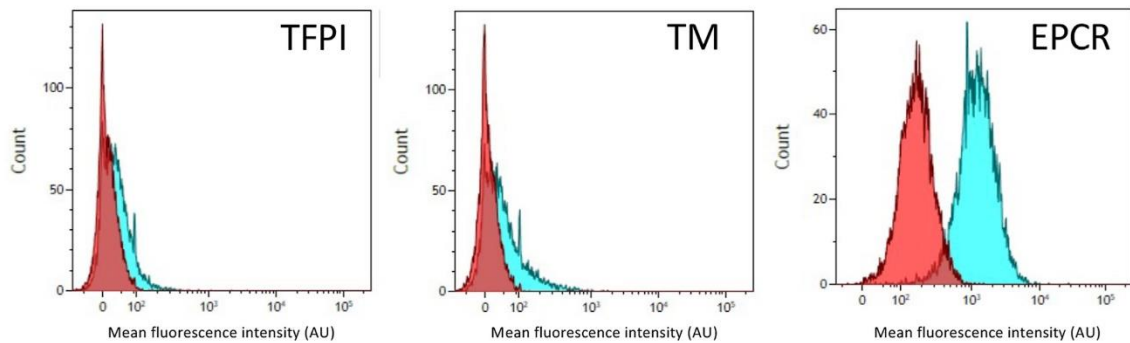


FIGURE 1 Cell-surface expression of tissue factor pathway inhibitor (TFPI), thrombomodulin (TM), and endothelial protein C-receptor (EPCR) on human aortic endothelial cells (hAECs) and human aortic vascular smooth muscle cells (hVSMCs). Cell-surface expression of TFPI, TM, and EPCR on nonstimulated hAECs and hVSMCs was determined by flow cytometry. Shown are representative flow cytograms of 3 to 5 analyses. Red cytograms represent cells incubated with isotype-control antibodies, and blue cytograms represent cells incubated with TFPI-, TM-, or EPCR-specific antibodies.

($1.1 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{mg}$ cell protein vs $0.13 \pm 0.04 \mu\text{g}/\text{mg}$ cell protein), whereas TF activity was approximately 2-fold higher in hVSMCs than in hAECs ($19 \pm 3 \text{ pM}$ vs $8 \pm 1 \text{ pM}$; [Table 1](#)). Both cell types expressed similar levels of PS-equivalent ($34 \pm 7 \text{ nM}$ vs $53 \pm 20 \text{ nM}$; [Table 1](#)). With regard to anticoagulant proteins, hVSMCs exposed low levels of thrombomodulin and TFPI just above the limit of detection ($1 \pm 1 \text{ ng}/\text{mg}$ cell protein and $0.04 \pm 0.01 \mu\text{g}/\text{mg}$ cell protein), much less than in

hAECs ($9 \pm 1 \text{ ng}/\text{mg}$ cell protein and $0.31 \pm 0.04 \mu\text{g}/\text{mg}$ cell protein, respectively; [Table 1](#)).

A stimulation of hAECs by $\text{TNF}\alpha$ (5 nM; 4 hours) resulted in an 11-fold increase in TF antigen (from $0.13 \pm 0.04 \mu\text{g}/\text{mg}$ cell protein to $1.4 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ cell protein), with a relative minor increase in TF activity being noted ($10 \pm 2 \text{ pM}$). Furthermore, a 4-fold increase in PS-equivalent ($197 \pm 99 \text{ nM}$) was measured. Perhaps unexpectedly, an increase in

TABLE 1 Expression of procoagulant and anticoagulant proteins in different cell types.

Cellular component	hVSMCs	hAECs		hUVECs	hMVECs
		Nonstimulated	$\text{TNF}\alpha$ -stimulated		
TF antigen ($\mu\text{g}/\text{mg}$ cell protein)	1.1 ± 0.1 (n = 7)	0.11 ± 0.08 (n = 10)	1.4 ± 0.10 (n = 6)	0.11 ± 0.09 (n = 6)	0.13 ± 0.09
TF activity (pM)	19 ± 3 (n = 5)	8 ± 1 (n = 6)	10 ± 2 (n = 6)	10 ± 1 (n = 6)	7 ± 1 (n = 6)
PS-exposure (nM)	34 ± 7 (n = 18)	53 ± 20 (n = 14)	197 ± 99 (n = 12)	65 ± 6 (n = 6)	53 ± 5 (n = 6)
Thrombomodulin (ng/mg cell protein)	1 ± 1 (n = 7)	9 ± 1 (n = 11)	16 ± 1 (n = 6)	9 ± 1 (n = 6)	8 ± 1 (n = 6)
TFPI ($\mu\text{g}/\text{mg}$ cell protein)	0.04 ± 0.01 (n = 4)	0.31 ± 0.04 (n = 4)	0.47 ± 0.04 (n = 4)	0.35 ± 0.03 (n = 6)	0.33 ± 0.03 (n = 6)

N represents number of independent wells have been analyzed for each of the components.

hAECs, human aortic endothelial cells; hVSMCs, human aortic vascular smooth muscle cells; hUVECs, human umbilical endothelial cells; hMVECs, human dermal microvascular endothelial cells; PS-exposure, phosphatidylserine-exposure; TF, tissue factor; TFPI, tissue factor pathway inhibitor.

thrombomodulin and TFPI expression was also observed (16 ± 1 ng/mg cell protein and 0.47 ± 0.04 μ g/mg cell protein, respectively). These data suggest that the procoagulant and anticoagulant balance in hAECs remains seemingly unchanged upon stimulation by TNF α . Furthermore, hVSMCs display a more procoagulant profile than hAECs, due to a lack of anticoagulant components thrombomodulin and TFPI.

3.2 | Thrombin generation on vascular cells in FVIII-deficient plasma

To investigate the effect of FVIII concentrations on thrombin generation at the surface of vascular cells, FVIII-deficient plasma was spiked with different concentrations of rFVIII. No external phospholipids, TF, or FXIa were added to the reactions, which were therefore dependent on the amounts of TF and phospholipids exposed by the cells. Thrombin generation was first determined in FVIII-deficient plasma alone to establish background values. In the absence of any addition, minimal amounts of thrombin were generated when using hAECs or TNF α -stimulated hAECs, even when this was slightly increased in the stimulated cells (Figure 2A, B). ETP values were 35 ± 9 nM-min and 120 ± 45 nM-min for hAECs and TNF α -stimulated hAECs, respectively (Table 2). At the surface of hVSMCs, thrombin generation was significantly higher (ETP 768 ± 70 nM-min; Table 2 and Figure 2C), in keeping with the more procoagulant nature of these cells.

3.3 | Thrombin generation on vascular cells in the presence of FVIII

The addition of FVIII resulted in a dose-dependent increase in thrombin generation (Figure 2A-C). Thrombin generation-related parameters (lag-time, thrombin peak, and ETP) changed in a dose-dependent manner for all 3 cell types ($P < .05$; Figure 2D-L and Table 2). Between the lowest and highest concentration of FVIII tested (0.25 and 1.5 U/mL), the ETP increased from 1022 ± 19 to 1475 ± 112 nM-min on hAECs; from 574 ± 71 to 1166 ± 247 nM-min on TNF α -stimulated hAECs; and from 1079 ± 65 to 1287 ± 55 nM-min on hVSMCs. Thus, the extent of thrombin generation was dependent on the amount of FVIII for each of the cell types investigated.

3.4 | Thrombin generation on vascular cells in the presence of emicizumab

In a next series of experiments, FVIII-deficient plasma was spiked with emicizumab (10-80 μ g/mL), knowing that a concentration of 50 μ g/mL represents the average therapeutic emicizumab level. The presence of 10 μ g/mL emicizumab did not increase thrombin generation above the levels of FVIII-deficient plasma when tested in TNF-stimulated hAECs (Figure 3A). Concentrations of 25, 50, and 80 μ g/mL increased thrombin generation for all 3 cell types. Interestingly, the largest increase in thrombin generation was observed for nonstimulated hAECs, increasing

ETP from 35 ± 9 nM-min to 686 ± 195 nM-min for emicizumab at 50 μ g/mL (Figure 3B and Table 3). Increased thrombin generation was also observed for TNF α -stimulated hAECs in the presence of 50 μ g/mL emicizumab, albeit to a lesser extent (ETP: from 120 ± 45 nM-min to 262 ± 59 nM-min). When added to FVIII-deficient plasma exposed on hVSMCs, emicizumab induced a less pronounced increase in thrombin generation than the endothelial cells, although the absolute ETP was higher than for both other conditions. For example, the ETP increased from 768 ± 70 nM-min to 900 ± 38 nM-min at 50 μ g/mL emicizumab (Table 3). Together, this shows that, emicizumab is less efficient than FVIII in promoting thrombin generation at the surface of vascular cells. Nevertheless, it shares with FVIII that its capacity to enhance thrombin generation is dependent on cell type.

3.5 | Effect of FIX on FIXa-mediated FXa generation

The PS-equivalent on hVSMCs and hAECs is lower than the PS-equivalent used in traditional thrombin generation assays (30-200 nM vs 1.6 μ M). We therefore tested if the limiting phospholipid-surface affects FXa generation by FIXa/FVIIIa or FIXa/emicizumab in the absence or presence of FIX using purified proteins. With regard to the FIXa/FVIIIa complex, FXa generation was unaffected by the presence of FIX, irrespective whether a low or high PS-equivalent was used (Figure 4). In contrast, when FIXa was combined with emicizumab, it appeared that FXa generation was more efficient in the absence than the presence of FIX (1.0 ± 0.2 nM/min vs 2.2 ± 0.5 nM/min; $P < .0001$; Figure 5). This inhibitory effect of FIX was elevated when using 1 μ M PS-equivalent (33 ± 8 nM/min vs 32 ± 4 nM/min; $P = .73$). Apparently, under conditions where phospholipids are limiting, the presence of FIX reduces the efficiency by which the FIXa/emicizumab complex is able to generate FXa.

3.6 | Thrombin generation on different endothelial cells

Since endothelial cells may vary in phenotype, we tested thrombin generation also using 2 other endothelial cells: hUVECs and hMVECs. Levels of thrombomodulin, TFPI, EPCR, TF activity, TF antigen, and PS-equivalent were similar as for the unstimulated hAECs (Table 1 and Supplementary Figure S1). In addition, thrombin generation was in the same order of magnitude for these cells, irrespective whether FVIII (0.25 or 1.0 U/mL) or emicizumab (50 μ g/mL) was used (Supplementary Table S1). This suggests that the data obtained using hAECs might be extrapolated to various other types of endothelial cells.

3.7 | Thrombin generation on vascular cells in the presence of both FVIII and emicizumab

We next investigated the effect of combined FVIII and emicizumab on thrombin generation using the same 3 cell types. FVIII-deficient

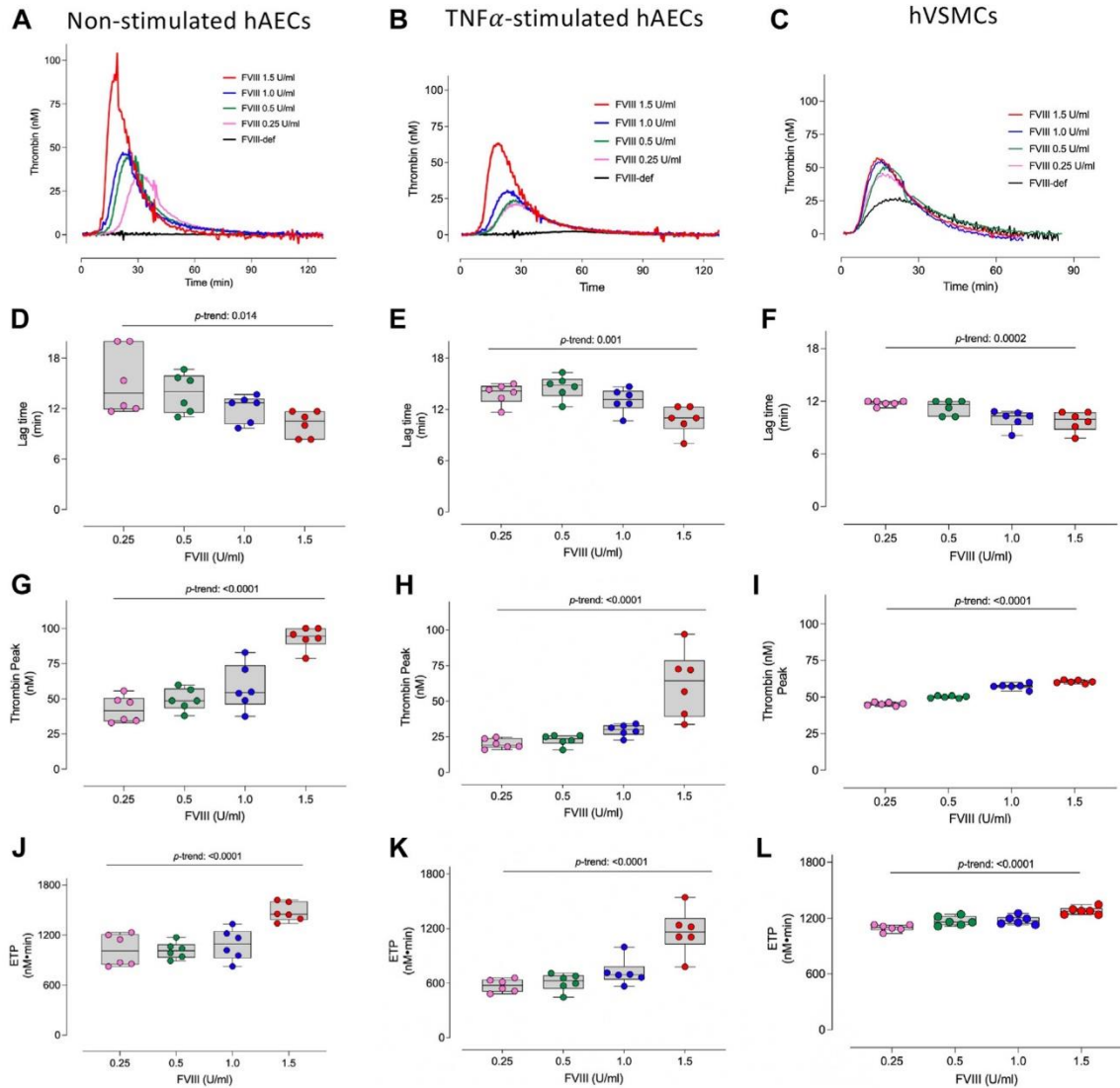


FIGURE 2 Thrombin generation in the presence of Factor VIII (FVIII). Vascular cells (human aortic endothelial cells [hAECs], TNF α -stimulated hAECs, and human aortic vascular smooth muscle cells [hVSMCs]) were incubated with FVIII-deficient plasma (black lines) supplemented or not with various concentrations of recombinant full-length FVIII (Pink: 0.25 U/mL; Green: 0.5 U/mL; Blue: 1.0 U/mL; and Red: 1.5 U/mL) for 5 minutes before initiation of thrombin generation. Thrombin generation was initiated by the addition of CaCl₂, without any other activating agents. (A–C) depict representative thrombograms for each of the conditions tested. (D–F) show the calculated lag-times, (G–I) the calculated thrombin peak and panels (J–L) the endogenous thrombin potential. P-trend was calculate using a one-way analysis of variance test with trend analysis.

plasma spiked with both FVIII (1.0 U/mL) and emicizumab (50 μ g/mL) generated thrombograms that were similar to those of FVIII alone, irrespective of the cell types on which thrombin generation was analyzed (Figure 5, Table 3, and Supplementary Table S1). Apparently, the contribution of emicizumab to thrombin generation in the presence of physiological FVIII concentrations is limited, if present at all under these conditions.

3.8 | Thrombin generation of vascular cells in the presence of emicizumab and APCC

Based on previous findings that combining emicizumab and APCC have a synergistic effect on thrombin generation when using synthetic phospholipids [25], it was of interest to evaluate their combination on vascular cells as well. The addition of APCC alone (1 U/

TABLE 2 Summary of thrombin generation parameters in FVIII-deficient plasma spiked with FVIII.

FVIII	hVSMCs	hAECs	
		Nonstimulated	TNF α -stimulated
<i>Lag-time, min</i>			
FVIII deficient plasma	12 \pm 1 (n = 6)	30 \pm 4 (n = 4)	26 \pm 5 (n = 4)
+ FVIII (0.25 U/mL)	12 \pm 1 (n = 6)	15 \pm 4 (n = 6)	14 \pm 1 (n = 6)
+ FVIII (0.5 U/mL)	11 \pm 1 (n = 6)	14 \pm 2 (n = 6)	15 \pm 1 (n = 6)
+ FVIII (1.0 U/mL)	10 \pm 1 (n = 6)	12 \pm 2 (n = 6)	13 \pm 1 (n = 6)
+ FVIII (1.5 U/mL)	11 \pm 1 (n = 6)	10 \pm 2 (n = 6)	11 \pm 2 (n = 6)
<i>Peak height, nM</i>			
FVIII deficient plasma	27 \pm 2 (n = 6)	4 \pm 1 (n = 4)	3 \pm 1 (n = 4)
+ FVIII (0.25 U/mL)	45 \pm 1 (n = 6)	42 \pm 10 (n = 6)	20 \pm 3 (n = 6)
+ FVIII (0.5 U/mL)	50 \pm 1 (n = 6)	49 \pm 8 (n = 6)	23 \pm 4 (n = 6)
+ FVIII (1.0 U/mL)	57 \pm 2 (n = 6)	58 \pm 16 (n = 6)	30 \pm 4 (n = 6)
+ FVIII (1.5 U/mL)	61 \pm 1 (n = 6)	93 \pm 8 (n = 6)	62 \pm 23 (n = 6)
<i>Endogenous thrombin potential, nM-min</i>			
FVIII deficient plasma	771 \pm 46 (n = 6)	35 \pm 9 (n = 4)	120 \pm 45 (n = 4)
+ FVIII (0.25 U/mL)	1099 \pm 36 (n = 6)	1022 \pm 191 (n = 6)	574 \pm 97 (n = 6)
+ FVIII (0.5 U/mL)	1170 \pm 50 (n = 6)	1015 \pm 99 (n = 6)	610 \pm 85 (n = 6)
+ FVIII (1.0 U/mL)	1179 \pm 45 (n = 6)	1085 \pm 187 (n = 6)	721 \pm 125 (n = 6)
+ FVIII (1.5 U/mL)	1279 \pm 40 (n = 6)	1475 \pm 112 (n = 6)	1166 \pm 247 (n = 6)
<i>Time to peak, min</i>			
FVIII deficient plasma	26 \pm 1 (n = 6)	57 \pm 4 (n = 4)	52 \pm 3 (n = 4)
+ FVIII (0.25 U/mL)	24 \pm 1 (n = 6)	26 \pm 5 (n = 6)	28 \pm 1 (n = 6)
+ FVIII (0.5 U/mL)	23 \pm 1 (n = 6)	23 \pm 3 (n = 6)	27 \pm 2 (n = 6)
+ FVIII (1.0 U/mL)	19 \pm 1 (n = 6)	21 \pm 4 (n = 6)	24 \pm 2 (n = 6)
+ FVIII (1.5 U/mL)	19 \pm 2 (n = 6)	16 \pm 2 (n = 6)	19 \pm 4 (n = 6)

Mean and SD of values for lag-time, peak height, endogenous thrombin potential, and time to peak are shown. F, factor; hAECs, human aortic endothelial cells; hVSMCs, human aortic vascular smooth muscle cells.

mL) increased thrombin generation on nonstimulated and TNF α -stimulated hAECs (ETP: from 35 \pm 9 nM-min and 120 \pm 45 nM-min to 575 \pm 36 nM-min and 794 \pm 108 nM-min, respectively; [Figure 5](#), [Table 3](#), and [Supplementary Table S1](#)). On hVSMCs, the addition of APCC resulted in a minor increase in thrombin generation (ETP: from 768 \pm 70 nM-min to 845 \pm 70 nM-min; [Figure 5](#) and [Table 3](#)). However, combining APCC (1 U/mL) with emicizumab (50 μ g/mL) resulted in a massive increase in thrombin generation on each of these 3 cell types. ETP values were 2087 \pm 332 nM-min, 2704 \pm 135 nM-min, and 2623 \pm 39 nM-min for hAECs and TNF α -stimulated hAECs and hVSMCs, respectively. These data confirm that the combination of APCC and emicizumab provokes exaggerated thrombin generation, and that this process may also occur at the surface of vascular cells.

4 | DISCUSSION

We have analyzed the capacity of human aortic vascular cells (smooth muscle cells [hVSMCs] and endothelial cells [hAECs]) to support thrombin generation in the presence of FVIII and/or emicizumab. We observed that independent of the cell type analyzed, low concentrations of FVIII (0.25 U/mL) are more efficient than emicizumab to enhance thrombin generation. Adding emicizumab to FVIII at physiological concentrations (1 U/mL) does not seem to further increase thrombin generation. However, combining emicizumab with APCC resulted in markedly increased thrombin generation, similar as what has previously been observed when using synthetic phospholipid vesicles.

For this study, primary cells were used originating from the aorta, isolated from at least 3 different individuals. Characterization of

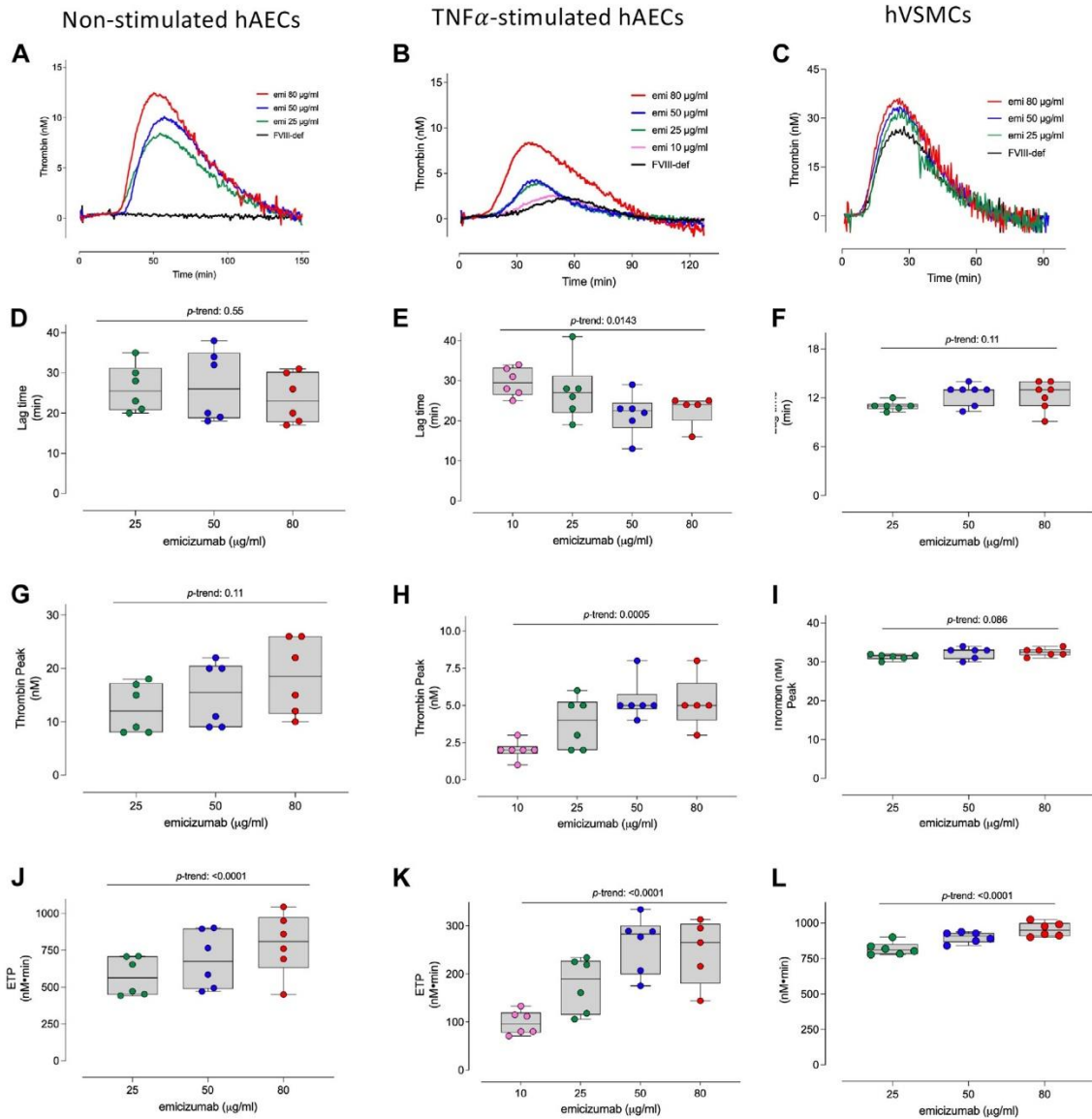


FIGURE 3 Thrombin generation in the presence of emicizumab. Vascular cells (human aortic endothelial cells [hAECs], TNF α -stimulated hAECs, and human aortic vascular smooth muscle cells [hVSMCs]) were incubated with FVIII-deficient plasma (black lines) supplemented or not with various concentrations of emicizumab (Pink: 10 μ g/mL; Green: 25 μ g/mL; Blue: 50 μ g/mL; and Red: 80 μ g/mL) for 5 minutes before initiation of thrombin generation. Thrombin generation was initiated by the addition of CaCl₂, without any other activating agents. (A–C) depict representative thrombograms for each of the conditions tested. (D–F) show the calculated lag-times, (G–I) the calculated thrombin peak and (J–L) the endogenous thrombin potential. P-trend was calculated using a one-way analysis of variance test with trend analysis. Data for FVIII-deficient plasma are similar to those presented in Figure 2.

the hAECs and hVSMCs revealed a clear difference in balance between procoagulant and anticoagulant proteins, with TFPI and thrombomodulin being virtually absent in hVSMCs. The lack of anticoagulant potential was visible when comparing the background thrombin generation using FVIII-deficient plasma: the ETP was 20-fold higher in hVSMCs than in hAECs. These data are illustrative for the

interest of exploring cell-based thrombin generation assays compared to the standard assays that use synthetic phospholipids. The extent of phospholipid exposure and the absence or presence of procoagulant and anticoagulant cellular components may modulate FVIII- and emicizumab-dependent thrombin generation. This was particularly apparent when testing similar TF concentrations (10 pM) in

TABLE 3 Summary of thrombin generation parameters in FVIII-deficient plasma spiked with emicizumab ± FVIII or APCC.

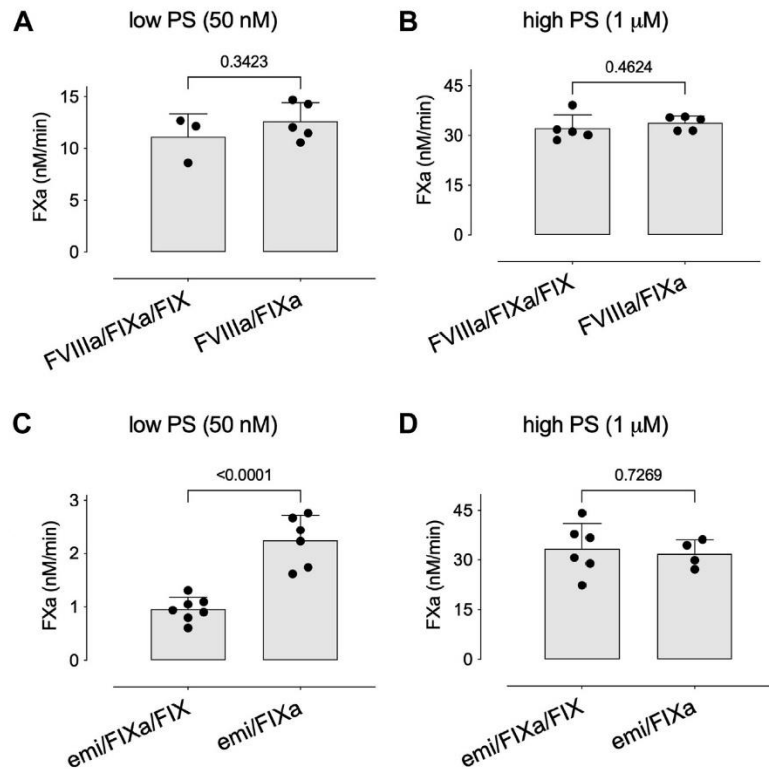
Emicizumab	hVSMCs	hAECs	
		Nonstimulated	TNF α -stimulated
<i>Lag-time, min</i>			
emicizumab (10 μ g/mL)	NT	NT	30 \pm 4 (n = 6)
emicizumab (25 μ g/mL)	11 \pm 1 (n = 6)	26 \pm 6 (n = 6)	27 \pm 7 (n = 6)
emicizumab (50 μ g/mL)	12 \pm 1 (n = 6)	27 \pm 9 (n = 6)	26 \pm 5 (n = 6)
emicizumab (80 μ g/mL)	13 \pm 1 (n = 6)	24 \pm 6 (n = 6)	23 \pm 4 (n = 5)
FVIII (1.0 U/mL) and emicizumab (50 μ g/mL)	12 \pm 1 (n = 6)	14 \pm 3 (n = 6)	13 \pm 1 (n = 6)
APCC (1.0 U/mL) and emicizumab (50 μ g/mL)	8 \pm 1 (n = 6)	7 \pm 1 (n = 6)	6 \pm 1 (n = 6)
<i>Peak height, nM</i>			
emicizumab (10 μ g/mL)	NT	NT	2 \pm 1 (n = 6)
emicizumab (25 μ g/mL)	30 \pm 1 (n = 6)	12 \pm 5 (n = 6)	4 \pm 1 (n = 6)
emicizumab (50 μ g/mL)	32 \pm 1 (n = 6)	15 \pm 6 (n = 6)	5 \pm 1 (n = 6)
emicizumab (80 μ g/mL)	32 \pm 1 (n = 6)	19 \pm 7 (n = 6)	5 \pm 2 (n = 5)
FVIII (1.0 U/mL) and emicizumab (50 μ g/mL)	54 \pm 13 (n = 6)	57 \pm 8 (n = 6)	27 \pm 3 (n = 6)
APCC (1.0 U/mL) and emicizumab (50 μ g/mL)	151 \pm 6 (n = 6)	121 \pm 12 (n = 6)	128 \pm 4 (n = 6)
<i>Endogenous thrombin potential, nM·min</i>			
emicizumab (10 μ g/mL)	NT	NT	99 \pm 25 (n = 6)
emicizumab (25 μ g/mL)	820 \pm 45 (n = 6)	573 \pm 131 (n = 6)	177 \pm 57 (n = 6)
emicizumab (50 μ g/mL)	900 \pm 38 (n = 6)	686 \pm 195 (n = 6)	262 \pm 59 (n = 6)
emicizumab (80 μ g/mL)	955 \pm 50 (n = 6)	793 \pm 211 (n = 6)	247 \pm 68 (n = 5)
FVIII (1.0 U/mL) and emicizumab (50 μ g/mL)	1163 \pm 35 (n = 6)	1355 \pm 217 (n = 6)	713 \pm 74 (n = 6)
APCC (1.0 U/mL) and emicizumab (50 μ g/mL)	2632 \pm 34 (n = 6)	2087 \pm 332 (n = 6)	2704 \pm 135 (n = 6)
<i>Time to peak, min</i>			
emicizumab (10 μ g/mL)	NT	NT	52 \pm 4 (n = 6)
emicizumab (25 μ g/mL)	25 \pm 1 (n = 6)	49 \pm 11 (n = 6)	49 \pm 9 (n = 6)
emicizumab (50 μ g/mL)	27 \pm 1 (n = 6)	48 \pm 13 (n = 6)	43 \pm 7 (n = 6)
emicizumab (80 μ g/mL)	28 \pm 1 (n = 6)	43 \pm 11 (n = 6)	44 \pm 6 (n = 5)
FVIII (1.0 U/mL) and emicizumab (50 μ g/mL)	22 \pm 1 (n = 6)	22 \pm 4 (n = 6)	24 \pm 1 (n = 6)
APCC (1.0 U/mL) and emicizumab (50 μ g/mL)	15 \pm 1 (n = 6)	12 \pm 1 (n = 6)	12 \pm 1 (n = 6)

Mean and SD of values for lag-time, peak height, endogenous thrombin potential, and time to peak are shown. APCC, activated prothrombin complex concentrate; F, factor; hAECs, human aortic endothelial cells; hVSMCs, human aortic vascular smooth muscle cells; NT, not tested.

combination with synthetic phospholipids. FVIII-deficient plasma, FVIII (0.25 or 1 U/mL) and emicizumab, all generated similar amounts of thrombin (Supplementary Table S3). Indeed, there is sufficient TF/FVIIa complex to bypass FIXa-dependent FX activation under these conditions, and cellular anticoagulant components are absent to dampen this process. Together, these data provide insight into how local conditions (the balance between procoagulant and anticoagulant components) within the vascular tree are of relevance to control thrombin generation.

TNF- α -mediated stimulation of hAECs resulted in a 15-fold increase in TF antigen and a 1.8-fold increase in PS-exposure. Nevertheless, thrombin generation remained very low in FVIII-deficient plasma, with peak levels being 3 \pm 1 nM and 4 \pm 1 nM for non-stimulated and TNF- α -stimulated hAECs, respectively. In the absence of FVIII or emicizumab, a minor increase in ETP for the stimulated cells was observed, which is most likely due to the increased phospholipid exposure. Increased phospholipid exposure also allowed for a more sensitive response to different doses of FVIII. In nonstimulated

FIGURE 4 Factor (F) Xa generation by FIXa/FVIIIa and FIXa/emicizumab in the absence or presence of FIX. FX (120 nM) was activated by FIXa (9 nM) in the presence of FVIIIa (0.1 nM; panels A and B) or emicizumab (50 μ g/mL; panels C and D). Mixtures contained phospholipids (PS-equivalent 50 nM for panels A and C or PS-equivalent 1 μ M for panels B and D). FXa generation was performed in the absence or presence of FIX (90 nM). FXa generation was quantified employing the synthetic substrate S-2222.



hAECs (53 ± 20 nM PS-equivalent), no significant difference in thrombin generation parameters were observed between 0.25 and 1.0 U/mL. In contrast, a significant difference in peak height ($P = .006$), ETP ($P = .046$) and time to peak ($P = .0013$) was observed for TNF- α -stimulated hAECs.

Unexpectedly, when FVIII-deficient plasma was spiked with FVIII or emicizumab, thrombin generation on TNF- α -stimulated hAECs was consistently lower than that on nonstimulated hAECs. A potential explanation is that despite the 15-fold increase in TF antigen, TF activity was only minorly increased, from 8 to 10 pM. Indeed, TF can exist in an active or a cryptic nonfunctional form, and it has been reported that the majority of the TF exposed at the cellular surface is in its cryptic conformation [26]. It seems conceivable that the majority of the newly synthesized TF is in its cryptic conformation and does not contribute to coagulation. A second, not mutually exclusive, explanation is that the increased procoagulant potential is compensated by the increased anticoagulant potential by virtue of increased TFPI and thrombomodulin levels. In particular, the increased TFPI availability may interfere with FVIIa and FXa activity on the TNF- α -stimulated hAECs. It is tempting to speculate that the increased anticoagulant potential may exist to avoid exaggerated coagulation to occur under conditions of inflammation.

An intriguing question that came up during the study was whether or not the use aortic endothelial cells would be representative for other endothelial cell types. In particular, expression of

thrombomodulin may differ between tissues, as for instance its expression is particular limited in brain tissue [27]. However, when testing additional endothelial cell types (hUVECs and hMVECs), we observed that not only thrombomodulin levels, but also TFPI, TF, and phosphatidyl-serine exposure was similar to that of hAECs. The thrombomodulin levels being similar is in keeping with a previous report showing that thrombomodulin expression is not controlled by vessel type, but rather that thrombomodulin expression is highest on continuous endothelium and reduced on fenestrated or sinusoidal endothelium [28]. In addition, similar thrombin generation data were observed by using these cells. This suggests that our observations seem to be representative for a large portion of the endothelial cell population throughout the vascular tree.

Under all conditions tested, emicizumab promoted significantly lower thrombin generation than FVIII (25%-150% rFVIII), whether it be on hVSMCs or hAECs (Supplementary Table S2). This seems in contrast to the results obtained using classic thrombin generation assays using synthetic phospholipids in which the addition of emicizumab to hemophilia A plasma nearly or completely normalizes the ETP [20,21]. Classic thrombin generation assays differ from cell-based thrombin generation assays by the absence of cellular components (cell-derived TFPI and thrombomodulin) and the different concentrations of TF and/or FXIa that are used to trigger thrombin generation. It is further important to mention that the PS-equivalent on the vascular cells used in this study is markedly lower than the that in

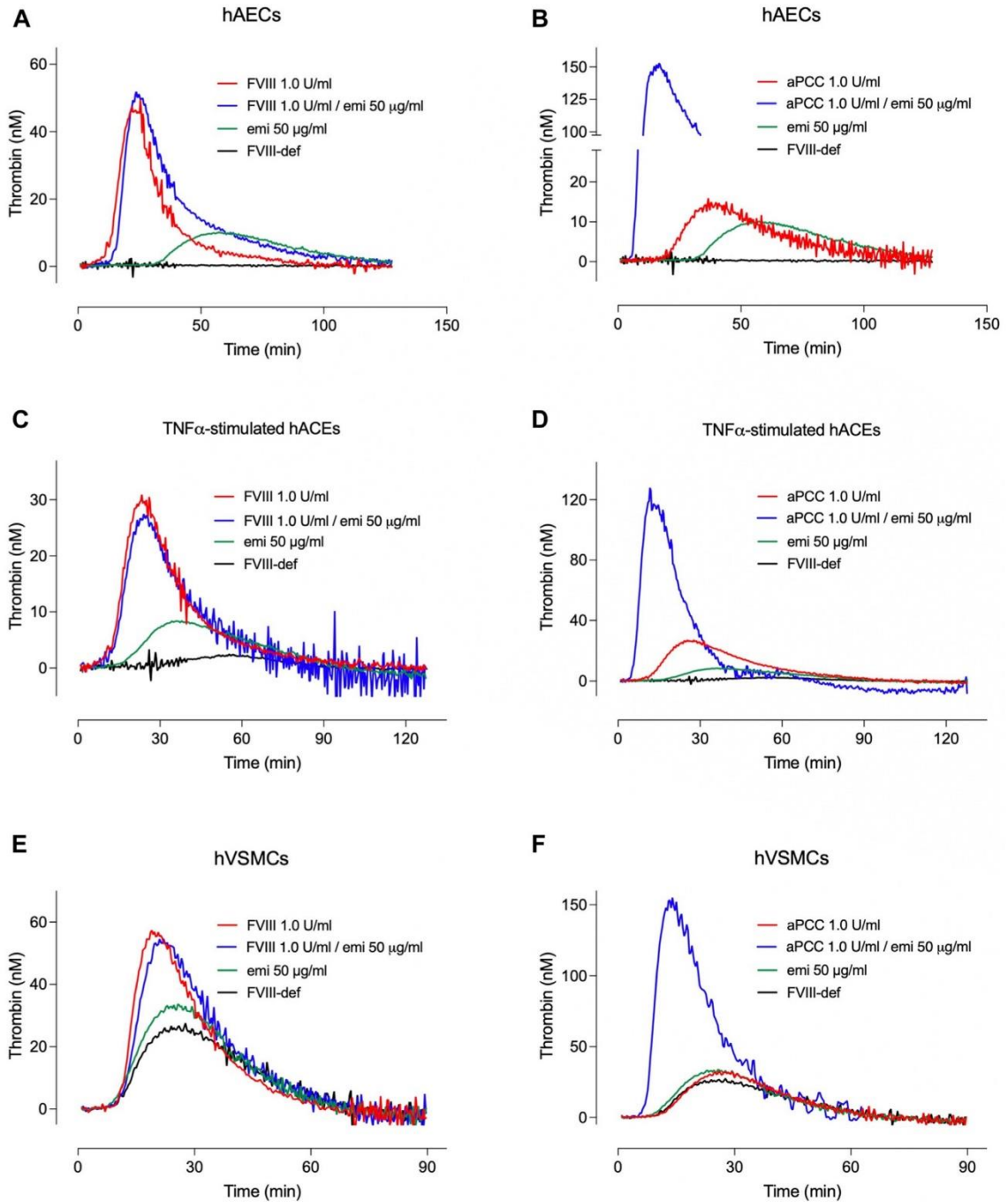


FIGURE 5 Thrombin generation in the presence of emicizumab in combination with FVIII or activated prothrombin complex concentrate (APCC). Vascular cells (human aortic endothelial cells [hAECs], TNF α -stimulated hAECs, and human aortic vascular smooth muscle cells [hVSMCs]) were incubated with FVIII-deficient plasma (black lines) supplemented or not with emicizumab (Green: 50 μ g/mL), FVIII (Red: 1.0 U/mL), APCC (Red: 1 U/mL) or with a combination of emicizumab with FVIII (Blue: 50 μ g/mL and 1.0 U/mL) or emicizumab with APCC (Blue: 50 μ g/mL and 1.0 U/mL). Data for FVIII-deficient plasma, emicizumab, and FVIII were taken from [Figures 2 and 3](#).

regular thrombin generation assays: 30 to 200 nM vs 1.6 μ M, suggesting that the phospholipid surface may become a limiting factor in the formation of the enzyme/substrate complex. Indeed, levels of FIX will exceed those of FIXa (probably in a 10:1 ratio, with FIX levels being 80-100 nM), and the affinities of both for PS-containing phospholipids are 15 to 20 nM [29,30]. It is likely that FIX rather than FIXa will occupy most of the available binding sites in the absence of FVIIIa. In contrast, FIXa binds with higher affinity (about 2 nM) in the presence of FVIIIa (which itself binds phospholipids with an affinity of <1 nM), and will display preferential binding over FIX. In addition, the presence of both FVIIIa and FIXa reduces the affinity of FX for phospholipids about 10-fold [30]. Emicizumab differs from FVIIIa in that it will not enhance binding of FIXa over FIX to the limited phospholipid-surface, which will therefore result in less efficient FXa generation than what is seen in traditional thrombin generation assays. This explanation is supported by our experiments using purified proteins (Figure 5). At low PS-equivalent (50 nM), FIX reduced the efficiency of FIXa/emicizumab-mediated FXa generation but not that of FIXa/FVIIIa-mediated FXa generation. At high PS-equivalent (1 μ M), the presence of FIX did not affect FXa generation by either complex. Similar observations were made when we analyzed thrombin generation under conditions of low and high PS-equivalent (Supplementary table S3).

Several studies have evaluated the effect of APCC on thrombin generation in the presence of emicizumab [19-22,31]. A consistent finding in these studies is the exaggerated thrombin formation when combining emicizumab and APCC. A similar synergistic effect of APCC and emicizumab has also been observed in our study. The mechanism by which APCC enhances emicizumab-mediated thrombin formation could be multiple: First, increased concentrations of the substrate of the prothrombinase-complex, ie, prothrombin, promote thrombin generation [32]. Second, by increasing concentrations of FIX and FX, more ternary complex with emicizumab can be formed [33]. Third, APCC contains substantial concentrations of FIXa, which will also result in higher concentrations of the active ternary complex. One question that is of course relevant to address is whether such synergistic thrombin generation also occurs when combining APCC and emicizumab *in vivo*. Recently, Kizilocak et al. [22] administered APCC (up to 75 U/kg) to hemophilia A patients who were treated with emicizumab. Twenty minutes after infusion, blood samples were taken, and plasma samples were analyzed for thrombin generation. In none of the samples tested, exaggerated thrombin generation was observed, in contrast to samples from the same patients who were spiked with APCC *in vitro* [34]. This can potentially be explained by the rapid elimination of FIXa when infused into the circulation [35]. Not only is FIXa rapidly inhibited by antithrombin but both the FIXa/antithrombin complex and free FIXa are ligands for the clearance-receptor LRP1 [36].

If the FIXa component of APCC is rapidly cleared, how then to explain the development of thrombotic microangiopathy in patients who received APCC in combination with emicizumab? [12] An important difference between the Haven-1 study (in which those complications were first described) and the study by Kizilocak et al.

[22], is that the patients who developed thrombotic microangiopathy not only received higher doses of APCC (100 U/kg) but also multiple doses over a 24-hour period [12]. This may have resulted in an accumulation of FIXa. It should also be noted that not all patients developed such complications, suggesting that perhaps other factors have played a role. In our study, we observed that emicizumab-mediated thrombin generation in the presence of APCC was particularly amplified when using TNF- α -stimulated hAECs (10-fold) compared with nonstimulated hAECs and hVSMCs (both 3-fold). It is possible therefore that an inflammatory status of endothelial cells could have contributed to the amplifying effect of APCC when added to emicizumab.

A limitation of our study is that we have not investigated the role of another anticoagulant component in this study, ie, heparan sulfate proteoglycans, which may promote antithrombin-mediated inhibition of FIXa, FXa, and thrombin. The presence of these molecules may differ between cell types, and thereby their capacity to inhibit the activity of these proteases.

In conclusion, by testing thrombin generation on primary vascular cells, we have found that hAECs that line the aortic wall display a low procoagulant potential, mainly due to the presence of sufficient anticoagulant components, like thrombomodulin and TFPI. This is in line with previous findings that the FIXa/FVIIIa complex plays a little, if any, role in the basal activation of coagulation *in vivo*, but is relevant for thrombin generation upon injury [37]. Furthermore, we show that emicizumab shows lower procoagulant activity than FVIII on non-stimulated- and TNF- α -stimulated hAECs as well as on hVSMCs.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mrs Huguette Louis and Cindy Lerignon for expert technical assistance. We thank the Flow Cytometry Core facility of UMS2008/US40 IBSLor (Université de Lorraine-CNRS-Inserm) for assistance in flow cytometric experiments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.A., C.S., J.L., and V.R. performed experiments; P.L., P.J.L., C.V.D., O.D.C., and V.R. designed and supervised the study; P.J.L. and O.C.D. wrote the manuscript. All authors contributed to the editing of the manuscript.

DECLARATION OF COMPETING INTERESTS

P.J.L. receives research funding to the institute from Hoffman-Laroche Ltd, Institut Roche, Pfizer, Sanofi, and Sobi. The other authors declare no conflict of interest.

TWITTER

Peter J. Lenting  @LentingPeter
Cécile V. Denis  @InsermU1176

REFERENCES

- [1] Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet*. 2003;361:1801-9.

- [2] Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, Riske B, Hacker MR, Kilcoyne R, Ingram JD, Manco-Johnson ML, Funk S, Jacobson L, Valentino LA, Hoots WK, Buchanan GR, DiMichele D, Recht M, Brown D, Leissing C, Bleak S, Cohen A, Mathew P, et al. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. *N Engl J Med.* 2007;357:535–44.
- [3] Gouw SC, van der Bom JG, Ljung R, Escuriola C, Cid AR, Claeysens-Donadel S, van Geet C, Kenet G, Mäkiperna A, Molinari AC, Muntean W, Kobelt R, Rivard G, Santagostino E, Thomas A, van den Berg HM, PedNet and RODIN Study Group. Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *New Engl J Med.* 2013;368:231–9.
- [4] Peyvandi F, Mannucci PM, Garagiola I, El-Beshlawy A, Elalfy M, Ramanan V, Eshghi P, Hanagavadi S, Varadarajan R, Karimi M, Manglani MV, Ross C, Young G, Seth T, Apte S, Nayak DM, Santagostino E, Mancuso ME, Sandoval Gonzalez AC, Mahlangu JN, et al. A randomized trial of factor VIII and neutralizing antibodies in hemophilia A. *N Engl J Med.* 2016;374:2054–64.
- [5] Ewing N, Escuriola-Ettingshausen C, Kreuz W. Prophylaxis with FEIBA in paediatric patients with haemophilia A and inhibitors. *Haemophilia.* 2015;21:358–64.
- [6] Ju HY, Jang HL, Park YS. The efficacy of bypassing agents in surgery of hemophilia patients with inhibitors. *Blood Res.* 2015;50:173–8.
- [7] Sehgal A, Barros S, Ivanciu L, Cooley B, Qin J, Racie T, Hettlinger J, Carioto M, Jiang Y, Brodsky J, Prabhala H, Zhang X, Attarwala H, Hutabarat R, Foster D, Milstein S, Charisse K, Kuchimanchi S, Maier MA, Nechev L, et al. An RNAi therapeutic targeting anti-thrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nat Med.* 2015;21:492–7.
- [8] Chowdary P. Anti-tissue factor pathway inhibitor (TFPI) therapy: a novel approach to the treatment of haemophilia. *Int J Hematol.* 2020;111:42–50.
- [9] Polderdijk SGI, Baglin TP, Huntington JA. Targeting activated protein C to treat hemophilia. *Curr Opin Hematol.* 2017;24:446–52.
- [10] Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, Muto A, Kojima T, Soeda T, Yoshihashi K, Okuyama-Nishida Y, Saito H, Tsunoda H, Suzuki T, Adachi H, Miyazaki T, Ishii S, Kamata-Sakurai M, Iida T, Harada A, Esaki K, Funaki M, Moriyama C, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med.* 2012;18:1570–4.
- [11] Østergaard H, Lund J, Greisen PJ, Kjellerv S, Henriksen A, Lorenzen N, Johansson E, Røder G, Rasch MG, Johnsen LB, Egebjerg T, Lund S, Rahbek-Nielsen H, Gandhi PS, Lamberth K, Loftager M, Andersen LM, Bonde AC, Staveniuter F, Madsen DE, et al. A factor VIIIa-mimetic bispecific antibody, Mim8, ameliorates bleeding upon severe vascular challenge in hemophilia A mice. *Blood.* 2021;138:1258–68.
- [12] Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B, Schmitt C, Callaghan MU, Young G, Santagostino E, Kruse-Jarres R, Negrier C, Kessler C, Valente N, Asikanius E, Levy GG, Windyga J, Shima M. Efficacy of emicizumab prophylaxis in Hemophilia A with inhibitors. *N Engl J Med.* 2017;377:809–18.
- [13] Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, Negrier C, Niggli M, Mancuso ME, Schmitt C, Jiménez-Yuste V, Kempton C, Dhalluin C, Callaghan MU, Bujan W, Shima M, Adamkewicz JI, Asikanius E, Levy GG, Kruse-Jarres R. Efficacy of emicizumab prophylaxis in patients who have hemophilia A without inhibitors. *N Engl J Med.* 2018;379:811–22.
- [14] Pipe SW, Shima M, Lehle M, Shapiro A, Chebon S, Fukutake K, Key NS, Portron A, Schmitt C, Podolak-Dawidziak M, Selak Bienz N, Hermans C, Campinha-Bacote A, Kiialainen A, Peerlinck K, Levy GG, Jiménez-Yuste V. Efficacy, safety, and pharmacokinetics of emicizumab prophylaxis given every 4 weeks in people with hemophilia A (HAVEN 4): a multicentre, open-label, non-randomised phase 3 study. *Lancet Haematol.* 2019;6:e295–305.
- [15] Young G, Liesner R, Chang T, Sidonio R, Oldenburg J, Jiménez-Yuste V, Mahlangu J, Kruse-Jarres R, Wang M, Uguen M, Doral MY, Wright LY, Schmitt C, Levy GG, Shima M, Mancuso ME. A multicenter, open-label phase 3 study of emicizumab prophylaxis in children with hemophilia A with inhibitors. *Blood.* 2019;134:2127–38.
- [16] Oldenburg J, Mahlangu JN, Bujan W, Trask P, Callaghan MU, Young G, Asikanius E, Peyvandi F, Santagostino E, Kruse-Jarres R, Negrier C, Kessler C, Xu J, Windyga J, Shima M, von Mackensen S. The effect of emicizumab prophylaxis on health-related outcomes in persons with haemophilia A with inhibitors: HAVEN 1 Study. *Haemophilia.* 2019;25:33–44.
- [17] Lenting PJ. Laboratory monitoring of hemophilia A treatments: new challenges. *Blood Adv.* 2020;4:2111–8.
- [18] Peyvandi F, Oldenburg J, Friedman KD. A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. *J Thromb Haemost.* 2016;14:248–61.
- [19] Schultz NH, Glosli H, Bjornsen S, Holme PA. The effect of emicizumab and bypassing agents in patients with hemophilia - an in vitro study. *Res Pract Thromb Haemost.* 2021;5:e12561.
- [20] Bravo MI, Raventos A, Perez A, Costa M, Willis T. Non-additive effect on thrombin generation when a plasma-derived factor VIII/von Willebrand factor (FVIII/VWF) is combined with emicizumab in vitro. *J Thromb Haemost.* 2020;18:1934–9.
- [21] Dargaud Y, Lienhart A, Janbain M, Le Quellec S, Enjolras N, Negrier C. Use of thrombin generation assay to personalize treatment of breakthrough bleeds in a patient with hemophilia and inhibitors receiving prophylaxis with emicizumab. *Haematologica.* 2018;103:e181–3.
- [22] Kizilocak H, Marquez-Casas E, Phei Wee C, Malvar J, Carmona R, Young G. Comparison of bypassing agents in patients on emicizumab using global hemostasis assays. *Haemophilia.* 2021;27:164–72.
- [23] Mao X, Said R, Louis H, Max JP, Bourhim M, Challande P, Wahl D, Li Z, Regnault V, Lacolley P. Cyclic stretch-induced thrombin generation by rat vascular smooth muscle cells is mediated by the integrin α v β 3 pathway. *Cardiovasc Res.* 2012;96:513–23.
- [24] Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypo-coagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002;32:249–53.
- [25] Hartmann R, Feenstra T, Valentino L, Dockal M, Scheiflinger F. In vitro studies show synergistic effects of a procoagulant bispecific antibody and bypassing agents. *J Thromb Haemost.* 2018.
- [26] Rao LV, Kothari H, Pendurthi UR. Tissue factor encryption and decryption: facts and controversies. *Thromb Res.* 2012;129:S13–7.
- [27] Maruyama I, Bell CE, Majerus PW. Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J Cell Biol.* 1985;101:363–71.
- [28] Ford VA, Stringer C, Kennel SJ. Thrombomodulin is preferentially expressed in Balb/c lung microvessels. *J Biol Chem.* 1992;267:5446–50.
- [29] Mertens K, Cupers R, Van Wijngaarden A, Bertina RM. Binding of human blood-coagulation Factors IXa and X to phospholipid membranes. *Biochem J.* 1984;223:599–605.
- [30] Panteleev MA, Ananyeva NM, Greco NJ, Ataullakhanov FI, Saenko EL. Factor VIIIa regulates substrate delivery to the intrinsic factor X-activating complex. *FEBS J.* 2006;273:374–87.
- [31] De Meyer SF, Andersson T, Baxter B, Bendszus M, Brouwer P, Brinjikji W, Campbell BC, Costalat V, Dávalos A, Demchuk A, Dippel D, Fiehler J, Fischer U, Gilvarry M, Gounis MJ, Gralla J, Jansen O, Jovin T, Kallmes D, Khatri P, et al. Analyses of thrombi in acute ischemic stroke: a consensus statement on current knowledge and future directions. *Int J Stroke.* 2017;12:606–14.

- [32] Allen GA, Wolberg AS, Oliver JA, Hoffman M, Roberts HR, Monroe DM. Impact of procoagulant concentration on rate, peak and total thrombin generation in a model system. *J Thromb Haemost.* 2004;2:402–13.
- [33] Kitazawa T, Esaki K, Tachibana T, Ishii S, Soeda T, Muto A, Kawabe Y, Igawa T, Tsunoda H, Nogami K, Shima M, Hattori K. Factor VIIIa-mimetic cofactor activity of a bispecific antibody to factors IX/IXa and X/Xa, emicizumab, depends on its ability to bridge the antigens. *Thromb Haemost.* 2017;117:1348–57.
- [34] Harkins Druzgal C, Kizilocak H, Brown J, Sennett M, Young G. Neutralizing antidrug antibody to emicizumab in a patient with severe hemophilia A with inhibitors: new case with detailed laboratory evaluation. *J Thromb Haemost.* 2020;18:2205–8.
- [35] Fuchs HE, Trapp HG, Griffith MJ, Roberts HR, Pizzo SV. Regulation of factor IXa in vitro in human and mouse plasma and in vivo in the mouse. Role of the endothelium and the plasma proteinase inhibitors. *J Clin Invest.* 1984;73:1696–703.
- [36] Neels JG, van Den Berg BM, Mertens K, ter Maat H, Pannekoek H, van Zonneveld AJ, Lenting PJ. Activation of factor IX zymogen results in exposure of a binding site for low-density lipoprotein receptor-related protein. *Blood.* 2000;96:3459–65.
- [37] Bauer KA, Mannucci PM, Gringeri A, Tradati F, Barzegar S, Kass BL, ten Cate H, Kestin AS, Brettler DB, Rosenberg RD. Factor IXa-factor VIIIa-cell surface complex does not contribute to the basal activation of the coagulation mechanism in vivo. *Blood.* 1992;79:2039–47.

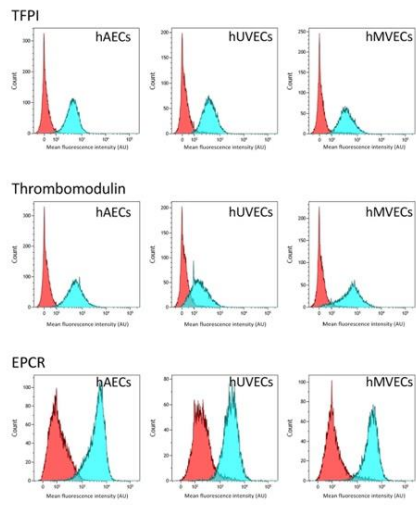
SUPPLEMENTARY MATERIAL

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1016/j.jtha.2023.09.017>

Supplementary materials

Thrombin generation on vascular cells in the presence of factor VIII and/or emicizumab.

Sénadé Atsou *et al.*



Supplementary Figure S1: Cell-surface expression of TFPI, thrombomodulin and EPCR on different endothelial cells

Cell-surface expression of Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), Thrombomodulin (TM) and Endothelial Protein C-Receptor (EPCR) on human aortic endothelial cells (hAECs), human umbilical vein endothelial cells (hUVECs) and human dermal microvascular endothelial cells (hMVECs) was determined by flow cytometry. Shown are representative flow cytograms of 3-5 analyses. Red cytograms represent cells incubated with isotype-control antibodies, and blue cytograms represent cells incubated with TFPI-, TM- or EPCR-specific antibodies

Supplementary Table S1 : Thrombin generation on different endothelial cells

	hAECs	hUVECs	hMVECs
<i>Lag time, min</i>			
FVIII deficient plasma	30 ± 4 (n=4)	35 ± 1 (n=3)	32 ± 1 (n=3)
+ FVIII (0.25 U/ml)	15 ± 4 (n=6)	14 ± 1 (n=3)	13 ± 1 (n=3)
+ FVIII (1.0 U/ml)	12 ± 2 (n=6)	12 ± 1 (n=3)	13 ± 1 (n=3)
+ emicizumab (50 µg/ml)	27 ± 9 (n=6)	25 ± 1 (n=3)	27 ± 1 (n=3)
+ FVIII (1.0 U/ml) + emicizumab (50 µg/ml)	14 ± 3 (n=6)	12 ± 1 (n=3)	13 ± 1 (n=3)
+ APCC (1 U/ml) + emicizumab (50 µg/ml)	7 ± 1 (n=6)	7 ± 1 (n=3)	5 ± 1 (n=3)
<i>Peak height, nM</i>			
FVIII deficient plasma	4 ± 1 (n=4)	1 ± 1 (n=3)	5 ± 1 (n=3)
+ FVIII (0.25 U/ml)	42 ± 10 (n=6)	38 ± 1 (n=3)	16 ± 1 (n=3)
+ FVIII (1.0 U/ml)	58 ± 16 (n=6)	60 ± 3 (n=3)	25 ± 2 (n=3)
+ emicizumab (50 µg/ml)	15 ± 6 (n=6)	17 ± 1 (n=3)	10 ± 1 (n=3)
+ FVIII (1.0 U/ml) + emicizumab (50 µg/ml)	57 ± 8 (n=6)	40 ± 1 (n=3)	22 ± 1 (n=3)
+ APCC (1 U/ml) + emicizumab (50 µg/ml)	121 ± 12 (n=6)	124 ± 3 (n=3)	110 ± 2 (n=3)
<i>Endogenous Thrombin Potential, nM·min</i>			
FVIII deficient plasma	35 ± 9 (n=4)	18 ± 1 (n=3)	44 ± 3 (n=3)
+ FVIII (0.25 U/ml)	1022 ± 191 (n=6)	925 ± 37 (n=6)	467 ± 4 (n=6)
+ FVIII (1.0 U/ml)	1085 ± 187 (n=6)	1011 ± 16 (n=3)	555 ± 23 (n=3)
+ emicizumab (50 µg/ml)	686 ± 195 (n=6)	641 ± 12 (n=3)	335 ± 7 (n=3)
+ FVIII (1.0 U/ml) + emicizumab (50 µg/ml)	1355 ± 217 (n=6)	1314 ± 46 (n=3)	543 ± 16 (n=3)
+ APCC (1 U/ml) + emicizumab (50 µg/ml)	2087 ± 332 (n=6)	1952 ± 38 (n=3)	1634 ± 25 (n=3)
<i>Time to Peak, min</i>			
FVIII deficient plasma	57 ± 4 (n=4)	64 ± 1 (n=3)	44 ± 1 (n=3)
+ FVIII (0.25 U/ml)	26 ± 5 (n=6)	26 ± 1 (n=3)	30 ± 1 (n=3)
+ FVIII (1.0 U/ml)	21 ± 4 (n=6)	20 ± 1 (n=3)	24 ± 1 (n=3)
+ emicizumab (50 µg/ml)	48 ± 13 (n=6)	48 ± 1 (n=3)	37 ± 1 (n=3)
+ FVIII (1.0 U/ml) + emicizumab (50 µg/ml)	1355 ± 217 (n=6)	23 ± 1 (n=3)	23 ± 1 (n=3)
+ APCC (1 U/ml) + emicizumab (50 µg/ml)	2087 ± 332 (n=6)	13 ± 1 (n=3)	11 ± 1 (n=3)

Mean and standard deviation (SD) of values for Lag time, Peak Height, Endogenous Thrombin Potential, and Time to Peak are shown. hAECs: human aortic endothelial cells; hUVECs: human umbilical endothelial cells; hMVECs: human dermal microvascular endothelial cells.

Supplementary Table S2: Comparing FVIII (0.25 U/ml) and emicizumab (50 µg/ml)

	FVIII (0.25 U/ml)	emicizumab (50 µg/ml)	p-value*
<i>hVSMCs</i>			
Lag-time (min)	12 ± 1	12 ± 1	1.0
Peak height (nM)	45 ± 1	32 ± 1	<0.0001
ETP (nM·min)	1099 ± 35	900 ± 38	<0.0001
Time to Peak (min)	24 ± 1	27 ± 1	0.0004
<i>hAECs</i>			
Lag-time (min)	15 ± 4	27 ± 9	0.014
Peak height (nM)	42 ± 10	15 ± 6	0.0002
ETP (nM·min)	1022 ± 191	686 ± 195	0.013
Time to Peak (min)	26 ± 5	48 ± 13	0.0031
<i>Activated hAECs</i>			
Lag-time (min)	14 ± 1	26 ± 5	0.0002
Peak height (nM)	20 ± 3	5 ± 1	<0.0001
ETP (nM·min)	574 ± 97	262 ± 59	<0.0001
Time to Peak (min)	28 ± 1	43 ± 7	0.0004

Multiple unpaired t-testing was performed via GraphPad Prism version 10 for MacOS using the two-stage set-up method.

Supplementary Table S3: Thrombin generation using TF and synthetic phospholipids

	TF 1 pM		TF 10 pM	
	PS 50 nM	PS 1 μM	PS 50 nM	PS 1 μM
<i>Lag time, min</i>				
FVIII deficient plasma	18.1 ± 3.7 (n=3)	7.3 ± 0.7 (n=3)	2.1 ± 0.0 (n=3)	1.7 ± 0.0 (n=3)
+ FVIII (0.25 U/ml)	6.1 ± 0.2 (n=3)	5.9 ± 0.2 (n=3)	1.4 ± 0.0 (n=3)	1.3 ± 0.0 (n=3)
+ FVIII (1.0 U/ml)	5.3 ± 0.5 (n=3)	4.3 ± 0.3 (n=3)	1.7 ± 0.2 (n=3)	1.3 ± 0.2 (n=3)
+ emicizumab (50 μg/ml)	16.4 ± 5.3 (n=3)	8.1 ± 0.3 (n=3)	2.4 ± 0.3 (n=3)	2.0 ± 0.0 (n=3)
<i>Peak height, nM</i>				
FVIII deficient plasma	1.9 ± 0.6 (n=3)	11 ± 1 (n=3)	57 ± 3 (n=4)	350 ± 8 (n=4)
+ FVIII (0.25 U/ml)	24.8 ± 1.9 (n=3)	170 ± 10 (n=3)	126 ± 3 (n=6)	426 ± 1 (n=6)
+ FVIII (1.0 U/ml)	51.9 ± 1.3 (n=3)	241 ± 18 (n=3)	146 ± 10 (n=6)	480 ± 18 (n=6)
+ emicizumab (50 μg/ml)	4.2 ± 1.7 (n=3)	101 ± 6 (n=3)	46 ± 7 (n=6)	276 ± 73 (n=6)
<i>Endogenous Thrombin Potential, nM·min</i>				
FVIII deficient plasma	57 ± 17 (n=3)	226 ± 34 (n=3)	887 ± 34 (n=3)	1500 ± 44 (n=3)
+ FVIII (0.25 U/ml)	496 ± 34 (n=3)	1335 ± 24 (n=3)	1074 ± 17 (n=3)	1573 ± 55 (n=3)
+ FVIII (1.0 U/ml)	988 ± 17 (n=3)	1374 ± 20 (n=3)	1146 ± 38 (n=3)	1639 ± 76 (n=3)
+ emicizumab (50 μg/ml)	119 ± 48 (n=3)	1308 ± 19 (n=3)	827 ± 54 (n=3)	1405 ± 156 (n=3)
<i>Time to Peak, min</i>				
FVIII deficient plasma	36.8 ± 1.3 (n=3)	25.0 ± 0.7 (n=3)	8.2 ± 0.2 (n=3)	3.7 ± 0.0 (n=3)
+ FVIII (0.25 U/ml)	18.1 ± 0.4 (n=3)	10.1 ± 0.2 (n=3)	4.7 ± 0.2 (n=3)	3.0 ± 0.0 (n=3)
+ FVIII (1.0 U/ml)	13.3 ± 0.7 (n=3)	7.4 ± 0.4 (n=3)	4.4 ± 0.3 (n=3)	2.7 ± 0.0 (n=3)
+ emicizumab (50 μg/ml)	34.4 ± 0.7 (n=3)	16.0 ± 0.5 (n=3)	10.8 ± 1.9 (n=3)	4.7 ± 0.7 (n=3)

Mean and standard deviation (SD) of values for Lag time, peak height, Endogenous Thrombin Potential, and time to peak are shown.

Discussion générale

A) Caractérisation des mécanismes responsables du déficit en FX de la coagulation dans l'amylose à chaînes légères

Dans l'amylose AL, à la différence du myélome, la maladie est directement induite par la présence de la chaîne légère de l'immunoglobuline monoclonale circulante. L'objectif du traitement est de minimiser la production de cette chaîne légère amyloïdogène de manière aussi profonde, rapide et durable que possible afin de retarder la fibrillogénèse et la formation d'amyloïde. L'adsorption du FX sur les dépôts amyloïdes est souvent évoquée pour expliquer la présence du déficit en FX dans le cadre de l'amylose AL. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons suivi 3 patients atteints d'amylose AL dont deux présentaient un déficit en FX au diagnostic et le troisième un taux de FX à 73% considéré normal. Nous avons également observé la corrélation entre les réponses hématologiques et les fluctuations de l'activité FX après le traitement chimio-thérapeutique chez chacun des 3 patients.

1. Traitement et évolution des taux de chaînes légères libres et des taux de FX des patients avec amylose AL

Tous les patients de cette étude ont reçu en première intention la trithérapie CyborD. Cette combinaison est connue pour réduire la production des chaînes légères anormales en ciblant les plasmocytes de la moelle osseuse. Elle a effectivement induit une réponse hématologique chez les 3 patients de cette étude, avec une efficacité variable d'un individu à l'autre, comme reporté dans la littérature.³⁰² Dans tous les cas son efficacité a été transitoire (Figures 1/2/3, chapitre 1). Le suivi des patients par le centre de référence de l'amylose AL a permis ensuite de mettre en place un traitement individualisé pour chaque patient adapté à leurs besoins en fonction de leur condition et d'autres facteurs qui sortent du cadre de cette étude. Ainsi la thérapie initiale a été avantageusement remplacée par d'autres schémas thérapeutiques, tels que l'association Daratumumab, Lenalidomide et Dexaméthasone pour le patient 1, ou BorD et Lenalidomide pour le patient 2, et BorD combiné au Daratumumab et Venetoclax pour le patient 3. Cela s'est traduit par l'observation d'une réduction jusqu'à la normalisation sur au moins 2 ans des taux circulants des chaînes légères pathogènes. Cette observation permet ainsi de conclure à la destruction du clone lympho-plasmocytaire produisant les chaînes légères pathogènes. Il semble prématuré cependant de déclarer que cette destruction a été

définitive et complète chez les 3 patients, notamment pour le patient 1 où il semble que les taux de chaînes légères remontent après 2 ans de taux normaux (Figure 1, chapitre 1). En ce qui concerne le FX, on a observé que l'amélioration de son taux chez les deux patients présentant un déficit au diagnostic n'a été détectée qu'environ 12 mois après l'obtention d'une réponse hématologique effective (Figure 1, chapitre 1). Chez le patient 1, le taux de FX a été normalisé au bout de 18 mois tandis que chez la patiente 2 malgré une réponse hématologique profonde et étendue sur la durée, le taux de FX est toujours dans l'amélioration mais peine à atteindre des valeurs normales. Ces résultats montrent que l'augmentation du taux de FX chez ces 2 patients ne résulte pas immédiatement de la réponse hématologique mais semble plutôt être associée à la réponse des organes, qui se manifeste bien plus tard. Il serait donc pertinent de disposer et de suivre l'évolution de données biologiques permettant d'évaluer l'état clinique des organes atteints par les dépôts amyloïdes et de déterminer s'ils évoluent dans la même temporalité que les taux de FX. Dans plusieurs approches thérapeutiques pour traiter l'amylose AL il a été observé une augmentation de l'activité de FX ^{268,277-280,303,304} Cependant, c'est très souvent que dans une petite proportion de patients qu'un test d'activité FX est fait après une thérapie anti-plasmocytaire. De ce fait, l'association entre les changements de l'activité FX et les résultats du traitement a rarement été explorée. Nous proposons que cela soit plus régulièrement fait tout au long de la prise en charge. Récemment une analyse rétrospective de la sorte a été effectuée à partir d'une cohorte consécutive de 207 patients Chinois atteints d'amylose AL avec un déficit en FX présent chez 129 patients (62,3 %). ²⁷⁰ Nos résultats sont en accord avec ceux observés dans cette étude où il est conclu qu'une amélioration de l'activité FX tends à apparaître chez les patients qui répondent le mieux au niveau des organes et de la réponse hématologique. Cependant, comme dans nos résultats il manque dans cette étude les données permettant d'établir la chronologie de la réponse des organes et des changements de taux de FX.

2. Le FX est présent dans les plaques amyloïdes de patients atteints d'amylose AL

Afin de démontrer que la diminution des taux de FX au diagnostic des patients 1 et 2 était bien associé une adsorption de la protéine sur les plaques amyloïdes, nous avons analysé en

immunofluorescence les biopsies ayant permis le diagnostic d'amylose AL des patients. Nous avons procédé à la coloration au Rouge Congo des coupes puis au marquage du FX et à celui de la chaîne légère sur des coupes en série. Le Rouge Congo étant spécifique des dépôts fibrillaires, son marquage nous permet d'identifier sur des coupes en série, les régions positives au Rouge Congo (RC+) et donc affectés par des dépôts amyloïdes et des régions RC- qui ne sont pas attaqués par les dépôts fibrillaires de chaîne légère. Nos résultats montrent tout d'abord une désorganisation structurelle des régions de la coupe affectée par les dépôts amyloïdes (Figures 4A, 5A et B, 6A et B). Ensuite, l'analyse des intensités de fluorescence du signal de la chaîne légère et du FX nous ont permis de conclure à l'enrichissement significatif du signal du FX dans les régions RC+ (Figures 4D, 5C et F, 6C et G, chapitre 1). Cet enrichissement semble associé à l'augmentation du signal de la chaîne légère dans la même région, conduisant ainsi à l'observation d'une colocalisation significativement plus élevée des 2 protéines dans les régions RC+ par rapport aux régions négatives RC- (Figures 4E, 5D et G, 6H, chapitre 1) Ce résultat est valable pour les deux patients présentant un déficit en FX. Il confirme le résultat de la seule étude ayant spécifiquement identifié le FX sur des biopsies d'un patient décédé des complications de son amylose AL avec déficit sévère en FX (2%)²⁷⁹ en démontrant que la présence du FX dans les dépôts amyloïdes résulte de son adsorption sur ces structures, ce qui conduit au déficit observé. Notre étude permet d'aller plus loin en comparant la colocalisation entre les régions attaquées par les dépôts amyloïdes et les régions indemnes et renforce la conclusion selon laquelle l'adsorption du FX sur les dépôts amyloïdes est un des mécanismes probablement majeurs conduisant au déficit en FX observé chez ces patients. Deux autres mécanismes potentiels susceptibles d'expliquer en partie un déficit en FX ont été écartés. Tout d'abord, une atteinte hépatique qui aurait pu perturber les taux de production de FX. Cependant, lors du diagnostic, des taux normaux de facteur V et de prothrombine ont été mesurés (voir tableau I, chapitre 1), ce qui suggère que la fonction hépatique est préservée pour ces deux protéines produites par le foie. Ensuite, la présence d'un inhibiteur du FX dans le plasma des patients aurait pu expliquer les taux abaissés de FX coagulant mesurés. Nous avons procédé au dosage par ELISA des taux de FX circulant dans le plasma de la patiente 2, mais nous

n'avons observé aucune différence avec les taux de FX coagulant. De plus, aucun des plasmas des patients n'a révélé la présence d'anticorps reconnaissant le FX.

De manière particulièrement intéressante, notre étude révèle que bien que la présence de FX dans les dépôts amyloïdes soit généralement associée à un déficit en FX, ce n'est pas le cas chez le patient 3. En effet, bien que le taux de FX de ce patient soit normal, à 73%, il présente une colocalisation significative du FX avec les dépôts amyloïdes dans sa graisse abdominale (Figure 6H, chapitre 1). Il est à noter que dans la glande salivaire de ce patient, aucune colocalisation significative n'a été mesurée malgré de grandes étendues de dépôts amyloïdes. Dans sa graisse abdominale, les zones de colocalisation du FX avec les dépôts amyloïdes sont restreintes. L'observation du signal de la chaîne légère montre un marquage plus diffus et laisse suggérer des dépôts diffus présents sur toute la coupe mais pas en amas intenses. L'adsorption du FX par les dépôts amyloïdes semble étroitement liée à l'organisation structurale de ces dépôts, laquelle dépend à son tour de divers éléments, vraisemblablement interdépendants. Parmi ces éléments figurent probablement la séquence et la quantité de la chaîne légère impliquée, ainsi que les composants de l'organe (cellules, matrice extracellulaire, etc.) dans lequel se trouve le dépôt.

Notre étude présente certaines limites qu'il convient de souligner. Tout d'abord, notre ensemble de données est constitué d'un nombre restreint de biopsies provenant d'un échantillon limité de patients, une situation inhérente à ce type d'étude. La sélection de patients s'est limitée à ceux pour lesquels une quantité suffisante de biopsies était disponible pour nos analyses microscopiques, ainsi que pour lesquels des dosages de FX et de chaînes légères couvrant une fréquence et une durée nécessaires à une analyse approfondie étaient disponibles, et ce, dans des conditions comparables. Idéalement, notre étude aurait bénéficié de l'inclusion de plasmas et de sérums prélevés à divers moments, permettant ainsi de reproduire les dosages dans des conditions similaires. En prenant en compte ces limitations, il devient évident qu'une étude plus exhaustive, avec une collecte de données plus étendue et une bonne traçabilité des informations cliniques, serait nécessaire pour confirmer et étendre nos conclusions.

En conclusion, nous confirmons la présence spécifique du FX sur les dépôts amyloïdes de chaînes légères dans le contexte d'un déficit en FX sur tableau d'amylose AL. Il est important de noter que cette présence pourrait également être observée en l'absence d'un déficit significatif en FX. De ce fait, le FX pourrait potentiellement être un marqueur pour le suivi des patients atteints d'amylose AL, offrant ainsi une piste prometteuse pour l'amélioration du diagnostic, de la surveillance et de la gestion de la maladie.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons cherché à étudier les mécanismes biochimiques pouvant conduire au déficit en FX de la coagulation dans l'amylose AL. Nous avons produit deux chaînes légères recombinantes à partir de séquences ADNc de deux patients atteints de l'amylose AL. L'amylose AL est caractérisée par une variabilité importante dans la séquence des chaînes légères impliquées et cette variabilité conduit à une organisation structurale propre à chaque chaîne légère, ce qui conduit de facto à une pluralité dans les symptômes. Il était donc important de travailler sur les chaînes légères issues de séquences de patients afin de relier dans la mesure du possible les résultats in vitro aux réalités biologiques dosées et observées chez les patients.

3. Production des chaînes légères recombinantes

Pour produire des chaînes légères de manière efficace nous avons adopté un système procaryote privilégiant un adressage de la protéine d'intérêt vers un compartiment cellulaire propice à une formation adéquate des ponts disulfures. Cette approche vise à permettre l'extraction de la protéine dans des conditions relativement ménagées évitant ainsi la dénaturation, ainsi que les étapes ultérieures de renaturation. Ce système d'expression nous permettait d'éviter d'introduire toute distorsion artificielle de la structure tridimensionnelle des protéines, qui aurait pu biaiser les résultats biologiques obtenus ultérieurement. Cependant, ce système a présenté des inconvénients, notamment des rendements de production relativement faibles, nécessitant un investissement conséquent en termes de temps et d'efforts pour son optimisation. Les difficultés de la mise au point des conditions de production ont mis en évidence l'importance de la spécificité structurale de chaque séquence sur les rendements de production. Il est apparu nécessaire de développer des conditions de

culture bactérienne adaptées à chaque chaîne légère, même lorsque celles-ci partagent le même isotype. Ces observations suggèrent une organisation post traductionnelle différente d'une chaîne légère à l'autre, nécessitant des conditions spécifiques pour leur expression au niveau périplasmique.

4. Interaction de Ma-LC avec le FX

Grâce aux chaînes légères produites nous avons mis en évidence par différentes approches une interaction spécifique entre le FX et une chaîne légère soluble (Figures 12 et 13, chapitre 2). Les paramètres mesurés de cette interaction par résonance plasmonique de surface, ($k_{off} = 3,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; $k_{on} = 5,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; $K_D = 620 \text{ nM}$) et les concentrations élevées de chaînes légères libres circulantes chez le patient Ma, suggèrent qu'une telle interaction est possible dans la circulation sanguine avant que ces 2 protéines se retrouvent dans les dépôts fibrillaires et que le complexe formé entre les 2 protéines est stable. C'est à ce jour un résultat inédit qui a notre connaissance n'a jamais été mis en évidence. Nous avons ainsi montré pour la première fois, que la chaîne légère d'un patient (Ma-LC) présentant un déficit en FX interagit en solution dans les conditions de système purifié avec le FX. Dans les mêmes conditions, la chaîne légère issue du patient (Sa-LC) sans déficit en FX ne reconnaît pas le FX (Figures 12 et 13, chapitre 2). Ce résultat rappelle les travaux de Furie²⁶⁶ qui en 1981, avait montré la fixation du FX sur une colonne chargée de chaînes légères extraites de biopsies. Cependant, notre étude se distingue par le fait qu'elle met en jeu des chaînes légères produites de manière recombinante dans un système bactérien qui sont purifiées et solubles. En outre, en confirmant l'interaction entre une chaîne légère et le FX dans un contexte de déficit en FX, nous avons également montré l'absence d'interaction entre les deux protéines dans un contexte de coagulation normale avec la chaîne du patient Sa.

Pour aller plus loin, nous avons caractérisé l'interaction entre Ma-LC et le FX et avons réussi à montrer qu'elle était possible quand le FX était immobilisé mais également quand il était en solution dans l'expérience de la co-immunoprécipitation. Nous nous sommes également intéressés à l'identification des régions impliquées dans l'interaction sur les deux partenaires. Dans le cas du FX, la fixation à certaines zones spécifiques comme le peptide d'activation ou

la boucle catalytique pouvait avoir des implications sur sa biologie. Pour ce faire, nous avons mené différentes expérimentations. L'observation d'une interaction de Ma-LC avec le FX activé aussi importante que celle observée pour le FX (Figure 12, chapitre 2) élimine le peptide d'activation comme site crucial permettant une liaison entre les 2 protéines. Nous n'avons pas réussi à identifier plus précisément sur le FX la ou les régions impliquées dans l'interaction. Dans des expériences de western blot non présentées dans ce rapport, nous avons observé que Ma-LC reconnaissait la chaîne lourde et la chaîne légère du FX suggérant qu'il existait au moins 2 régions dans le FX impliquées dans la formation du complexe avec Ma-LC, localisées sur la chaîne lourde et la chaîne légère du facteur de coagulation.

Physiologiquement, les parties variables des anticorps sont responsables de leur spécificité envers leurs cibles. Nous avons confirmé dans le cas de Ma-LC que seule la partie variable est responsable de l'interaction avec le FX. De plus, nous avons montré que comparé à une séquence germinale, les mutations introduites dans les CDRs de la partie variable de la chaîne légère du patient Ma conduisent à l'interaction au FX puisque le rétablissement à la séquence germinale de chacun des CDRs du patient Ma a conduit à la perte de l'interaction observée entre le FX et la chaîne légère native du patient. Cependant, du fait des difficultés à produire la partie variable seule, nous avons mené nos expériences avec des chimères de chaîne légères, par interversion des parties variables de Ma et Sa. Nous ignorons donc, si l'interaction est possible si le VL est clivé et isolé de sa partie constante. Cette donnée est importante puisque de plus en plus de travaux semblent suggérer que la chaîne légère subit un clivage conduisant à la production de dimères non physiologiques de VL puis à des oligomères de VL qui forment la base du noyau fibrillaire.^{199,200,205} Dans ce contexte il sera intéressant de vérifier si le VL seul conserve l'interaction au FX et quel serait l'effet sur l'organisation de la structure fibrillaire si les VL libres dans la circulation sont en complexe avec le FX. Des optimisations sont toujours en cours pour l'obtention de VL fonctionnels.

5. Effets de la liaison de Ma-LC sur le FX

La différence d'activité de liaison observée entre Ma-LC et Sa-LC pourrait signer une importance capitale et offrir de nouvelles pistes dans la compréhension du mécanisme conduisant au déficit en FX dans l'amylose AL. En effet, ce résultat inédit soulève des interrogations diverses notamment sur l'impact de cette interaction spécifiquement observée dans un contexte de déficit, sur la biologie du FX. Certaines études ont par exemple noté une différence dans le ratio antigène/activité du FX dans l'amylose AL montrant par là un déficit qui serait dû à un défaut d'activité.²⁷¹ Par ailleurs, nous avons identifié un mécanisme impliquant la SAP, les macrophages et leur récepteur SRA1, permettant de réguler les taux du FX.¹¹⁰ Nous avons donc voulu comprendre quelles étaient les conséquences potentielles de la liaison de Ma-LC au FX qui pourraient expliquer le déficit en FX observé chez cette patiente.

5-a. Impact sur l'activité coagulante du FX

Nous avons étudié l'effet de la complexation du FX par Ma-LC sur l'activité coagulante du FX. Nos résultats montrent que le FX préalablement lié à Ma-LC demeure reconnaissable et clivable par les deux principaux complexes d'activation du FX dans la cascade de la coagulation. En outre, le FXa formé conserve sa capacité à cliver la prothrombine en thrombine et permet ainsi de générer un caillot dans un système plasmatique. Ainsi, en ce qui concerne la patiente Ma, le déficit mesuré ne repose pas sur un défaut d'activité mais sur une absence réelle de la protéine FX. Ces résultats sont à étendre à des cohortes plus importantes afin d'élucider les quelques cas de ratio antigène/activité différent. Dans le cadre de notre collaboration avec le centre de référence des amyloses, nous avons pu vérifier le ratio antigène/activité de deux autres patients amylose AL, l'un comme Ma, présentait un déficit en FX et le second un taux de FX à 73%. Nous avons mesuré un ratio à 1, pour l'ensemble des patients, montrant ainsi que l'activité du FX n'était pas affectée chez ces patients.

5-b. Impact sur la clairance du FX

Dans la continuité des travaux précédemment menés dans l'unité 1176 ayant permis l'identification d'un mécanisme de régulation des taux de FX, nous avons émis l'hypothèse que la formation d'un complexe FX/Ma-LC peut affecter l'équilibre production et élimination du FX notamment en favorisant le mécanisme d'élimination du FX. En effet, *Muczynski et al*¹¹⁰ avaient conclu à la préservation des taux endogènes du FX par l'existence d'un complexe circulant FX/SAP. Au cours de cette étude il avait été montré que le complexe FX/SAP formait des patchs à la surface des macrophages pour empêcher l'internalisation du FX dans des endosomes, mécanisme qui évitait une clairance plus importante du FX. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons utilisé deux modèles. Tout d'abord, un modèle murin, qui présentait l'avantage du in-vivo. Après avoir incubé le FX avec les différentes chaînes légères, nous l'avons injecté à différents groupes de souris puis avons étudié la cinétique d'élimination du FX. Nous n'avons pas observé de différence dans la cinétique de clairance du FX. Cependant, le modèle présentait un certain nombre de limites dont notamment le fait qu'on ignore si l'interaction Ma-LC/FX est suffisamment préservée dans le milieu complexe in vivo. Une autre limite importante est que la souris utilisée n'est pas un modèle d'amylose AL. Elle ne présente pas de dépôts amyloïdes ni de surcharge de chaînes légères. Il est donc possible que les chaînes légères que nous avons injectées, soient captées par des mécanismes immunologiques ou qu'elles interagissent avec des cibles de meilleures affinités libérant ainsi le FX. En l'état actuel de nos connaissances, le complexe Ma-LC n'a pas modifié la vitesse d'élimination du FX dans la circulation sanguine murine. Dans un deuxième modèle utilisant des cellules THP1 différenciées en macrophage, nous avons étudié le degré d'endocytose du FX pré-incubé avec l'une ou l'autre des chaînes légères. Nous avons ainsi pu montrer que la complexation du FX à Ma-LC conduisait à une endocytose plus importante du FX. Ce résultat semble donc indiquer que pour la patiente Ma, un mécanisme supplémentaire passant par une internalisation accélérée du FX est possible. Le modèle cellulaire comme le murin correspond à un milieu complexe, il convient donc de s'assurer là également du maintien de l'interaction entre le FX et Ma-LC mais également de la présence des autres protéines impliquées dans ce mécanisme que sont la SAP et le SR-A1. En outre, si l'interaction de la

chaîne légère avec le FX conduit à l'endocytose de ce dernier et représente un nouveau processus identifié de développement du déficit en FX, il est possible que cette interaction en solution soit la prémices de la présence du FX dans les dépôts amyloïdes.

B) Exploration de la capacité des cellules de la paroi vasculaire à induire la génération de thrombine en présence de traitements de l'hémophilie A

Dans le deuxième projet de ma thèse, nous avons analysé la capacité des cellules de la paroi vasculaire aortique humaine, les hVSMCs et hAECs à soutenir la génération de thrombine en présence de FVIII, d'emicizumab et ou d'aPCC.

Nos résultats montrent que les cellules endothéliales et cellules musculaires lisses supportent la génération de thrombine d'un plasma hémophile A sans avoir ajouté au système expérimental, du facteur tissulaire et des phospholipides exogènes. Nous avons cependant noté une différence importante dans le caractère procoagulant des deux types cellulaires. En effet, nous avons observé un caractère moins procoagulant des cellules endothéliales par rapport aux cellules musculaires en grande partie grâce à l'expression des protéines anticoagulantes comme le TFPI et la TM. Physiologiquement, les cellules endothéliales tapissent la paroi vasculaire et maintiennent la fluidité du sang en inhibant la génération permanente de la thrombine. Elles accomplissent cette fonction en exprimant des protéines anticoagulantes telles que le TFPI qui inhibe le facteur tissulaire mais aussi la TM qui amplifie le caractère anticoagulant du système protéine C/protéine S. En revanche, nous avons trouvé que les cellules musculaires présentent une expression significativement réduite de TM et de TFPI expliquant leur caractère plus procoagulant. Cette diminution du potentiel anticoagulant a été particulièrement manifeste lorsqu'on a comparé la génération de thrombine de base avec le plasma déficient en FVIII non supplémenté. L'ETP était 20 fois plus élevé avec les cellules musculaires lisses qu'avec les cellules endothéliales soulignant ainsi l'intérêt particulier de la prise en compte des composants cellulaires dans les tests de génération de thrombine en comparaison aux tests standards qui utilisent des phospholipides synthétiques.

De manière inattendue, nous avons observé que la stimulation des cellules endothéliales par le TNF- α réduit leur potentiel procoagulant du fait de la surexpression des composants anticoagulants. Par ailleurs, les résultats obtenus avec les cellules endothéliales aortiques ont été vérifiées sur deux autres types de cellules endothéliales (Les cellules endothéliales de la

veine ombilicale humaine (HUVEC) et les cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMVEC) et ont montré des résultats similaires.

L'ajout du FVIII ou de l'emicizumab a conduit à l'augmentation de la génération de thrombine de manière dose-dépendante. Cependant nos résultats montrent que l'emicizumab est moins efficace que le FVIII pour favoriser la génération de thrombine à la surface des cellules vasculaires. Néanmoins, avec le FVIII comme avec l'emicizumab, la capacité à augmenter la génération de thrombine dépend du type cellulaire. De plus, la combinaison de l'emicizumab avec le FVIII n'augmente pas la génération de thrombine induite par le FVIII seul.

En revanche, l'association de l'emicizumab à l'aPCC comme rapporté dans différentes études in vitro a résulté à une génération explosive de thrombine.^{71,305} Les mécanismes conduisant à l'augmentation de la génération de thrombine médiée par l'emicizumab en présence de l'aPCC sont encore en cours d'exploration en situation réelle dans des études cliniques pharmacologiques.³⁰⁶ Cette synergie pourrait reposer sur différents paramètres dont l'apport du FIXa par l'aPCC mais aussi l'augmentation de la concentration des FIX et FX qui constituent la base de l'effet de l'emicizumab. Une étude récente a mis en évidence une différence entre la formation de FXa médiée par le FVIII et par l'emicizumab.³⁰⁷ Elle montre que la formation de FXa induite par l'emicizumab à la surface des cellules endothéliales pourrait être plus importante suggérant ainsi que les patients traités par l'emicizumab ont probablement des sites de génération de FXa plus répandus que ce qui était estimé jusqu'à présent. Ce paramètre pourrait fournir une meilleure explication des mécanismes qui sous-tendent l'augmentation de la génération de thrombine médiée par l'emicizumab en présence de l'aPCC.

En conclusion, en explorant la génération de thrombine à la surface des cellules de la paroi vasculaire, nous avons montré que les cellules endothéliales disposent d'un arsenal anticoagulant leur conférant un faible potentiel procoagulant contrairement aux cellules musculaires lisses. Ceci est en accord avec l'observation selon laquelle le complexe FIXa/FVIIIa ne joue qu'un rôle minime, voire nul, dans l'activation basale de la coagulation in vivo, mais

joue un rôle important dans la génération de thrombine lors d'une lésion de la surface endothéliale. ³⁰⁸En outre, nous montrons que l'emicizumab présente une activité procoagulante inférieure à celle du FVIII sur des cellules hAEC non stimulées et stimulées par le TNF- α , ainsi que sur des cellules hVSMC et que sa combinaison au FVIII ne conduit pas à une augmentation de la génération de thrombine.

Perspectives

Au cours de ma thèse, j'ai exploré d'une part les mécanismes responsables du déficit en FX dans l'amylose AL et d'autre part d'évaluer la capacité des cellules vasculaires primaires aortiques (cellules musculaires lisses et cellules endothéliales stimulées ou non) à induire la génération de thrombine en présence de traitements de l'hémophilie A (FVIII et emicizumab).

A) Caractérisation des mécanismes responsables du déficit en FX de la coagulation dans l'amylose à chaînes légères

Dans la première partie, nous avons montré grâce à des techniques de microscopie la colocalisation du FX avec les chaînes légères amyloïdes dans les biopsies de deux patients atteints d'amylose AL et de déficit acquis en FX. Nous avons ainsi confirmé l'hypothèse de l'adsorption du FX par les plaques amyloïdes comme mécanisme d'élimination du FX dans la circulation. Cependant, nous avons également observé une colocalisation entre le FX et les chaînes légères amyloïdes dans la biopsie d'un patient présentant des taux normaux de FX (73%). Cette observation soulève une interrogation importante concernant la définition du déficit en FX : à partir de quel taux doit-on parler de déficit dans le contexte de l'amylose ? Le patient avait-il un taux de FX plus élevé avant son diagnostic d'amylose AL ? Il est également pertinent de se demander si l'adsorption du FX est présente chez tous les patients atteints d'amylose AL ce qui impliquerait que le FX pourrait être caractéristique des dépôts amyloïdes de chaînes légères et ainsi aider au diagnostic de l'amylose AL.

Aujourd'hui on estime de 8 à 14% le nombre de patients d'amylose AL présentant un déficit en FX selon les principales cohortes rapportées dans la littérature en considérant les patients avec un taux de FX coagulant < 50 %.²⁶⁷⁻²⁶⁹ Dans une population normale, l'activité du FX varie généralement entre 70 et 150 %. La limite inférieure dépend de caractéristiques de chaque laboratoire et de la population de référence utilisée. Si on considère un déficit comme étant un abaissement du taux de FX en dessous de 70%, correspondant à la limite inférieure de la population normale, le pourcentage de patients atteints d'amylose AL présentant un déficit en FX augmente significativement, atteignant 62 % et non pas 14 % dans une étude chinoise et 43% et non pas 14% dans une étude de la clinique Mayo.^{269,270} Cela pourrait

expliquer pourquoi le patient présentant un FX à 73% présentait malgré tout une légère adsorption de FX sur les plaques amyloïdes de sa graisse abdominale.

Récemment, nous avons reçu du matériel biologique de nouveaux patients avec un diagnostic d'amylose AL et un taux de FX entre 70 et 95 %. Le suivi du taux de FX chez ces patients a montré pour l'un l'absence de variation (FX de 72 à 76 % sur un suivi de 17 mois) et une variation de 30 % pour le second (FX de 72 à 107 % sur une durée de suivi de 4 ans). Pour explorer les nouvelles interrogations exposées plus haut, nous allons inclure ces nouveaux patients dans nos travaux. Nous envisageons de :

- Etudier la corrélation entre la fluctuation du taux de FX au cours du temps et les traitements reçus par ces deux nouveaux patients.

- Rechercher l'adsorption du FX sur leurs biopsies de glande salivaire.

En outre, des études ont montré l'intérêt de la spectrométrie de masse pour le diagnostic de l'amylose AL car cette technique standardisée permet d'identifier les protéines présentes dans les biopsies des patients.^{213,220} Dans cette optique, nous étudions la possibilité de mettre en place un protocole d'analyse par spectrométrie de masse pour rechercher le FX dans les biopsies des patients, qu'ils présentent ou non un déficit en FX.

Nous avons montré par ailleurs que la disparition des chaînes légères circulantes (réponse hématologique) chez les patients ne conduisaient pas systématiquement à la remontée du taux de FX. Au contraire, l'amélioration du taux de FX n'est observée qu'en moyenne 12/18 mois après la réponse hématologique. *Cordes et al*²⁸¹ a également montré que l'amélioration des taux de FX n'étaient pas corrélés à la réponse hématologique. Au contraire, elle serait corrélée à l'amélioration des paramètres tels que la protéinurie qui caractérisent une réponse d'organe (atteinte rénale). Nous espérons de notre part une étude plus approfondie en collaboration avec le centre de références pour explorer avec des techniques d'imagerie le degré et l'évolution de l'infiltration des fibrilles amyloïdes dans les organes en lien avec la fluctuation des taux de FX. Cette étude nous permettra de dire spécifiquement si

l'amélioration des taux de FX pourrait aider les cliniciens à caractériser la disparition des plaques amyloïdes.

D'autre part, nous avons montré dans des précédents travaux que le FX circule, associé à la SAP dans le plasma.¹¹⁰ Il a été démontré par de nombreuses études par ailleurs que la SAP est une protéine retrouvée dans toutes les plaques amyloïdes.²¹⁸ Une question pertinente se pose alors de savoir si le FX se retrouve dans les plaques amyloïdes de chaînes légères par l'intermédiaire de la SAP et si oui, pourquoi le déficit en FX n'est pas retrouvé dans les autres formes d'amylose. Pour adresser cette question, nous prévoyons de :

- Procéder au marquage de la SAP sur les biopsies que nous avons déjà étudié et de rechercher la colocalisation avec les chaînes légères et le FX

- D'inclure dans notre étude, en collaboration avec le centre de référence des amyloses, des patients diagnostiquées avec d'autres amyloses et de rechercher la présence du FX sur leurs biopsies. Nous avons récemment reçu à cet effet, une biopsie de glande salivaire d'un patient diagnostiqué avec une amylose inflammatoire (AA).

Enfin, notre étude souligne l'importance de surveiller régulièrement les taux de FX chez les patients atteints d'amylose AL, non seulement lors du diagnostic initial, mais également tout au long de leur suivi thérapeutique. Cette surveillance offre des informations supplémentaires cruciales sur l'évolution de la maladie. Alors que plusieurs approches thérapeutiques visant à traiter l'amylose AL peuvent entraîner une augmentation de l'activité coagulante du FX, l'association entre ces variations et les résultats du traitement reste largement inexplorée. La mise en place d'une étude prospective, sur une cohorte de patients consécutifs, présentant à la fois une amylose AL et un déficit en FX, où l'activité du FX, la réponse hématologique et la réponse des organes touchés seront mesurées, pourrait offrir des éclaircissements précieux.

Dans un deuxième volet de l'étude, nous avons mis en évidence pour la première fois, l'existence d'une liaison spécifique au FX de la chaîne légère soluble d'un patient atteint d'amylose AL présentant un déficit en FX. Nous avons montré que la formation du complexe était due à la partie variable de la chaîne légère et spécifiquement aux mutations introduites

dans la séquence de la chaîne légère pathogène, par rapport à la séquence germinale du même isotype. Nous ignorons cependant si la liaison observée en solution est responsable de la présence du FX dans les dépôts amyloïdes par la suite. Il a été montré que les parties variables de la chaîne légère étaient responsables de la formation des fibrilles amyloïdes. Nous envisageons d'étudier la formation de fibrilles amyloïdes in vitro de la chaîne Ma-LC en présence du FX et de rechercher en microscopie si le FX est intégré dans les fibrilles formées.

Nous avons démontré que la complexation du FX par la chaîne légère pathogène nommée Ma-LC conduisait à une endocytose significativement accrue du FX par des macrophages en comparaison au FX seul. Ceci suggère que la formation de ce complexe pourrait perturber un mécanisme régulateur des taux circulants du FX que nous avons découvert et publié au sein du laboratoire.¹¹⁰ Néanmoins, lors d'expériences sur des souris, nous n'avons pas réussi à détecter d'influence de la chaîne légère liant le FX sur la clairance de la protéine. Pour confirmer l'hypothèse selon laquelle l'interaction que nous avons mise en évidence affecte les taux circulants du FX, il serait nécessaire d'utiliser un modèle animal reproduisant l'amylose AL chez l'homme. Heureusement, un tel modèle a été développé par l'équipe du Dr Christophe Sirac (UMR 7276, Université de Limoges – CNRS). Actuellement, ce modèle utilise la chaîne légère Sa-LC que nous avons employée dans notre étude, bien qu'elle ne présente pas d'interaction avec le FX et ne provienne pas d'un patient avec un déficit de la coagulation. Il serait intéressant de répliquer le même modèle avec la chaîne légère Ma-LC. Grâce à ce modèle nous pourrions mieux comprendre le rôle de l'interaction du FX avec la chaîne légère Ma-LC sur l'élimination du FX et le développement subséquent du déficit en FX.

Il est possible que le mécanisme que nous avons observé avec les macrophages n'ait pas uniquement un rôle sur les taux circulants du FX mais aussi sur l'évolution de la pathologie, en permettant par exemple d'éliminer de la circulation les chaînes légères pathogènes ou au contraire en favorisant la formation de fibrilles amyloïdes comme montré sur d'autres modèles cellulaires. Ainsi, les travaux du groupe de Guillermo Herrera, travaillant essentiellement sur des cellules mésangiales ont montré que les chaînes légères de patients

AL induisent des changements vers un phénotype macrophagique.²⁹⁴ Les chaînes légères AL seraient largement internalisées dans les cavéoles et transportées vers les lysosomes où elles réunissent les conditions d'une amyloïdogénèse rapide (protéolyse, dénaturation et pH acide). Les agrégats amyloïdes sont alors extrudés des cellules pour envahir les espaces extracellulaires. Un processus similaire a également été démontré par le même groupe dans les cellules musculaires lisses vasculaires²⁹⁵ soulignant encore le rôle des lysosomes dans la formation de l'amylose AL, et est cohérent avec des observations antérieures dans les macrophages spléniques pendant la formation de l'amylose AA²⁹⁶

En plus du déficit en facteur de coagulation, plusieurs études de cas cliniques ont mis en lumière d'autres troubles de l'hémostase.^{269,271} Le développement d'un modèle animal d'amylose AL, tel que celui récemment mis au point par l'équipe du Dr Sirac (voir ci-dessus), permettra d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine de ces dysfonctionnements. Bien que chaque chaîne légère semble influencer les symptômes chez un individu donné, il existe probablement des mécanismes communs entre les patients présentant une altération de l'hémostase. La présence d'une chaîne légère amyloïdogène pourrait influencer la biologie de plusieurs protéines impliquées dans l'hémostase. Cette idée est étayée par l'observation selon laquelle les structures amyloïdes chez un patient sont capables d'interagir avec plusieurs facteurs de coagulation.²⁶⁶

L'étude portant sur la capacité des macrophages différenciés en THP1 à endocyter de manière plus importante que dans des conditions normales le FX quand celui-ci est complexé par la chaîne légère Ma-LC nécessite une meilleure caractérisation sur le plan mécanistique. Il reste à identifier les différents acteurs de l'endocytose notamment le récepteur SRA1 ainsi que la SAP lorsque le FX est ajouté en présence de Ma-LC. Par exemple, nous n'avons pas encore déterminé si l'endocytose accrue du FX en présence de Ma-LC se produit effectivement via SR-AI. De plus nous n'avons pas encore établi si lors de cette endocytose accrue due à la présence du complexe FX/Ma-LC, la SAP peut se lier au FX. Au cours d'expériences préliminaires non incluses dans ce manuscrit, nous avons observé que la formation du complexe FX/Ma-LC n'empêchait pas la liaison du FX à la SAP et inversement

que la présence du complexe FX/SAP n'entravait pas la liaison de Ma-LC au FX. Dans les deux cas, nous avons identifié la formation d'un tri-complexe. La découverte de ce tri-complexe dans la circulation sanguine constitue une avancée dans la compréhension des mécanismes de régulation de la concentration de ces protéines et de leurs fonctions biologiques au cours de l'amylose AL.

Notre projet s'est heurté à une difficulté majeure : la production dans des quantités suffisantes de chaînes légères amyloïdogènes. Cela a limité le nombre de chaînes légères que nous avons pu étudier se cantonnant à deux chaînes légères d'isotype lambda, l'une provenant d'un patient avec un déficit en FX et l'autre sans défaut de la coagulation. Avec davantage de chaînes légères provenant de différents patients, nous aurions pu déterminer si seuls les patients présentant un déficit en FX pouvaient présenter une interaction entre leur chaîne légère pathogène et le FX. Nous avons mis en évidence dans des expériences non explicitées dans ce manuscrit, l'existence d'une interaction entre le FX et la chaîne légère du patient 1 qui présente une amylose kappa (chapitre 1). Il nous faudrait cependant en contrôle au moins un nouveau patient présentant également une amylose kappa mais sans déficit en FX

Une autre difficulté rencontrée était la faible stabilité en forme soluble des chaînes légères amyloïdogènes, limitant ainsi le panel d'expériences présentées dans ce manuscrit. De plus, nous n'avons pas réussi à développer des conditions permettant d'induire la fibrillation de la chaîne Ma-LC sans agrégation. En effet, chaque chaîne légère nécessite ses propres conditions expérimentales pour fibriller. La mise au point (en cours) des conditions pourrait nous permettre de déterminer si le FX influence la fibrillation d'une chaîne légère, un aspect que nous n'avons pas abordé dans ces travaux.

Malgré ces limites le travail présenté a ouvert de nombreuses possibilités d'exploration pour l'avenir. Il a montré pour la première fois qu'une interaction stable pouvait exister entre le FX et une chaîne légère amyloïdogène encore soluble chez un patient atteint d'amylose AL. Compte tenu de la spécificité structurale de chaque chaîne légère, il est difficile de généraliser les phénomènes observés au cours de ce travail. Néanmoins, nos travaux suggèrent que de

nombreuses pistes peuvent être explorées pour déterminer l'influence de la formation d'un tel complexe. Ils ouvrent également la voie à la possibilité d'utiliser cette observation comme un moyen de développer des outils de diagnostic peu invasifs et rapides pour cette pathologie rare, mais dont le diagnostic précoce est vital pour les patients.

B) Exploration de la capacité des cellules de la paroi vasculaire à induire la génération de thrombine en présence de traitements de l'hémophilie A

Ce travail a permis de montrer l'importance des composants cellulaires (phospholipides, FT, TM, et TFPI) dans la régulation de la génération de thrombine comparativement aux expériences de génération de thrombine in vitro sans cellules. Il a révélé d'importantes différences entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. L'un des paramètres qu'il serait intéressant d'évaluer dans la comparaison de ces deux types cellulaires est l'expression des protéoglycanes et des héparanes sulfates. Ils sont connus pour promouvoir l'action d'anticoagulants comme l'antithrombine. De ce fait, une différence d'expression selon le type cellulaire pourrait contribuer à l'explication des différences que nous avons observé dans la génération de thrombine induite par les cellules endothéliales et musculaires lisses.

Le modèle expérimental utilisé a permis d'observer des différences significatives dans le mode d'action des différentes thérapies évaluées (emicizumab, FVIII, aPCC notamment). Cependant, il n'est pas complet du fait de l'absence d'autres composants du sang comme les plaquettes, les globules rouges et les leucocytes. Les plaquettes sont des cellules importantes à la coagulation ne serait-ce que par l'exposition de phospholipides membranaires. Une étude récente a exploré les mécanismes sous-jacents au développement des événements thrombotiques liés à l'utilisation combinée d'emicizumab et d'aPCC. Les résultats ont montré que cette combinaison pourrait entraîner l'activation des plaquettes et du système du complément.³⁰⁹ Pour aller plus loin dans notre exploration nous pourrions utiliser d'autres modèles de TGT afin de mieux comprendre l'effet d'emicizumab sur les cellules du sang. Des modèles de TGT en sang total ou en plasma riches en plaquettes ont été développés.^{310,311}

Ces modèles peuvent être utiles pour évaluer les autres composants du sang qui ne sont pas inclus dans notre modèle actuel. Cependant, leur mise en œuvre pratique et leur reproductibilité pourraient présenter des difficultés. De plus ce sont des modèles statiques sans le flux qui est un élément important au cours de l'hémostase mais aussi au cours de la thrombose. Ainsi la formation de schistocytes, marqueur des MAT (microangiopathies thrombotiques), résulte de la destruction mécanique (hémolyse par fragmentation) d'un globule rouge normal. Idéalement, un modèle in vivo semble le plus approprié pour caractériser le risque thrombotique à utiliser l'emicizumab associé à d'autres thérapies. La spécificité d'emicizumab pour les FIX et FX humain a limité son analyse fonctionnelle in vivo. Notre équipe a développé un modèle de souris qui permet d'étudier la fonction d'emicizumab in vivo et ³¹² Un projet est en cours pour étudier le processus de développement d'évènements thrombotiques lors de l'utilisation combinée d'emicizumab et d'aPCC dans ce modèle.

Références bibliographiques

1. de Revel T, Doghmi K. Physiologie de l'hémostase. *EMC - Dentisterie*. 2004;1(1):71–81.
2. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch*. 2007;454(3):345–359.
3. Ghosh DK, Salerno JC. Nitric oxide synthases: domain structure and alignment in enzyme function and control. *Front Biosci*. 2003;8:d193-209.
4. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, et al. Glycoprotein VI but not $\alpha 2\beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. *The EMBO Journal*. 2001;20(9):2120–2130.
5. Jung SM, Moroi M. Platelet glycoprotein VI. *Adv Exp Med Biol*. 2008;640:53–63.
6. Rumbaut RE. Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. Biota Publishing; 2010.
7. Ruggeri ZM. Platelet Adhesion under Flow. *Microcirculation*. 2009;16(1):58–83.
8. Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(4):288–300.
9. Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003;1(7):1602–1612.
10. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(2):195–198.
11. Bryckaert M, Rosa J-P, Denis CV, Lenting PJ. Of von Willebrand factor and platelets. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(2):307–326.
12. Gachet C. Les mécanismes moléculaires de l'activation plaquettaire. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. 2013;197(2):361–373.
13. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiological Reviews*. 2013;93(1):327–358.
14. Davie EW, Ratnoff OD. WATERFALL SEQUENCE FOR INTRINSIC BLOOD CLOTTING. *Science*. 1964;145(3638):1310–1312.
15. Macfarlane RG. AN ENZYME CASCADE IN THE BLOOD CLOTTING MECHANISM, AND ITS FUNCTION AS A BIOCHEMICAL AMPLIFIER. *Nature*. 1964;202:498–499.
16. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85(6):958–965.
17. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev*. 2015;29(3):153–162.
18. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010;89(3):219–229.
19. Alshehri FSM, Whyte CS, Mutch NJ. Factor XIII-A: An Indispensable “Factor” in Haemostasis and Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):3055.
20. What Does It Take to Make the Perfect Clot?
21. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(8):1687–1693.
22. Grover SP, Mackman N. Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(4):709–725.
23. Panteleev MA, Dashkevich NM, Ataullakhanov FI. Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: roles of geometry, flow and diffusion. *Thrombosis Research*. 2015;136(4):699–711.
24. Stoilova-McPhie S. Factor VIII and Factor V Membrane Bound Complexes. *Subcell Biochem*. 2021;96:153–175.
25. Mann KG. Prothrombinase: the paradigm for membrane bound enzyme complexes; a memoir. *J Thromb Thrombolysis*. 2021;52(2):379–382.
26. Krishnaswamy S, Jones KC, Mann KG. Prothrombinase complex assembly. Kinetic mechanism of enzyme assembly on phospholipid vesicles. *J Biol Chem*. 1988;263(8):3823–3834.
27. Nesheim ME, Taswell JB, Mann KG. The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase. *Journal of Biological Chemistry*. 1979;254(21):10952–10962.
28. Kovalenko TA, Panteleev MA, Sveshnikova AN. Substrate delivery mechanism and the role of membrane curvature in factor X activation by extrinsic tenase. *Journal of Theoretical Biology*. 2017;435:125–133.
29. Broze GJ, Warren LA, Novotny WF, et al. The Lipoprotein-Associated Coagulation Inhibitor That Inhibits the Factor VII-Tissue Factor Complex Also Inhibits Factor Xa: Insight Into Its Possible Mechanism of Action. *Blood*. 1988;71(2):335–343.

30. Jesty J. The inhibition of activated bovine coagulation factors X and VII by antithrombin III. *Arch Biochem Biophys.* 1978;185(1):165–173.
31. Smith SA, Travers RJ, Morrissey JH. How it all starts: initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015;50(4):326–336.
32. Renné T, Schmaier AH, Nickel KF, Blombäck M, Maas C. In vivo roles of factor XII. *Blood.* 2012;120(22):4296–4303.
33. Dargaud Y, Wolberg AS, Gray E, et al. Proposal for standardized preanalytical and analytical conditions for measuring thrombin generation in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2017;15(8):1704–1707.
34. Yong J, Toh C-H. Rethinking coagulation: from enzymatic cascade and cell-based reactions to a convergent model involving innate immune activation. *Blood.* 2023;142(25):2133–2145.
35. Neubauer K, Zieger B. Endothelial cells and coagulation. *Cell Tissue Res.* 2022;387(3):391–398.
36. Gaffney PJ. Fibrin Degradation Products. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2001;936(1):594–610.
37. Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2015;13:S98–S105.
38. Schaller J, Gerber SS. The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(5):785–801.
39. Roche PA, Pizzo SV. Characterization of alpha 2-macroglobulin-plasmin complexes: complete subunit cleavage alters receptor recognition in vivo and in vitro. *Biochemistry.* 1987;26(2):486–491.
40. Sillen M, Declerck PJ. Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI): An Updated Narrative Review. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7):3670.
41. Mutch NJ, Medcalf RL. The fibrinolysis renaissance. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2023;21(12):3304–3316.
42. Doherty TM, Kelley A. Bleeding Disorders. *StatPearls.* 2023;
43. Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia.* 2013;19(1):e1–e47.
44. David D, Morais S, Ventura C, Campos M. Female haemophilic homozygous for the factor VIII intron 22 inversion mutation, with transcriptional inactivation of one of the factor VIII alleles. *Haemophilia.* 2003;9(1):125–130.
45. Berntorp E, Shapiro AD. Modern haemophilia care. *Lancet.* 2012;379(9824):1447–1456.
46. Miller CH, Bean CJ. Genetic causes of haemophilia in women and girls. *Haemophilia.* 2021;27(2):e164–e179.
47. Blanchette VS, Key NS, Ljung LR, et al. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2014;12(11):1935–1939.
48. Barnes C. Importance of pharmacokinetics in the management of hemophilia. *Pediatric Blood & Cancer.* 2013;60(S1):S27–S29.
49. Lafeber FPJG, Miossec P, Valentino LA. Physiopathology of haemophilic arthropathy. *Haemophilia.* 2008;14(s4):3–9.
50. Jones P, Fearn M, Forbes C, Stuart J. Haemophilia A home therapy in the United Kingdom 1975-6. *Br Med J.* 1978;1(6125):1447–1450.
51. van Meegeren MER, Roosendaal G, Jansen NWD, Lafeber FPJG, Mastbergen SC. Blood-Induced Joint Damage: The Devastating Effects of Acute Joint Bleeds versus Micro-Bleeds. *Cartilage.* 2013;4(4):313–320.
52. van Vulpen LFD, van Meegeren MER, Roosendaal G, et al. Biochemical markers of joint tissue damage increase shortly after a joint bleed; an explorative human and canine in vivo study. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015;23(1):63–69.
53. Aledort LM, Haschmeyer RH, Pettersson H. A longitudinal study of orthopaedic outcomes for severe factor-VIII-deficient haemophiliacs. The Orthopaedic Outcome Study Group. *J Intern Med.* 1994;236(4):391–399.
54. FDA approves once-weekly efanesoctocog alfa, a new class of high-sustained factor VIII therapy for haemophilia A | Sobi. 2023;
55. Rayment R, Chalmers E, Forsyth K, et al. Guidelines on the use of prophylactic factor replacement for children and adults with Haemophilia A and B. *British Journal of Haematology.* 2020;190(5):684–695.
56. Berntorp E, Hermans C, Solms A, Poulsen L, Mancuso ME. Optimising prophylaxis in haemophilia A: The ups and downs of treatment. *Blood Reviews.* 2021;50:100852.
57. de Biasi R, Rocino A, Papa ML, et al. Incidence of factor VIII inhibitor development in hemophilia A patients treated with less pure plasma derived concentrates. *Thromb Haemost.* 1994;71(5):544–547.

58. Ehrenforth S, Kreuz W, Linde R, et al. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *The Lancet*. 1992;339(8793):594–598.
59. Pratt KP, Arruda VR, Lacroix-Desmazes S. Inhibitors-Recent insights. *Haemophilia*. 2021;27 Suppl 3:28–36.
60. Frommel D, Allain JP. Genetic predisposition to develop factor VIII antibody in classic hemophilia. *Clin Immunol Immunopathol*. 1977;8(1):34–38.
61. Astermark J, Berntorp E, White GC, Kroner BL, MIBS Study Group. The Malmö International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients. *Haemophilia*. 2001;7(3):267–272.
62. Santagostino E, Mancuso ME, Rocino A, et al. Environmental risk factors for inhibitor development in children with haemophilia A: a case-control study. *Br J Haematol*. 2005;130(3):422–427.
63. Ozelo MC, Yamaguti-Hayakawa GG. Impact of novel hemophilia therapies around the world. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2022;6(3):e12695.
64. CEVENFACTA (eptacog bêta - FVIIa) - Hémophilie congénitale. *Haute Autorité de Santé*. .
65. Parameswaran R, Shapiro AD, Gill JC, Kessler CM, HTRS Registry Investigators. Dose effect and efficacy of rFVIIa in the treatment of haemophilia patients with inhibitors: analysis from the Hemophilia and Thrombosis Research Society Registry. *Haemophilia*. 2005;11(2):100–106.
66. Negrier C, Goudemand J, Sultan Y, et al. Multicenter retrospective study on the utilization of FEIBA in France in patients with factor VIII and factor IX inhibitors. French FEIBA Study Group. Factor Eight Bypassing Activity. *Thromb Haemost*. 1997;77(6):1113–1119.
67. Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med*. 2012;18(10):1570–1574.
68. Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, et al. Emicizumab Prophylaxis in Patients Who Have Hemophilia A without Inhibitors. *N Engl J Med*. 2018;379(9):811–822.
69. Shima M, Sidonio Jr RF. Substitution therapy. *Haemophilia*. 2021;27(S3):53–59.
70. Atsou S, Schellenberg C, Lagrange J, et al. Thrombin generation on vascular cells in the presence of factor VIII and/or emicizumab. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2024;22(1):112–125.
71. Zong Y, Antovic A, Soutari NMH, Antovic J, Pruner I. Synergistic Effect of Bypassing Agents and Sequence Identical Analogue of Emicizumab and Fibrin Clot Structure in the In Vitro Model of Hemophilia A. *TH Open*. 2020;4(2):e94–e103.
72. Callaghan MU, Negrier C, Paz-Priel I, et al. Long-term outcomes with emicizumab prophylaxis for hemophilia A with or without FVIII inhibitors from the HAVEN 1-4 studies. *Blood*. 2021;137(16):2231–2242.
73. Shapiro AD. Concizumab: a novel anti-TFPI therapeutic for hemophilia. *Blood Advances*. 2021;5(1):279.
74. Patel-Hett S, Martin EJ, Mohammed BM, et al. Marstacimab, a tissue factor pathway inhibitor neutralizing antibody, improves coagulation parameters of ex vivo dosed haemophilic blood and plasmas. *Haemophilia*. 2019;25(5):797–806.
75. Young G, Srivastava A, Kavakli K, et al. Efficacy and safety of fitusiran prophylaxis in people with haemophilia A or haemophilia B with inhibitors (ATLAS-INH): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2023;401(10386):1427–1437.
76. Ljung R, Auerswald G, Benson G, et al. Inhibitors in haemophilia A and B: Management of bleeds, inhibitor eradication and strategies for difficult-to-treat patients. *Eur J Haematol*. 2019;102(2):111–122.
77. Peyvandi F, Kavakli K, El-Beshlawy A, Rangarajan S. Management of haemophilia A with inhibitors: A regional cross-talk. *Haemophilia*. 2022;28(6):950–961.
78. Kjellev SL, Østergaard H, Greisen PJ, et al. Mim8 - a Next-Generation FVIII Mimetic Bi-Specific Antibody - Potently Restores the Hemostatic Capacity in Hemophilia a Settings in Vitro and In Vivo. *Blood*. 2019;134(Supplement_1):96.
79. Perrin GQ, Herzog RW, Markusic DM. Update on clinical gene therapy for hemophilia. *Blood*. 2019;133(5):407–414.
80. Rangarajan S, Walsh L, Lester W, et al. AAV5–Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(26):2519–2530.
81. Siner JI, Iacobelli NP, Sabatino DE, et al. Minimal modification in the factor VIII B-domain sequence ameliorates the murine hemophilia A phenotype. *Blood*. 2013;121(21):4396–4403.
82. Nathwani AC. Gene therapy for hemophilia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2022;2022(1):569–578.

83. Mahlangu J, Kaczmarek R, von Drygalski A, et al. Two-Year Outcomes of Valoctocogene Roxaparvovec Therapy for Hemophilia A. *New England Journal of Medicine*. 2023;388(8):694–705.
84. Rodríguez-Merchán EC, De Pablo-Moreno JA, Liras A. Gene Therapy in Hemophilia: Recent Advances. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14):7647.
85. Peyvandi F, Garagiola I. Clinical advances in gene therapy updates on clinical trials of gene therapy in haemophilia. *Haemophilia*. 2019;25(5):738–746.
86. Mannucci PM. Hemophilia therapy: the future has begun. *Haematologica*. 2020;105(3):545–553.
87. Leebeek FWG, Miesbach W. Gene therapy for hemophilia: a review on clinical benefit, limitations, and remaining issues. *Blood*. 2021;138(11):923–931.
88. Bowyer AE, Lowe AE, Tiefenbacher S. Laboratory issues in gene therapy and emicizumab. *Haemophilia*. 2021;27(S3):142–147.
89. Nogami K, Soeda T, Matsumoto T, et al. Routine measurements of factor VIII activity and inhibitor titer in the presence of emicizumab utilizing anti-idiotypic monoclonal antibodies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2018;16(7):1383–1390.
90. Adamkewicz JI, Chen DC, Paz-Priel I. Effects and Interferences of Emicizumab, a Humanised Bispecific Antibody Mimicking Activated Factor VIII Cofactor Function, on Coagulation Assays. *Thromb Haemost*. 2019;119(07):1084–1093.
91. Pipe SW, Trzaskoma B, Minhas M, et al. Efficacy of emicizumab is maintained throughout dosing intervals for bleed prophylaxis. *Res Pract Thromb Haemost*. 2023;7(2):100077.
92. Susen S, Gruel Y, Godier A, et al. Management of bleeding and invasive procedures in haemophilia A patients with inhibitor treated with emicizumab (Hemlibra®): Proposals from the French network on inherited bleeding disorders (MHEMO), the French Reference Centre on Haemophilia, in collaboration with the French Working Group on Perioperative Haemostasis (GIHP). *Haemophilia*. 2019;25(5):731–737.
93. Winter WE, Flax SD, Harris NS. Coagulation Testing in the Core Laboratory. *Laboratory Medicine*. 2017;48(4):295–313.
94. Rosén S, Andersson M, Blombäck M, et al. Clinical Application of a Chromogenic Substrate Method for Determination of Factor VIII Activity. *Thromb Haemost*. 1985;54(8):818–823.
95. Nougier C, Jeanpierre E, Ternisien C, et al. Emicizumab treatment: Impact on coagulation tests and biological monitoring of haemostasis according to clinical situations (BIMHO group proposals). *European Journal of Haematology*. 2020;105(6):675–681.
96. Hemker HC, Wielders S, Kessels H, Béguin S. Continuous Registration of Thrombin Generation in Plasma, Its Use for the Determination of the Thrombin Potential. *Thromb Haemost*. 1993;70(10):617–624.
97. Depasse F, Binder NB, Mueller J, et al. Thrombin generation assays are versatile tools in blood coagulation analysis: A review of technical features, and applications from research to laboratory routine. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2021;19(12):2907.
98. Didelot M, Docq C, Wahl D, et al. Platelet aggregation impacts thrombin generation assessed by calibrated automated thrombography. *Platelets*. 2018;29(2):156–161.
99. Girolami A, Cosi E, Sambado L, Girolami B, Randi ML. Complex History of the Discovery and Characterization of Congenital Factor X Deficiency. *Semin Thromb Hemost*. 2015;41(4):359–365.
100. Hertzberg M. Biochemistry of factor X. *Blood Rev*. 1994;8(1):56–62.
101. Aronson DL, Mustafa AJ, Mushinski JF. Purification of human factor X and comparison of peptide maps of human factor X and prothrombin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*. 1969;188(1):25–30.
102. Patthy L. Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell*. 1985;41(3):657–663.
103. PubChem. F10 - coagulation factor X (human).
104. Nakagawa H, Takahashi N, Fujikawa K, et al. Identification of the oligosaccharide structures of human coagulation factor X activation peptide at each glycosylation site. *Glycoconjugate J*. 1995;12(2):173–181.
105. Jackson CM. Factor X. *Prog Hemost Thromb*. 1984;7:55–109.
106. Inoue K, Morita T. Identification of O-linked oligosaccharide chains in the activation peptides of blood coagulation factor X. The role of the carbohydrate moieties in the activation of factor X. *Eur. J. Biochem*. 1993;218(1):153–163.
107. McMullen BA, Fujikawa K, Kisiel W. The occurrence of beta-hydroxyaspartic acid in the vitamin K-dependent blood coagulation zymogens. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1983;115(1):8–14.

108. Padmanabhan K, Padmanabhan KP, Tulinsky A, et al. Structure of human des(1-45) factor Xa at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol.* 1993;232(3):947–966.
109. Kurdi M, Cherel G, Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Coagulation factor X interaction with macrophages through its N-glycans protects it from a rapid clearance. *PLoS ONE.* 2012;7(9):e45111.
110. Muczynski V, Aymé G, Regnault V, et al. Complex formation with pentraxin-2 regulates factor X plasma levels and macrophage interactions. *Blood.* 2017;129(17):2443–2454.
111. Muczynski V, Bazaia A, Loubière C, et al. Macrophage receptor SR-AI is crucial to maintain normal plasma levels of coagulation factor X. *Blood.* 2016;127(6):778–786.
112. Narita M, Rudolph AE, Miletich JP, Schwartz AL. The low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) mediates clearance of coagulation factor Xa in vivo. *Blood.* 1998;91(2):555–560.
113. Krishnaswamy S. The Transition of Prothrombin to Thrombin. *J Thromb Haemost.* 2013;11(0 1):265–276.
114. Krishnaswamy S, Church WR, Nesheim ME, Mann KG. Activation of human prothrombin by human prothrombinase. Influence of factor Va on the reaction mechanism. *J Biol Chem.* 1987;262(7):3291–3299.
115. Krishnaswamy S, Mann KG, Nesheim ME. The prothrombinase-catalyzed activation of prothrombin proceeds through the intermediate meizothrombin in an ordered, sequential reaction. *J Biol Chem.* 1986;261(19):8977–8984.
116. Kamikubo Y, Mendolicchio GL, Zampolli A, et al. Selective factor VIII activation by the tissue factor–factor VIIa–factor Xa complex. *Blood.* 2017;130(14):1661–1670.
117. Ahamed J, Belting M, Ruf W. Regulation of tissue factor–induced signaling by endogenous and recombinant tissue factor pathway inhibitor 1. *Blood.* 2005;105(6):2384–2391.
118. Dewerchin M, Liang Z, Moons L, et al. Blood coagulation factor X deficiency causes partial embryonic lethality and fatal neonatal bleeding in mice. *Thromb. Haemost.* 2000;83(2):185–190.
119. Camerer E, Huang W, Coughlin SR. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(10):5255–5260.
120. Riewald M, Ruf W. Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(14):7742–7747.
121. Zelaya H, Rothmeier AS, Ruf W. Tissue factor at the crossroad of coagulation and cell signaling. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2018;16(10):1941–1952.
122. Du L, Kao RY, Zhou Y, et al. Cleavage of spike protein of SARS coronavirus by protease factor Xa is associated with viral infectivity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;359(1):174–179.
123. Frydman GH, Streiff MB, Connors JM, Piazza G. The Potential Role of Coagulation Factor Xa in the Pathophysiology of COVID-19: A Role for Anticoagulants as Multimodal Therapeutic Agents. *TH Open.* 2020;4(4):e288–e299.
124. Kaiser B, Paintz M, Scholz O, Kunitada S, Fareed J. A Synthetic Inhibitor of Factor Xa, DX-9065a, Reduces Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells in Vivo in Rats. *Thrombosis Research.* 2000;98(2):175–185.
125. Herbert J, Bono F, Hérault J, et al. Effector protease receptor 1 mediates the mitogenic activity of factor Xa for vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1998;101(5):993–1000.
126. Scotton CJ, Krupiczkoj MA, Königshoff M, et al. Increased local expression of coagulation factor X contributes to the fibrotic response in human and murine lung injury. *J Clin Invest.* 2009;119(9):2550–2563.
127. Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA. Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. *Trends Mol Med.* 2008;14(10):429–440.
128. Camerer E, Røttingen J-A, Gjernes E, et al. Coagulation Factors VIIa and Xa Induce Cell Signaling Leading to Up-regulation of the egr-1 Gene*. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274(45):32225–32233.
129. Acharya SS, Coughlin A, Dimichele DM. Rare Bleeding Disorder Registry: deficiencies of factors II, V, VII, X, XIII, fibrinogen and dysfibrinogenemias. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2004;2(2):248–256.
130. Brown DL, Kouides PA. Diagnosis and treatment of inherited factor X deficiency. *Haemophilia.* 2008;14(6):1176–1182.
131. Chatterjee T, Philip J, Nair V, et al. Inherited Factor X (Stuart–Prower Factor) deficiency and its management. *Med J Armed Forces India.* 2015;71(Suppl 1):S184–S186.
132. Peyvandi F, Michele DD, Bolton-Maggs PHB, et al. Classification of rare bleeding disorders (RBDs) based on the association between coagulant factor activity and clinical bleeding severity. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2012;10(9):1938–1943.
133. Fair DS, Edgington TS. Heterogeneity of hereditary and acquired factor X deficiencies by combined immunochemical and functional analyses. *British Journal of Haematology.* 1985;59(2):235–248.

134. Girolami A, Cosi E, Santarossa C, et al. Factor X Friuli Coagulation Disorder: Almost 50 Years Later. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2018;24(1):33–40.
135. Menegatti M, Peyvandi F. Factor X Deficiency. *Semin Thromb Hemost*. 2009;35(4):407–415.
136. Peyvandi F, Mannucci PM. Rare Coagulation Disorders. *Thromb Haemost*. 1999;82(10):1207–1214.
137. Telfer TP, Denson KW, Wright DR. A 'New' Coagulation Defect. *British Journal of Haematology*. 1956;2(3):308–316.
138. Hougie C, Barrow EM, Graham JB. Stuart Clotting Defect. I. Segregation of an Hereditary Hemorrhagic State from the Heterogeneous Group Heretofore Called "Stable Factor" (SPCA, Proconvertin, Factor VII) Deficiency. *J Clin Invest*. 1957;36(3):485–496.
139. The rarer inherited coagulation disorders: A review. *Blood Reviews*. 1995;9(2):65–76.
140. Bezeaud A, Miyata T, Helley D, et al. Functional consequences of the Ser334-->Pro mutation in a human factor X variant (factor XMarseille). *Eur J Biochem*. 1995;234(1):140–147.
141. Factor X deficiency.
142. Peyvandi F, Menegatti M, Santagostino E, et al. Gene mutations and three-dimensional structural analysis in 13 families with severe factor X deficiency. *British Journal of Haematology*. 2002;117(3):685–692.
143. Karimi M, Menegatti M, Afrasiabi A, Sarikhani S, Peyvandi F. Phenotype and genotype report on homozygous and heterozygous patients with congenital factor X deficiency. *Haematologica*. 2008;93(6):934–938.
144. Perry DJ. Factor X and its deficiency states. *Haemophilia*. 1997;3(3):159–172.
145. Hosker JP, Jewell DP. Transient, selective factor X deficiency and acute liver failure following chest infection treated with erythromycin BP. *Postgraduate Medical Journal*. 1983;59(694):514–515.
146. Peuscher FW, van Aken WG, van Mourik JA, et al. Acquired, transient factor X (Stuart factor) deficiency in patient with mycoplasma pneumoniae infection. *Scand J Haematol*. 1979;23(4):257–264.
147. Lee G, Duan-Porter W, Metjian A. Acquired, non-amyloid related factor X deficiency: review of the literature. *Haemophilia*. 2012;18(5):655–663.
148. Mulhare PE, Tracy PB, Golden EA, Branda RF, Bovill EG. A case of acquired factor X deficiency with in vivo and in vitro evidence of inhibitor activity directed against factor X. *Am J Clin Pathol*. 1991;96(2):196–200.
149. Ichinose A, Osaki T, Souri M. Autoimmune Coagulation Factor X Deficiency as a Rare Acquired Hemorrhagic Disorder: A Literature Review. *Thromb Haemost*. 2022;122(03):320–328.
150. Menakuru SR, Dhillon VS, Salih A, Beirat AF. Acquired Factor X Deficiency without Amyloidosis Presenting with Massive Hematuria: A Case Report and Review of the Literature. *Hematology Reports*. 2023;15(2):312–316.
151. Korsan-Bengtzen K, Hjort PF, Ygge J. Acquired Factor X Deficiency in a Patient with Amyloidosis. *Thromb Haemost*. 1962;07(3):558–566.
152. Plasse F, Carrère F, Vignon G, et al. Amylose AL découverte fortuitement devant un bilan d'hémostase perturbé prescrit à titre systématique. *Sang Thrombose Vaisseaux*. 2020;32(1):31–34.
153. Peyvandi F, Auerswald G, Austin SK, et al. Diagnosis, therapeutic advances, and key recommendations for the management of factor X deficiency. *Blood Reviews*. 2021;50:100833.
154. Spanggaard MB, Hansen CT, Maiborg M, et al. Amyloidosis is a disease with many faces. *Ugeskr Laeger*. 2023;185(1):V08220479.
155. Buxbaum JN, Dispenzieri A, Eisenberg DS, et al. Amyloid nomenclature 2022: update, novel proteins, and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) Nomenclature Committee. *Amyloid*. 2022;29(4):213–219.
156. Jaccard A, Desport E, Mohty D, Bridoux F. Amylose AL. *La Revue de Médecine Interne*. 2015;36(2):89–97.
157. Brito D, Albrecht FC, de Arenaza DP, et al. World Heart Federation Consensus on Transthyretin Amyloidosis Cardiomyopathy (ATTR-CM). *Glob Heart*. 2023;18(1):59.
158. Adams D, Slama M. Hereditary transthyretin amyloidosis: current treatment. *Curr Opin Neurol*. 2020;33(5):553–561.
159. Stojanovic KS, Georgin-Lavialle S, Gateau G. Amylose AA. *Néphrologie & Thérapeutique*. 2017;13(4):258–264.
160. Hachulla E, Wechsler B, Deveaux M, et al. [Localized or systemic amyloidosis? Value and limitations of Iodine-123 labelled amyloid P component scintigraphy, role of biopsy of minor salivary glands]. *Rev Med Interne*. 1994;15(3):182–185.
161. Marouane A. Nouveau protocole national de diagnostic et de soins publié sur l'Amylose AL - MaRIH - Filière de santé Maladies Rares Immuno-Hématologiques. *MaRIH*. 2023;

162. Kyle RA, Linos A, Beard CM, et al. Incidence and natural history of primary systemic amyloidosis in Olmsted County, Minnesota, 1950 through 1989. *Blood*. 1992;79(7):1817–1822.
163. Kumar N, Zhang NJ, Cherepanov D, et al. Global epidemiology of amyloid light-chain amyloidosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2022;17:278.
164. Quock TP, Yan T, Chang E, Guthrie S, Broder MS. Epidemiology of AL amyloidosis: a real-world study using US claims data. *Blood Adv*. 2018;2(10):1046–1053.
165. Baker KR. Light Chain Amyloidosis: Epidemiology, Staging, and Prognostication. *Methodist Debaque Cardiovasc J*. 18(2):27–35.
166. Duhamel S, Mohty D, Magne J, et al. Incidence and Prevalence of Light Chain Amyloidosis: A Population-Based Study. *Blood*. 2017;130:5577.
167. Merlini G, Dispenzieri A, Santhorawala V, et al. Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):38.
168. Gertz MA. Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2016 update on diagnosis, prognosis, and treatment. *American Journal of Hematology*. 2016;91(9):947–956.
169. Weiss BM, Hebreo J, Cordaro D, et al. Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) Precedes the Diagnosis of AL Amyloidosis by up to 14 Years. *Blood*. 2011;118(21):1827.
170. Pepys MB, Herbert J, Hutchinson WL, et al. Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature*. 2002;417(6886):254–259.
171. Kurouski D. Elucidating the Role of Lipids in the Aggregation of Amyloidogenic Proteins. *Acc Chem Res*. 2023;56(21):2898–2906.
172. Brenner DA, Jain M, Pimentel DR, et al. Human amyloidogenic light chains directly impair cardiomyocyte function through an increase in cellular oxidant stress. *Circ Res*. 2004;94(8):1008–1010.
173. Marin-Argany M, Lin Y, Misra P, et al. Cell Damage in Light Chain Amyloidosis: FIBRIL INTERNALIZATION, TOXICITY AND CELL-MEDIATED SEEDING. *J Biol Chem*. 2016;291(38):19813–19825.
174. McWilliams-Koepfen HP, Foster JS, Hackenbrack N, et al. Light Chain Amyloid Fibrils Cause Metabolic Dysfunction in Human Cardiomyocytes. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137716.
175. Sikkink LA, Ramirez-Alvarado M. Cytotoxicity of amyloidogenic immunoglobulin light chains in cell culture. *Cell Death Dis*. 2010;1(11):e98.
176. Benson MD, Liepnieks JJ, Kluge-Beckerman B. Hereditary systemic immunoglobulin light-chain amyloidosis. *Blood*. 2015;125(21):3281–3286.
177. McBride OW, Hieter PA, Hollis GF, et al. Chromosomal location of human kappa and lambda immunoglobulin light chain constant region genes. *J Exp Med*. 1982;155(5):1480–1490.
178. Skvaril F, Barandun S, Kuffer F, Probst M. [Changes of kappa/lambda ratio of human serum immunoglobulins in the course of development]. *Blut*. 1976;33(4):281–284.
179. Bellotti V, Mangione P, Merlini G. Review: immunoglobulin light chain amyloidosis--the archetype of structural and pathogenic variability. *J Struct Biol*. 2000;130(2–3):280–289.
180. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983;302(5909):575–581.
181. Di Noia JM, Neuberger MS. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:1–22.
182. Papavasiliou FN, Schatz DG. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell*. 2002;109 Suppl:S35–44.
183. Perfetti V, Ubbiali P, Vignarelli MC, et al. Evidence that amyloidogenic light chains undergo antigen-driven selection. *Blood*. 1998;91(8):2948–2954.
184. Bochtler T, Hegenbart U, Cremer FW, et al. Evaluation of the cytogenetic aberration pattern in amyloid light chain amyloidosis as compared with monoclonal gammopathy of undetermined significance reveals common pathways of karyotypic instability. *Blood*. 2008;111(9):4700–4705.
185. Rademaker L, Karimi-Farsijani S, Andreotti G, et al. Role of mutations and post-translational modifications in systemic AL amyloidosis studied by cryo-EM. *Nat Commun*. 2021;12(1):6434.
186. Kyle RA, Gertz MA. Primary systemic amyloidosis: clinical and laboratory features in 474 cases. *Semin Hematol*. 1995;32(1):45–59.
187. Kourelis TV, Dasari S, Theis JD, et al. Clarifying immunoglobulin gene usage in systemic and localized immunoglobulin light-chain amyloidosis by mass spectrometry. *Blood*. 2017;129(3):299–306.

188. Comenzo RL, Zhang Y, Martinez C, Osman K, Herrera GA. The tropism of organ involvement in primary systemic amyloidosis: contributions of Ig VL germ line gene use and clonal plasma cell burden. *Blood*. 2001;98(3):714–720.
189. Kazman P, Vielberg M-T, Pulido Cendales MD, et al. Fatal amyloid formation in a patient's antibody light chain is caused by a single point mutation. *eLife*. 2020;9:e52300.
190. Raffin R, Dieckman LJ, Szpunar M, et al. Physicochemical consequences of amino acid variations that contribute to fibril formation by immunoglobulin light chains. *Protein Sci*. 1999;8(3):509–517.
191. Blancas-Mejía LM, Tischer A, Thompson JR, et al. Kinetic control in protein folding for light chain amyloidosis and the differential effects of somatic mutations. *J Mol Biol*. 2014;426(2):347–361.
192. Harrison CJ, Mazzullo H, Ross FM, et al. Translocations of 14q32 and deletions of 13q14 are common chromosomal abnormalities in systemic amyloidosis. *Br J Haematol*. 2002;117(2):427–435.
193. Hayman SR, Bailey RJ, Jalal SM, et al. Translocations involving the immunoglobulin heavy-chain locus are possible early genetic events in patients with primary systemic amyloidosis. *Blood*. 2001;98(7):2266–2268.
194. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(6):574–581.
195. Wetzel R. Domain stability in immunoglobulin light chain deposition disorders. *Adv Protein Chem*. 1997;50:183–242.
196. Pw S, R R, Dk H, et al. Recombinant immunoglobulin variable domains generated from synthetic genes provide a system for in vitro characterization of light-chain amyloid proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1995;4(3):.
197. Hurle MR, Helms LR, Li L, Chan W, Wetzel R. A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(12):5446–5450.
198. Rottenaicher GJ, Weber B, Rührnöfl F, et al. Molecular mechanism of amyloidogenic mutations in hypervariable regions of antibody light chains. *Journal of Biological Chemistry*. 2021;296:100334.
199. Souillac PO, Uversky VN, Millett IS, et al. Elucidation of the molecular mechanism during the early events in immunoglobulin light chain amyloid fibrillation. Evidence for an off-pathway oligomer at acidic pH. *J Biol Chem*. 2002;277(15):12666–12679.
200. Qin Z, Hu D, Zhu M, Fink AL. Structural characterization of the partially folded intermediates of an immunoglobulin light chain leading to amyloid fibrillation and amorphous aggregation. *Biochemistry*. 2007;46(11):3521–3531.
201. Rottenaicher GJ, Absmeier RM, Meier L, Zacharias M, Buchner J. A constant domain mutation in a patient-derived antibody light chain reveals principles of AL amyloidosis. *Commun Biol*. 2023;6(1):1–11.
202. E R, Gj M, Jw K, Le K. Role of domain interactions in the aggregation of full-length immunoglobulin light chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019;116(3):.
203. Martin DJ, Ramirez-Alvarado M. Glycosaminoglycans promote fibril formation by amyloidogenic immunoglobulin light chains through a transient interaction. *Biophysical Chemistry*. 2011;158(1):81–89.
204. Arosio P, J. Knowles TP, Linse S. On the lag phase in amyloid fibril formation. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2015;17(12):7606–7618.
205. Radamaker L, Lin Y-H, Annamalai K, et al. Cryo-EM structure of a light chain-derived amyloid fibril from a patient with systemic AL amyloidosis. *Nat Commun*. 2019;10(1):1103.
206. Swuec P, Lavatelli F, Tasaki M, et al. Cryo-EM structure of cardiac amyloid fibrils from an immunoglobulin light chain AL amyloidosis patient. *Nat Commun*. 2019;10(1):1269.
207. Radamaker L, Baur J, Huhn S, et al. Cryo-EM reveals structural breaks in a patient-derived amyloid fibril from systemic AL amyloidosis. *Nat Commun*. 2021;12(1):875.
208. Absmeier RM, Rottenaicher GJ, Svilenov HL, Kazman P, Buchner J. Antibodies gone bad – the molecular mechanism of light chain amyloidosis. *The FEBS Journal*. 2023;290(6):1398–1419.
209. Röcken C, Stix B, Brömme D, et al. A Putative Role for Cathepsin K in Degradation of AA and AL Amyloidosis. *Am J Pathol*. 2001;158(3):1029–1038.
210. Bohne S, Sletten K, Menard R, et al. Cleavage of AL amyloid proteins and AL amyloid deposits by cathepsins B, K, and L. *The Journal of Pathology*. 2004;203(1):528–537.
211. Biolo A, Ramamurthy S, Connors LH, et al. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in cardiac amyloidosis: relationship to structural, functional myocardial changes and to light chain amyloid deposition. *Circ Heart Fail*. 2008;1(4):249–257.

212. Tanaka K, Essick EE, Doros G, et al. Circulating Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Cardiac Amyloidosis. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(2):e005868.
213. Lavatelli F, Mazzini G, Ricagno S, et al. Mass spectrometry characterization of light chain fragmentation sites in cardiac AL amyloidosis: insights into the timing of proteolysis. *J Biol Chem.* 2021;295(49):16572–16584.
214. Riek R, Eisenberg DS. The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature.* 2016;539(7628):227–235.
215. Pepys: Lithium: Samter's Immunologic Diseases - Google Scholar.
216. Winter M, Tholey A, Kristen A, Röcken C. MALDI Mass Spectrometry Imaging: A Novel Tool for the Identification and Classification of Amyloidosis. *PROTEOMICS.* 2017;17(22):1700236.
217. Nielsen NS, Poulsen ET, Klintworth GK, Enghild JJ. Insight into the Protein Composition of Immunoglobulin Light Chain Deposits of Eyelid, Orbital and Conjunctival Amyloidosis. *J Proteomics Bioinform.* 2014;Suppl 8:002.
218. Hawkins PN, Pepys MB. Imaging amyloidosis with radiolabelled SAP. *Eur J Nucl Med.* 1995;22(7):595–599.
219. Tennent GA, Lovat LB, Pepys MB. Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(10):4299–4303.
220. Dasari S, Theis JD, Vrana JA, et al. Amyloid Typing by Mass Spectrometry in Clinical Practice: a Comprehensive Review of 16,175 Samples. *Mayo Clinic Proceedings.* 2020;95(9):1852–1864.
221. Dispenzieri A, Kyle RA, Lacy M, et al. Serum cardiac troponins and N-terminal pro-brain natriuretic peptide: A staging system for primary systemic amyloidosis. *Amyloid and Amyloidosis.* 2004;67–69.
222. Kumar S, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Revised Prognostic Staging System for Light Chain Amyloidosis Incorporating Cardiac Biomarkers and Serum Free Light Chain Measurements. *JCO.* 2012;30(9):989–995.
223. Wechalekar AD, Schonland SO, Kastritis E, et al. A European collaborative study of treatment outcomes in 346 patients with cardiac stage III AL amyloidosis. *Blood.* 2013;121(17):3420–3427.
224. Palladini G, Hegenbart U, Milani P, et al. A staging system for renal outcome and early markers of renal response to chemotherapy in AL amyloidosis. *Blood.* 2014;124(15):2325–2332.
225. Palladini G, Dispenzieri A, Gertz MA, et al. New criteria for response to treatment in immunoglobulin light chain amyloidosis based on free light chain measurement and cardiac biomarkers: impact on survival outcomes. *J Clin Oncol.* 2012;30(36):4541–4549.
226. Kastritis E, Fotiou D, Theodorakakou F, et al. Timing and impact of a deep response in the outcome of patients with systemic light chain (AL) amyloidosis. *Amyloid.* 2021;28(1):3–11.
227. Muchtar E, Gertz MA, Lacy MQ, et al. Refining amyloid complete hematological response: Quantitative serum free light chains superior to ratio. *American Journal of Hematology.* 2020;95(11):1280–1287.
228. Muchtar E, Dispenzieri A, Leung N, et al. Depth of organ response in AL amyloidosis is associated with improved survival: grading the organ response criteria. *Leukemia.* 2018;32(10):2240–2249.
229. Palladini G, Dispenzieri A, Gertz MAA, et al. Validation of the Criteria of Response to Treatment In AL Amyloidosis. *Blood.* 2010;116(21):1364.
230. Santhorawala V, Boccadoro M, Gertz M, et al. Guidelines for high dose chemotherapy and stem cell transplantation for systemic AL amyloidosis: EHA-ISA working group guidelines. *Amyloid.* 2022;29(1):1–7.
231. Wechalekar AD, Cibeira MT, Gibbs SD, et al. Guidelines for non-transplant chemotherapy for treatment of systemic AL amyloidosis: EHA-ISA working group. *Amyloid.* 2023;30(1):3–17.
232. Palladini G, Milani P. Individualized Approach to Management of Light Chain Amyloidosis. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network.* 2023;21(1):91–98.
233. Lu X, Ding Z-C, Cao Y, et al. Alkylating agent melphalan augments the efficacy of adoptive immunotherapy using tumor-specific CD4+ T cells. *J Immunol.* 2015;194(4):2011–2021.
234. Jaccard A, Moreau P, Leblond V, et al. High-Dose Melphalan versus Melphalan plus Dexamethasone for AL Amyloidosis. *New England Journal of Medicine.* 2007;357(11):1083–1093.
235. Comenzo RL, Vosburgh E, Falk RH, et al. Dose-intensive melphalan with blood stem-cell support for the treatment of AL (amyloid light-chain) amyloidosis: survival and responses in 25 patients. *Blood.* 1998;91(10):3662–3670.
236. Jelinek T, Kryukova E, Kufova Z, Kryukov F, Hajek R. Proteasome inhibitors in AL amyloidosis: focus on mechanism of action and clinical activity. *Hematological Oncology.* 2017;35(4):408–419.
237. Blade J, Oriol A, Lahuerta J, et al. Phase II Trial of Cyclophosphamide, Lenalidomide and Dexamethasone (CYCLO-LEN-DEX) for Previously Untreated Patients with Light-Chain Amyloidosis (AL). *Blood.* 2014;124:2135–2135.

238. P M, A J, L B, et al. Lenalidomide in combination with melphalan and dexamethasone in patients with newly diagnosed AL amyloidosis: a multicenter phase 1/2 dose-escalation study. *Blood*. 2010;116(23):.
239. Kastiris E, Dialoupi I, Gavriatopoulou M, et al. Primary treatment of light-chain amyloidosis with bortezomib, lenalidomide, and dexamethasone. *Blood Advances*. 2019;3(20):3002–3009.
240. Specter R, Sancharawala V, Seldin DC, et al. Kidney dysfunction during lenalidomide treatment for AL amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(3):881–886.
241. Kaufman GP, Schrier SL, Lafayette RA, et al. Daratumumab yields rapid and deep hematologic responses in patients with heavily pretreated AL amyloidosis. *Blood*. 2017;130(7):900–902.
242. Roussel M, Merlini G, Chevret S, et al. A prospective phase 2 trial of daratumumab in patients with previously treated systemic light-chain amyloidosis. *Blood*. 2020;135(18):1531–1540.
243. Sancharawala V, Sarosiek S, Schulman A, et al. Safety, tolerability, and response rates of daratumumab in relapsed AL amyloidosis: results of a phase 2 study. *Blood*. 2020;135(18):1541–1547.
244. Palladini G, Kastiris E, Maurer MS, et al. Daratumumab plus CyBORd for patients with newly diagnosed AL amyloidosis: safety run-in results of ANDROMEDA. *Blood*. 2020;136(1):71.
245. Research C for DE and. FDA grants accelerated approval to Darzalex Faspro for newly diagnosed light chain amyloidosis. *FDA*. 2021;
246. Décision n° 2021.0262/DC/SEM du 7 octobre 2021 du collège de la Haute Autorité de santé constatant l'impact significatif du produit DARZALEX (daratumumab) 1800 mg sur les dépenses de l'assurance maladie. *Haute Autorité de Santé*. .
247. Gupta VA, Barwick BG, Matulis SM, et al. Venetoclax sensitivity in multiple myeloma is associated with B-cell gene expression. *Blood*. 2021;137(26):3604–3615.
248. Pasquer H, Belhadj K, Dupuis J, et al. Venetoclax induces profound and sustained responses in patients with relapsed/refractory light-chain amyloidosis. *Br J Haematol*. 2021;193(3):674–677.
249. Premkumar VJ, Lentzsch S, Pan S, et al. Venetoclax induces deep hematologic remissions in t(11;14) relapsed/refractory AL amyloidosis. *Blood Cancer J*. 2021;11(1):10.
250. Richards DB, Cookson LM, Berges AC, et al. Therapeutic Clearance of Amyloid by Antibodies to Serum Amyloid P Component. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1106–1114.
251. Richards D, Millns H, Cookson L, Lukas MA. An observational, non-interventional study for the follow-up of patients with amyloidosis who received miridesap followed by dezamizumab in a phase 1 study. *Orphanet J Rare Dis*. 2022;17(1):259.
252. Wechalekar A, Antoni G, Al Azzam W, et al. Pharmacodynamic evaluation and safety assessment of treatment with antibodies to serum amyloid P component in patients with cardiac amyloidosis: an open-label Phase 2 study and an adjunctive immuno-PET imaging study. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2022;22(1):49.
253. Edwards CV, Bhutani D, Mapara M, et al. One year follow up analysis of the phase 1a/b study of chimeric fibril-reactive monoclonal antibody 11-1F4 in patients with AL amyloidosis. *Amyloid*. 2019;26(sup1):115–116.
254. Valent J, Silowsky J, Kurman MR, et al. CAEL-101 Is Well-Tolerated in AL Amyloidosis Patients Receiving Concomitant Cyclophosphamide-Bortezomib-Dexamethasone (CyBORd): A Phase 2 Dose-Finding Study (NCT04304144). *Blood*. 2020;136:26–27.
255. Prothena Biosciences Ltd. A Phase 3, Randomized, Multicenter, Double-Blind, Placebo-Controlled, Efficacy and Safety Study of Birtamimab Plus Standard of Care vs. Placebo Plus Standard of Care in Mayo Stage IV Subjects With Light Chain (AL) Amyloidosis. *clinicaltrials.gov*; 2024.
256. Renz M, Torres R, Dolan PJ, et al. 2A4 binds soluble and insoluble light chain aggregates from AL amyloidosis patients and promotes clearance of amyloid deposits by phagocytosis †. *Amyloid*. 2016;23(3):168–177.
257. Alexion Pharmaceuticals, Inc. A Phase 3, Double-Blind, Multicenter Study to Evaluate the Efficacy and Safety of CAEL-101 and Plasma Cell Dyscrasia Treatment Versus Placebo and Plasma Cell Dyscrasia Treatment in Plasma Cell Dyscrasia Treatment Naïve Patients With Mayo Stage IIIb AL Amyloidosis. *clinicaltrials.gov*; 2023.
258. Alexion Pharmaceuticals, Inc. A Phase 3, Double-Blind, Multicenter Study to Evaluate the Efficacy and Safety of CAEL-101 and Plasma Cell Dyscrasia Treatment Versus Placebo and Plasma Cell Dyscrasia Treatment in Plasma Cell Dyscrasia Treatment Naïve Patients With Mayo Stage IIIa AL Amyloidosis. *clinicaltrials.gov*; 2023.
259. Gertz MA, Cohen AD, Comenzo RL, et al. Results of the Phase 3 VITAL Study of NEOD001 (Birtamimab) Plus Standard of Care in Patients with Light Chain (AL) Amyloidosis Suggest Survival Benefit for Mayo Stage IV Patients. *Blood*. 2019;134(Supplement_1):3166.
260. Gertz MA, Landau H, Comenzo RL, et al. First-in-Human Phase I/II Study of NEOD001 in Patients With Light Chain Amyloidosis and Persistent Organ Dysfunction. *J Clin Oncol*. 2016;34(10):1097–1103.

261. Shen K-N, Fu W-J, Wu Y, et al. Doxycycline Combined With Bortezomib-Cyclophosphamide-Dexamethasone Chemotherapy for Newly Diagnosed Cardiac Light-Chain Amyloidosis: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *Circulation*. 2022;145(1):8–17.
262. Morgan GJ. Barriers to Small Molecule Drug Discovery for Systemic Amyloidosis. *Molecules*. 2021;26(12):.
263. Theodorakakou F, Fotiou D, Dimopoulos MA, Kastritis E. Future Developments in the Treatment of AL Amyloidosis. *Hemato*. 2022;3(1):131–152.
264. Sucker C, Hetzel GR, Grabensee B, Stocksclaeder M, Scharf RE. Amyloidosis and Bleeding: Pathophysiology, Diagnosis, and Therapy. *American Journal of Kidney Diseases*. 2006;47(6):947–955.
265. Furie B, Greene E, Furie BC. Syndrome of Acquired Factor X Deficiency and Systemic Amyloidosis. *New England Journal of Medicine*. 1977;297(2):81–85.
266. Furie B, Voo L, McAdam KPWJ, Furie BC. Mechanism of Factor X Deficiency in Systemic Amyloidosis. *New England Journal of Medicine*. 1981;304(14):827–830.
267. Patel G, Hari P, Szabo A, et al. Acquired factor X deficiency in light-chain (AL) amyloidosis is rare and associated with advanced disease. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*. 2019;12(1):10–14.
268. Choufani EB, Sanchorawala V, Ernst T, et al. Acquired factor X deficiency in patients with amyloid light-chain amyloidosis: incidence, bleeding manifestations, and response to high-dose chemotherapy. *Blood*. 2001;97(6):1885–1887.
269. Abdallah N, Muchtar E, Dispenzieri A, et al. Coagulation Abnormalities in Light Chain Amyloidosis. *Mayo Clin Proc*. 2021;96(2):377–387.
270. Gao Y, Shen K, Chang L, et al. Prevalence, clinical characteristics and treatment outcome of factor X deficiency in a consecutive cohort of primary light-chain amyloidosis. *Leukemia Research*. 2022;120:106917.
271. Mumford AD, O'donnell J, Gillmore JD, et al. Bleeding symptoms and coagulation abnormalities in 337 patients with AL-amyloidosis. *British Journal of Haematology*. 2000;110(2):454–460.
272. Samson AL, Knaupp AS, Sashindranath M, et al. Nucleocytoplasmic Coagulation: An Injury-Induced Aggregation Event that Disulfide Crosslinks Proteins and Facilitates Their Removal by Plasmin. *Cell Reports*. 2012;2(4):889–901.
273. Kranenburg O, Bouma B, Kroon-Batenburg LMJ, et al. Tissue-Type Plasminogen Activator Is a Multiligand Cross- β Structure Receptor. *Current Biology*. 2002;12(21):1833–1839.
274. Arahata M, Takamatsu H, Morishita E, et al. Coagulation and fibrinolytic features in AL amyloidosis with abnormal bleeding and usefulness of tranexamic acid. *Int J Hematol*. 2020;111(4):550–558.
275. Pudusseri A, Sanchorawala V, Sloan JM, et al. Prevalence and prognostic value of D-dimer elevation in patients with AL amyloidosis. *American Journal of Hematology*. 2019;94(10):1098–1103.
276. Liebman H, Chinowsky M, Valdin J, Kenoyer G, Feinstein D. Increased fibrinolysis and amyloidosis. *Arch Intern Med*. 1983;143(4):678–682.
277. Rosenstein ED, Itzkowitz SH, Penziner AS, Cohen JI, Mornaghi RA. Resolution of Factor X Deficiency in Primary Amyloidosis Following Splenectomy. *Arch Intern Med*. 1983;143(3):597–599.
278. Toenges R, Steinmann J, Siegemund A, Serve H, Miesbach WA. Acquired Factor X Deficiency in Systemic Light Chain Amyloidosis: Factor X Recovery after Bleeding Complications, Splenectomy, Chemotherapy and Remission. *Blood*. 2017;130:4892.
279. Tashiro H, Shirasaki R, Watanabe M, et al. Direct Factor X sequestration by systemic amyloid light-chain amyloidosis. *Clin Case Rep*. 2018;6(3):513–515.
280. Greipp PR, Kyle RA, Bowie EJ. Factor X deficiency in primary amyloidosis: resolution after splenectomy. *N Engl J Med*. 1979;301(19):1050–1051.
281. Cordes S, Gertz MA, Buadi FK, et al. Autologous stem cell transplantation in immunoglobulin light chain amyloidosis with factor X deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2016;27(1):101–108.
282. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):16878.
283. Bolte S, Cordelières FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*. 2006;224(3):213–232.
284. Pepys MB, Herbert J, Hutchinson WL, et al. Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature*. 2002;417(6886):254–259.
285. Ancsin JB. Amyloidogenesis: historical and modern observations point to heparan sulfate proteoglycans as a major culprit. *Amyloid*. 2003;10(2):67–79.

286. Jin B, Odongo S, Radwanska M, Magez S. Nanobodies: A Review of Generation, Diagnostics and Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6):5994.
287. Krakauer DC, Müller L, Prohaska SJ, Stadler PF. Design specifications for cellular regulation. *Theory Biosci.* 2016;135(4):231–240.
288. Liu-Chen LY, Chen C, Phillips CA. Beta-[3H]funtaltrexamine-labeled mu-opioid receptors: species variations in molecular mass and glycosylation by complex-type, N-linked oligosaccharides. *Mol Pharmacol.* 1993;44(4):749–756.
289. Donath M-JSH, Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The Role of Cleavage of the Light Chain at Positions Arg1689 or Arg1721 in Subunit Interaction and Activation of Human Blood Coagulation Factor VIII (*). *Journal of Biological Chemistry.* 1995;270(8):3648–3655.
290. Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ, Papahadjopoulos D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1979;557(1):9–23.
291. Miroux B, Walker JE. Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol.* 1996;260(3):289–298.
292. Goldenzweig A, Fleishman SJ. Principles of Protein Stability and Their Application in Computational Design. *Annual Review of Biochemistry.* 2018;87(Volume 87, 2018):105–129.
293. Rawat P, Prabakaran R, Kumar S, Gromiha MM. Exploring the sequence features determining amyloidosis in human antibody light chains. *Sci Rep.* 2021;11(1):13785.
294. Herrera GA, Teng J, Turbat-Herrera EA, Zeng C, del Pozo-Yauner L. Understanding Mesangial Pathobiology in AL-Amyloidosis and Monoclonal Ig Light Chain Deposition Disease. *Kidney Int Rep.* 2020;5(11):1870–1893.
295. Vora M, Kevil CG, Herrera GA. Contribution of human smooth muscle cells to amyloid angiopathy in AL (light-chain) amyloidosis. *Ultrastruct Pathol.* 2017;41(5):358–368.
296. Jayaraman S, Gantz DL, Haupt C, Gursky O. Serum amyloid A forms stable oligomers that disrupt vesicles at lysosomal pH and contribute to the pathogenesis of reactive amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(32):E6507–E6515.
297. Hoffmann-La Roche. A Randomized, Multicenter, Open-Label, Phase III Clinical Trial to Evaluate the Efficacy, Safety, and Pharmacokinetics of Prophylactic Emicizumab Versus no Prophylaxis in Hemophilia A Patients With Inhibitors. clinicaltrials.gov; 2021.
298. Pipe SW, Shima M, Lehle M, et al. Efficacy, safety, and pharmacokinetics of emicizumab prophylaxis given every 4 weeks in people with haemophilia A (HAVEN 4): a multicentre, open-label, non-randomised phase 3 study. *Lancet Haematol.* 2019;6(6):e295–e305.
299. Young G, Liesner R, Chang T, et al. A multicenter, open-label phase 3 study of emicizumab prophylaxis in children with hemophilia A with inhibitors. *Blood.* 2019;134(24):2127–2138.
300. Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood.* 2017;130(23):2463–2468.
301. Dargaud Y, Lienhart A, Janbain M, et al. Use of thrombin generation assay to personalize treatment of breakthrough bleeds in a patient with hemophilia and inhibitors receiving prophylaxis with emicizumab. *Haematologica.* 2018;103(4):e181–e183.
302. Diaz-Pallares C, Lee H, Luider J, et al. Cyclophosphamide, Bortezomib and Dexamethasone (CyBorD) for the Treatment of Newly Diagnosed AL Amyloidosis: Impact of Response on Survival Outcomes. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia.* 2020;20(6):394–399.
303. Mahmood S, Palladini G, Sancharawala V, Wechalekar A. Update on treatment of light chain amyloidosis. *Haematologica.* 2014;99(2):209–221.
304. Breems DA, Sonneveld P, de Man RA, Leebeek FWG. Successful treatment of systemic amyloidosis with hepatic involvement and factor X deficiency by high dose melphalan chemotherapy and autologous stem cell reinfusion. *Eur J Haematol.* 2004;72(3):181–185.
305. Hartmann R, Feenstra T, Valentino L, Dockal M, Scheiflinger F. In vitro studies show synergistic effects of a procoagulant bispecific antibody and bypassing agents. *J Thromb Haemost.* 2018;
306. Sidonio R. aPCC and Emicizumab Safety Study in Congenital Hemophilia A Patients With Inhibitors (SAFE Study: Safety of aPCC Following Emicizumab Prophylaxis). clinicaltrials.gov; 2024.
307. Fager AM, Ellsworth P, Key NS, Monroe DM, Hoffman M. Emicizumab promotes factor Xa generation on endothelial cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2024;S1538783624001211.
308. Bauer KA, Mannucci PM, Gringeri A, et al. Factor IXa-Factor VIIIa-Cell Surface Complex Does Not Contribute to the Basal Activation of the Coagulation Mechanism In Vivo. *Blood.* 1992;79(8):2039–2047.

309. Valls R, Wagg J, Paz-Priel I, et al. Application of systems biology to identify pharmacological mechanisms of thrombotic microangiopathy evoked by combined activated prothrombin complex concentrate and emicizumab. *Sci Rep.* 2023;13:10078.
310. Ninivaggi M, Apitz-Castro R, Dargaud Y, et al. Whole-blood thrombin generation monitored with a calibrated automated thrombogram-based assay. *Clin Chem.* 2012;58(8):1252–1259.
311. Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoort R, Béguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost.* 2000;83(4):589–591.
312. Ferrière S, Peyron I, Christophe OD, et al. A hemophilia A mouse model for the in vivo assessment of emicizumab function. *Blood.* 2020;136(6):740.