



BU bibliothèque Lyon 1

<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -  
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON 1

INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

FACULTÉ DE PHARMACIE DE LYON

8, avenue Rockefeller – 69373 LYON Cedex 08

Année 2016/2017

Thèse n° 34-2017

**MÉMOIRE**  
**DU DIPLOME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE**  
**INNOVATIONS PHARMACEUTIQUES ET RECHERCHE**

SOUTENU DEVANT LE JURY INTERREGIONAL LE 23 OCTOBRE 2017

PAR MR VLADIMIR JACQUELINE

NÉ LE 26 AOUT 1987 À VERSAILLES

CONFORMÉMENT AUX DISPOSITIONS DE L'ARRETE DU 4 OCTOBRE 1988 TIENT LIEU DE

**THESE POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**TITRE DU MÉMOIRE**

Utilisation d'une séquence d'ADN complémentaire  
améliorée, codant pour un Facteur VIII recombinant, sur des  
modèles hépatiques *in vitro* et *in vivo*.

**JURY**

PRESIDENT : Pr. Christine VINCIGUERRA

MEMBRES : Pr. Claude NEGRIER

Pr. Pascale GAUSSEM

Dr. Christophe NOUGIER

Dr. Nathalie ENJOLRAS

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**  
**ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon**

**LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES**

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALENIQUE**

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

- Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
- Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)
- Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
- Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
- Madame Christelle MACHON (AHU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

- Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
- Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
- Madame Françoise FALSON (Pr)
- Monsieur Hatem FESSI (Pr)
- Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)
- Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
- Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
- Madame Ghania HAMD-DEGOBERT (MCU-HDR)
- Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
- Madame Giovanna LOLLO (MCU)
- Monsieur Damien SALMON (AHU)

- **BIOPHYSIQUE**

- Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
- Madame Laurence HEINRICH (MCU)
- Monsieur David KRYZA (MCU – PH - HDR)
- Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
- Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)
- Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE**

- **DROIT DE LA SANTE**

- Monsieur François LOCHER (PU – PH)
- Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

- Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
  
- Madame Carole SIANI (MCU – HDR)
- Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

- Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

- Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

#### **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)  
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**  
Madame Alexandra CLAYER-MONTEBAULT (MCU)  
Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)  
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)  
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**  
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH)  
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)  
Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

#### **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT**

- **CHIMIE ORGANIQUE**  
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)  
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)  
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)  
Madame Christelle MARMINON (MCU)  
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)  
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**  
Monsieur Roland BARRET (Pr)  
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)  
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)  
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**  
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)  
Madame Marie-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)  
Madame Isabelle KERZAON (MCU)  
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**  
Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)  
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)  
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)  
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)  
Madame Catherine RIOUFOL (MCU- PH-HDR)

#### **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE**

- **TOXICOLOGIE**  
Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)  
Madame Léa PAYEN (PU-PH)  
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)  
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B**

• **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)  
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)  
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)  
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)  
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)  
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)  
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)  
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)  
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)  
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

• **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)  
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

• **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)  
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)  
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)  
Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

• **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**

Madame Florence RANCHON

• **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Madame Charlotte BOUARD (86<sup>ème</sup> section)  
Madame Laure-Estelle CASSAGNES(85<sup>ème</sup> section)  
Monsieur Karim MILADI (85<sup>ème</sup> section)  
Madame Laurence PAGES (87<sup>ème</sup> section)

**Pr** : Professeur

**PU-PH** : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

**MCU** : Maître de Conférences des Universités

**MCU-PH** : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

**HDR** : Habilitation à Diriger des Recherches

**AHU** : Assistant Hospitalier Universitaire

**PAST** : Personnel Associé Temps Partiel

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- |   |                       |
|---|-----------------------|
| • Président de l'Université                                 | M. Frédéric FLEURY    |
| • Présidence du Conseil Académique                          | M. Hamda BEN HADID    |
| • Vice-Président du Conseil d'Administration                | M. Didier REVEL       |
| • Vice-Président de la Commission Recherche                 | M. Fabrice VALLEE     |
| • Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire | M. Philippe CHEVALIER |

### Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

#### SANTE

- |   |  |
|---|--|
| • UFR de Médecine Lyon Est  | Directeur : M. Jérôme ETIENNE          |
| • UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux                            | Directeur : Mme Carole BURILLON        |
| • Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques                | Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA |
| • UFR d'Odontologie   | Directeur : M. Denis BOURGEOIS         |
| • Institut des Techniques de Réadaptation                             | Directeur : M. Yves MATILLON           |
| • Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine | Directeur : Anne-Marie SCHOTT          |

#### SCIENCES ET TECHNOLOGIES

- |  |                                  |
|--|----------------------------------|
| • Faculté des Sciences et Technologies                                       | Directeur : M. Fabien DE MARCHI  |
| • UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) | Directeur : M. Yannick VANPOULLE |
| • Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL)                       | Directeur : M. Pascal FOURNIER   |
| • I.U.T. LYON 1  | Directeur : M. Christophe VITON  |
| • Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)                    | Directeur : M. Nicolas LEBOISNE  |
| • ESPE   | Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE  |

# Serment de Galien

*En présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples, je jure :*

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;*
- *D'exercer dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*

*Je tiens tout d'abord à remercier le docteur Nathalie ENJOLRAS. Je l'affirme sans l'ombre d'un doute, sans elle, ce travail n'existerait pas. Nathalie, je te remercie infiniment pour ta bienveillance, ta patience à **TOUTE** épreuve, ta constance et ton dévouement à mon égard au cours de ces quatre années passées à travailler ensemble.*

*Merci au professeur Claude NEGRIER, pour m'avoir fait une place au sein de son laboratoire. Merci au professeur Yesim DARGAUD pour ses précieux conseils et son aide.*

*Mille mercis également à tous les membres de l'EA4609, sans qui ce laboratoire ne serait rien de ce qu'il est. Merci à Pauline, Muriel pour votre aide précieuse. Merci à Yohann et Sandra pour leur aide et leur disponibilité sans faille.*

*J'ai aussi une pensée toute particulière pour mes anciens collègues. Jonathan, Alice et Éloïse, qui m'ont tout enseigné de la paillasse.*

*Je souhaite également remercier les pépettes du 8<sup>e</sup>. Elles donnent leur existence, leur génome, leur sang, leur bien-être, tous les jours, pour l'avancée de la médecine humaine.*

*Je remercie également mes parents, des piliers, pour leurs enseignements, les valeurs qu'ils m'ont transmises et que je chéris, chaque jour. Merci à mes frères, pour leur indéfectible loyauté. Merci à mes grands-parents, mes cousins et cousines toujours attentifs et présents.*

*Je tiens à remercier Patricia. Merci pour ta présence, toute ton attention, ton investissement, ton appui, ton affection, qui auront participé, bien plus que tu ne pourras le réaliser, à l'aboutissement de ce travail. Merci de veiller sur nous, chaque instant.*

*Et je te remercie, toi, Barbara.*

*J'en suis conscient, sans toi, je ne serais pas devenu qui je suis. Chaque jour passé avec toi et une bénédiction, une avancée, une force. Merci pour ton soutien, indéfectible dans le meilleur, comme le pire. Merci pour ton amour, sans condition.*

*Je sais quels sacrifices ce manuscrit représente pour toi. C'est pour cette raison que je l'espérais parfait. Merci de m'avoir aidé à l'achever, à en être fier.*

*Rentrons.*

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>- 9 -</b>
<b>INDEX DES FIGURES</b> .....	<b>- 13 -</b>
<b>INDEX DES TABLEAUX</b> .....	<b>- 15 -</b>
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS</b> .....	<b>- 16 -</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>- 20 -</b>
1.1 <b>ACTEURS DE L'HEMOSTASE PRIMAIRE</b> .....	<b>- 22 -</b>
1.1.1 <i>Acteurs cellulaires</i> .....	<b>- 22 -</b>
1.1.1.1  Endothélium vasculaire.....	- 22 -
1.1.1.2  Plaquettes .....	- 26 -
1.1.2 <i>Acteurs plasmatiques</i> .....	<b>- 31 -</b>
1.1.2.1  Facteur Von Willebrand .....	- 31 -
1.1.2.2  Fibrinogène et fibrine .....	- 34 -
<b>2  HEMOSTASE SECONDAIRE OU COAGULATION</b> .....	<b>- 37 -</b>
2.1  COMPLEXES MOLECULAIRES.....	- 37 -
2.2  PHASE D'INITIATION .....	- 39 -
2.3  PHASE D'AMPLIFICATION .....	- 40 -
2.4  PHASE DE PROPAGATION .....	- 42 -
2.5  REGULATION DE LA REPONSE PRO-COAGULANTE .....	- 43 -
<b>3  LE FACTEUR VIII</b> .....	<b>- 44 -</b>
3.1  INTRODUCTION .....	- 44 -
3.2  GENE DU FVIII.....	- 45 -
3.3  STRUCTURE PROTEIQUE DU FVIII .....	- 47 -
3.3.1 <i>Biosynthèse du FVIII</i> .....	<b>- 49 -</b>
3.3.1.1  Dans le réticulum endoplasmique.....	- 50 -
3.3.1.2  Dans l'appareil de Golgi .....	- 52 -
3.3.2 <i>Dans la circulation sanguine</i> .....	<b>- 55 -</b>
3.3.2.1  Interaction avec le facteur Von Willebrand .....	- 55 -
3.3.2.2  Activation et formation du complexe ténase intrinsèque .....	- 56 -
3.3.2.3  Inactivation.....	- 58 -

3.3.2.4	Élimination, clairance .....	- 60 -
<b>4</b>	<b>HEMOPHILIE A .....</b>	<b>- 61 -</b>
4.1	GENETIQUE DE L'HEMOPHILIE A .....	- 62 -
4.2	PHYSIOPATHOLOGIE .....	- 64 -
4.3	CLINIQUE .....	- 65 -
4.4	DEPISTAGE BIOLOGIQUE DE L'HEMOPHILIE A .....	- 66 -
4.4.1	Contexte.....	- 66 -
4.4.2	Dépistage.....	- 67 -
4.4.3	Test de mélange .....	- 68 -
4.4.4	Dosage de l'activité procoagulante du FVIII.....	- 69 -
4.4.4.1	Méthode coagulométrique ou méthode en 1 temps .....	- 69 -
4.4.4.2	Méthode chromogénique.....	- 70 -
4.4.5	Dosage antigénique du FVIII.....	- 72 -
4.4.6	Diagnostic génétique.....	- 72 -
4.4.7	Diagnostic prénatal .....	- 74 -
4.5	MODELES ANIMAUX HEMOPHILES A.....	- 76 -
4.6	TRAITEMENT DE L'HEMOPHILIE.....	- 78 -
4.6.1	Rationnelle du traitement substitutif.....	- 79 -
4.6.2	Facteurs VIII dérivés du plasma : pdFVIII .....	- 80 -
4.6.3	Facteurs VIII recombinants : rFVIII.....	- 82 -
4.6.4	Facteurs VIII à demi-vie prolongée .....	- 86 -
4.6.5	Anticorps bispécifiques .....	- 88 -
4.7	COMPLICATIONS LIEES AU TRAITEMENT .....	- 89 -
4.7.1	Complications infectieuses.....	- 89 -
4.7.2	Complications non-infectieuses.....	- 91 -
	<b>MATERIELS &amp; METHODES.....</b>	<b>- 95 -</b>
<b>1</b>	<b>CONDITIONS DE CULTURE ET TRANSFECTION CELLULAIRE .....</b>	<b>- 95 -</b>
1.1	CELLULES EUCARYOTES .....	- 95 -
1.2	ADN COMPLEMENTAIRE (ADNC) DU FVIII.....	- 96 -
1.3	TRANSFECTION .....	- 97 -

1.4	CLONAGE .....	- 97 -
1.5	LYSE CELLULAIRE.....	- 98 -
<b>2</b>	<b>PRODUCTION DE FVIII .....</b>	<b>- 99 -</b>
<b>3</b>	<b>PURIFICATION DU FVIII .....</b>	<b>- 99 -</b>
3.1	PRECIPITATION .....	- 99 -
3.2	DIALYSE.....	- 100 -
3.3	CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'ANIONS .....	- 100 -
<b>4</b>	<b>INJECTION HYDRODYNAMIQUE DU PLASMIDE CHEZ LA SOURIS HEMOPHILE A -</b>	<b>101 -</b>
4.1	CONDITIONNEMENT.....	- 102 -
4.2	INJECTION DES SOLUTIONS PLASMIDIQUES .....	- 102 -
4.3	PRELEVEMENT DE PLASMA PAR VOIE RETRO-ORBITAIRE .....	- 104 -
<b>5</b>	<b>CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DU FVIII.....</b>	<b>- 104 -</b>
5.1	WESTERN BLOT .....	- 104 -
5.2	ELISA.....	- 105 -
5.3	DOSAGE D'ACTIVITE COAGULOMETRIQUE .....	- 105 -
5.4	DOSAGE CHROMOGENIQUE DE L'ACTIVITE .....	- 106 -
	<b>RESULTATS.....</b>	<b>- 107 -</b>
<b>1</b>	<b>TRANSFECTION CELLULAIRE ET PRODUCTION DE FVIII RECOMBINANT .....</b>	<b>- 107 -</b>
1.1	PRESENTATION DES PLASMIDES UTILISES .....	- 107 -
1.2	DOSAGE DU FVIII ANTIGENIQUE DANS LES SURNAGEANTS DE CELLULES TRANSFECTEES TRANSITOIREMENT .....	- 108 -
1.3	DETERMINATION DE L'ACTIVITE PRO-COAGULANTE SELON LE TYPE CELLULAIRE .....	- 109 -
1.4	MISE EN EVIDENCE DU FVIII PAR WESTERN BLOT .....	- 111 -
<b>2</b>	<b>TRANSFECTION STABLE – CLONAGE CELLULAIRE .....</b>	<b>- 112 -</b>
<b>3</b>	<b>PURIFICATION DU FVIII BDD ISSU DES CLONES PRODUCTEURS, CHO ET HUH7, ISOLES AU LABORATOIRE.....</b>	<b>- 115 -</b>
3.1	PROFILS DE PURIFICATION .....	- 115 -
3.2	MESURES D'ACTIVITE PRO-COAGULANTE.....	- 116 -

<b>4</b>	<b>EXPERIENCE D'INJECTION HYDRODYNAMIQUE DE PLASMIDE CHEZ LES SOURIS HEMOPHILES A .....</b>	<b>- 118 -</b>
4.1	INJECTION DU PLASMIDE pCDNA FVIII-BDD-TFIX1(1+13) : DETAILS OPERATOIRES.....	- 119 -
4.2	CINETIQUE ET MESURE DU FVIII ANTIGENIQUE DANS LE PLASMA DES SOURIS HA APRES INJECTION HYDRODYNAMIQUE DU PLASMIDE pCDNA FVIII-BDD-TFIX1(1+13).....	- 120 -
4.3	MESURE D'ACTIVITE.....	- 124 -
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>- 127 -</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>- 139 -</b>

# INDEX DES FIGURES

Figure 1. Schéma global et synthétique de la coagulation, de sa régulation et de la fibrinolyse.....	- 21 -
Figure 2. Activation plaquettaire .....	- 29 -
Figure 3. Fibrinof ormation.....	- 35 -
Figure 4. Phase d'initiation de la coagulation.....	- 39 -
Figure 5. La place centrale de la thrombine.....	- 40 -
Figure 6. Phase d'amplification de la coagulation.....	- 41 -
Figure 7. Séquences conservées et mutations de la région promotrice du gène <i>F8</i> .....	- 47 -
Figure 8. Représentation de la préproprotéine du FVIII à sa sortie des machineries de la transcription.....	- 48 -
Figure 9. Structure protéique du FVIII au moment de (A) sa synthèse, (B) sa sécrétion et (C) son activation .....	- 57 -
Figure 10. Histogramme démographique du nombre de naissances mâles et du nombre d'hémophiles A recensés au cours de la période 2006-2015.....	- 62 -
Figure 11. Schéma de la transmission d'une maladie héréditaire liée à X selon le parent affecté.....	- 63 -
Figure 12. Phase d'amplification de la coagulation dans le cadre de l'hémophilie A.....	- 64 -
Figure 13. Recommandation dépistage et diagnostic de l'hémophilie A selon le rapport de la <i>World Federation of Hemophilia</i> (WFH). .....	- 68 -
Figure 14. Protocole opératoire de la méthode coagulométrique de mesure de l'activité pro-coagulante du FVIII.....	- 69 -
Figure 15. Protocole de mesure d'activité pro-coagulante du FVIII par la méthode chromogénique.....	- 70 -
Figure 16. Carte du plasmide pcDNA-FVIII-Lo.....	- 96 -

Figure 17. Dosage antigénique du FVIII produit par des cellules CHO (■), Huh7 (■) et HEK (■) en transfection transitoire.....	- 108 -
Figure 18. Western blot.....	- 111 -
Figure 19. Taux de FVIII:Ag mesurées par ELISA sur les 6 meilleurs clones .....	- 114 -
Figure 20. Mesure FVIII:Ag pour 6 clones Huh7 issus de cellules transfectées par la construction sans intron(pcDNA FVIII-BDD-WT) .....	- 114 -
Figure 21. Profil d'élution de FVIII à partir solutions reconstituées et dialysées de FVIII Lo pour les clones CHO 12/E1 et Huh7 AD12.....	- 116 -
Figure 22. Résultat des dosages de FVIII-antigène réalisés sur les plasmas des souris injectées faisant partie de la série B.....	- 122 -
Figure 23. Cinétique des concentrations antigénique de FVIII circulant chez les souris hémophiles A injectées par le plasmide pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) des deux séries.....	- 123 -
Figure 24. Cinétique des concentrations antigéniques moyenne de FVIII circulant chez les souris hémophiles A des deux séries .....	- 123 -

# INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Description des enzymes intervenant dans l'activation (■) et l'inactivation (■) du FVIII .....	- 57 -
Tableau 2. Compilation des mutations enregistrées dans la base de données CHAMPs (MAJ 2014).....	- 74 -
Tableau 3. Les concentrés de FVIII dérivés du plasma, disponibles en France. ....	- 81 -
Tableau 4. Historique des concentrés de FVIII recombinant de 1 <sup>re</sup> , 2 <sup>e</sup> , 3 <sup>e</sup> et 4 <sup>e</sup> générations.....	- 84 -
Tableau 5. Quantité de cellules et de milieu de culture utilisés en fonction du contenant de production.....	- 99 -
Tableau 6. Collection des données sur les souris HA injectées.....	- 103 -
Tableau 7. Résultats des dosages d'activités du FVIII dans les différents types cellulaires et en fonction de la construction utilisée lors de la transfection.....	- 110 -
Tableau 8. Dosage de l'activité pro-coagulante du FVIII produit par les clones issus de cellules transfectées par le pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) .....	- 117 -
Tableau 9. Collection des données sur les souris HA injectées.....	- 119 -
Tableau 10. Résultat des dosages antigéniques pour les souris de la série A .....	- 121 -
Tableau 11. Données concernant le prélèvement des plasmas des souris hémophiles A en vue de la mesure de l'activité procoagulante du FVIII-BDD (FVIII :C).....	- 124 -
Tableau 12. Récapitulatif des valeurs de FVIII-antigène (FVIII :Ag) et d'activité pro-coagulante du FVIII (FVIII :C) dans les plasmas des souris hémophiles A de la série B.-	125 -

# LISTE DES ABBRÉVIATIONS

<b>5-HT</b>	Sérotonine
<b>AAV</b>	Virus adéno-associé
<b>AC</b>	Anticorps
<b>ACMC</b>	Anticorps monoclonaux
<b>ACPC</b>	Anticorps polyclonaux
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADP</b>	Adénosine Di-Phosphate
<b>AMPc</b>	Adénosine Mono-Phosphate circulaire
<b>ARNm</b>	Acide Ribonucléique messenger
<b>AT</b>	Antithrombine
<b>ATP</b>	Adénosine Tri-Phosphate
<b>BDD-</b>	B-domaine délété
<b>Ca</b>	Calcium
<b>CMP</b>	Cytidine Mono-Phosphate
<b>CMV</b>	Cytomégalovirus humain
<b>CNX</b>	Calnexine
<b>CRT</b>	Calréticuline
<b>Cu</b>	Cuivre
<b>EPCR</b>	Récepteur endothélial à la protéine C
<b>F8</b>	Gène du FVIII
<b>FII</b>	Prothrombine
<b>FIIa</b>	Thrombine

<b>FIX</b>	Facteur IX
<b>FIXa</b>	Facteur IX activé
<b>FV</b>	Facteur V
<b>FVII</b>	Facteur VII
<b>FVIIa</b>	Facteur VII activé
<b>FVIII</b>	Facteur VIII
<b>FVIII:Ag</b>	Facteur VIII-antigène
<b>FVIII:C</b>	Activité procoagulante du FVIII
<b>FVIIIa</b>	Facteur VIII activé
<b>FX</b>	Facteur X
<b>FXa</b>	Facteur X activé
<b>FXI</b>	Facteur XI
<b>FXIa</b>	Facteur XI activé
<b>FXIII</b>	Facteur XIII
<b>FXIII-a</b>	Domaine a du FXIII
<b>FXIIIa</b>	Facteur XIII activé
<b>GC</b>	Guanylate cyclase
<b>GMPc</b>	Guanosine Mono-phosphate circulaire
<b>GPI</b>	Glycosylphosphatidylinositol
<b>HA</b>	Hémophile A
<b>HAV</b>	Virus de l'hépatite A
<b>HBV</b>	Virus de l'hépatite B
<b>HCV</b>	Virus de l'hépatite C
<b>HSP</b>	Heat-Shock protein ou protéine de choc thermique
<b>Il-6</b>	Interleukine 6

<b>LDL</b>	Lipoprotéine de faible densité
<b>LDLR</b>	Récepteurs des lipoprotéines de faible densité
<b>Lignée cellulaire BHK</b>	Lignée cellulaire immortalisée à partir de cellules rénales de bébé hamster
<b>Lignée cellulaire CHO</b>	Lignée cellulaire immortalisée à partir de cellules ovariennes de hamster chinois
<b>Lignée cellulaire HEK</b>	Lignée cellulaire immortalisée à partir de cellules rénales humaines
<b>Lignée cellulaire HUH7</b>	Lignée immortalisée à partir de cellules hépatiques humaines
<b>LRP1</b>	LDL-receptor-related protéine
<b>Mn</b>	Manganèse
<b>Na</b>	Sodium
<b>NO</b>	Oxyde nitrique
<b>PAI-1</b>	Inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1
<b>PAI-2</b>	Inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 2
<b>PAPS</b>	Phospho-adenosine polysulfates
<b>PC</b>	Protéine C
<b>PCa</b>	Protéine C activée
<b>pdFVIII</b>	FVIII issu du plasma
<b>PG</b>	Prostaglandine
<b>PKA</b>	Protéine Kinase A
<b>PKG</b>	Protéine kinase G
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>Ponts S-S</b>	Ponts disulfures
<b>PS</b>	Protéine S
<b>PS</b>	Protéine S

<b>PTM(s)</b>	<b>Modification(s) Post-traductionnelle(s)</b>
<b>RCPG</b>	Récepteurs couplés aux protéines G
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>rFVIII</b>	Facteur VIII recombinant
<b>SD</b>	Écart-type (Standard Deviation)
<b>t-PA</b>	Tissue-type plasminogene activator
<b>TAFI</b>	Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor
<b>TCA</b>	Temps de céphaline avec activateur
<b>TF</b>	Facteur tissulaire
<b>TFPI</b>	Tissue-factor Pathway inhibitor
<b>TM</b>	Thrombomoduline
<b>TP</b>	Taux de prothrombine
<b>TS</b>	Temps de saignement
<b>TxA<sub>2</sub></b>	Thromboxane A <sub>2</sub>
<b>u-PA</b>	Urokinase-type plasminogen activator
<b>UDP</b>	Uridine di-phosphate
<b>UGT</b>	UDP-glycosyltransferase
<b>UTR</b>	Région non traduite
<b>VIH</b>	Virus de l'immunodéficience humaine
<b>VWF</b>	Facteur von willebrand

# INTRODUCTION

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

- L'hémostase primaire, mécanisme réflexe qui ralentit le flux sanguin par vasoconstriction et met en jeu les plaquettes et le sous-endothélium afin de colmater la brèche vasculaire par la formation d'un « clou plaquettaire » ;
- La coagulation, étape au cours de laquelle l'activation des différentes protéines de la coagulation aboutit à la formation de thrombine qui transforme le fibrinogène soluble en fibrine et consolide ce premier agrégat de plaquettes pour former le caillot de fibrine ;
- La fibrinolyse qui dissout ultérieurement le caillot à mesure que la paroi vasculaire se réimperméabilise.

Ces processus complexes semblant intervenir de manière séquentielle sont pourtant initiés quasi-simultanément. Ainsi activations et inhibitions de l'intégralité de ses acteurs s'enchainent rapidement pour une action hémostatique ciblée, adaptée et contrôlée (voir *Figure 1*)

Lors d'une perte de l'intégrité vasculaire, le système de la coagulation s'active ; le sang quitte, de manière locale et contrôlée, l'état liquide pour l'état solide colmatant ainsi la brèche et entravant l'hémorragie. Des phénomènes physiologiques induisent donc la précipitation de nombreux composés du sang, moléculaires et cellulaires.

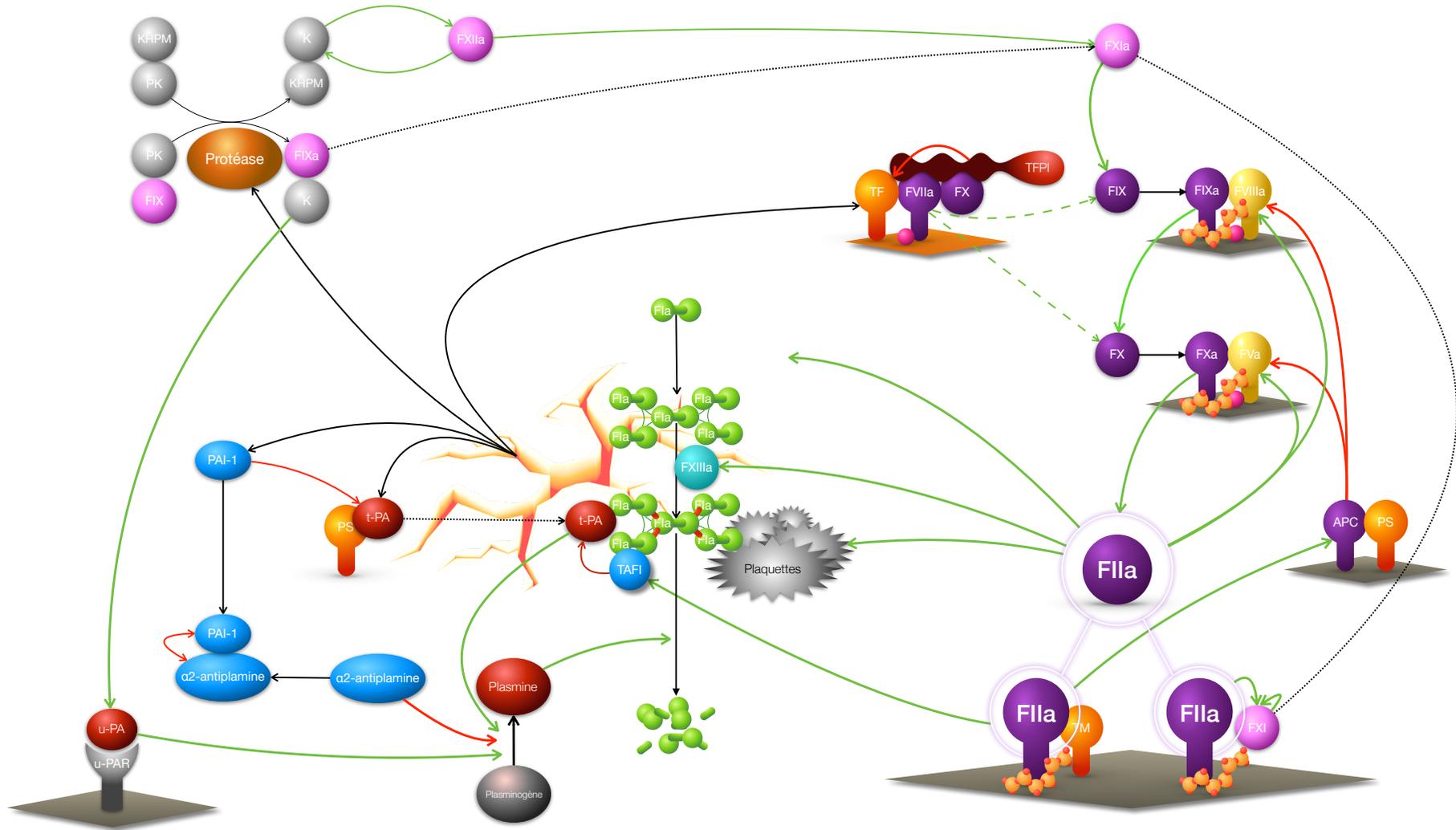


Figure 1. Schéma global et synthétique de la coagulation, de sa régulation et de la fibrinolyse.

Pourtant, afin de maintenir un flux constant par ailleurs, ce changement d'état ne doit concerner que les abords de la brèche. Les mécanismes anticoagulants intrinsèques à l'endothélium vasculaire s'opposent donc au déclenchement de ces réactions en chaîne de manière permanente. De plus, lorsque l'intégrité de ces vaisseaux est mise à mal, les tissus endothéliaux voisins cloisonnent le processus de coagulation.

## 1.1 Acteurs de l'hémostase primaire

### 1.1.1 Acteurs cellulaires

#### 1.1.1.1 Endothélium vasculaire

Composés de trois tuniques concentriques, les vaisseaux sanguins représentent les premiers acteurs de l'hémostase. Virchow classait son altération dans les trois critères majeurs de risque thrombotique au côté de modification hémodynamique et de certaines modifications de la composition sanguine (1).

L'intima, la couche la plus interne est formée de l'endothélium vasculaire, monocouche cellulaire séparée du sous endothélium par la membrane basale. Le versant abluminal permet l'ancrage de l'endothélium aux cellules musculaires lisses de la media, tandis que sa face luminale est en contact avec le sang circulant. Son rôle premier est sa fonction anti-thrombogène. Le sang circule contre cette paroi, transportant tous les acteurs de l'hémostase, primaire et secondaire, sans qu'aucun ne soit activé en situation physiologique. L'endothélium vasculaire empêche donc perpétuellement l'activation des plaquettes et régule négativement la coagulation. Pourtant, lorsque son intégrité est rompue, il acquiert la capacité d'initier l'agrégation plaquettaire et la coagulation.

#### 1.1.1.1.1 Endothélium thromborésistant

La composition protéique de sa membrane elle-même participe au maintien de la fluidité sanguine. Le glycocalyx est un feuillet riche en carbohydrates recouvrant l'intégralité de l'endothélium vasculaire sur lequel il est maintenu grâce à la présence de glycoprotéines et protéoglycans membranaires (2). Dans ce maillage dense, des éléments solubles issus du plasma ou sécrétés par l'endothélium sont « piégés ». Ces protéines ou protéoglycans

(complexes d'acides hyaluroniques, albumine, orosomucoïdes, héparanes sulfate, etc.) solubles participent à l'exposition de charge négative, imposant une sélectivité vis-à-vis des éléments capables d'approcher le glycocalyx et *a fortiori* l'endothélium (2). Ainsi, les plaquettes, les globules rouges et nombre d'autres éléments figurés du sang sont repoussés et maintenus dans le flux sanguin. Cette membrane est pourtant caractérisée par une extrême fragilité, qui participe autant à la difficulté d'étudier profondément la complexité du glycocalyx, qu'à la rapidité avec laquelle l'endothélium peut perdre sa fonction antithrombogène (3).

L'endothélium dispose également de capacités endocrines, directement impliquées dans sa fonction antithrombogène. Par le biais de la Nitric Oxyde Synthase (NO synthase), l'endothélium est une source du NO(4), gaz produit à partir de résidus L-arginines. Libéré au versant abluminal, il permet la relaxation des muscles lisses de la media et le maintien du vaisseau dans un état « relâché ». Lorsqu'il franchit la face luminale, il régule l'activation des plaquettes (5). Le NO, en tant que gaz, franchit aisément les membranes et active par effet réducteur les guanylate-cyclases (GC) cytosoliques. L'augmentation de Guanosine Mono-Phosphate circulaire (GMPc) (6). La protéine kinase G (PKG) est, à son tour, activée par le GMPc ainsi produit et les modulations des flux calciques permettent alors l'activation et la dégranulation plaquettaire (6). Pourtant, l'action des taux importants de NO produits par l'endothélium vasculaire provoque l'activation de voies cellulaires AMPc-dépendantes, surpassant la cascade de la PKG au profit de la PKA et s'oppose ainsi à l'activation plaquettaire (7).

De la même manière, la prostacycline produite par l'endothélium (8) induit l'activation de l'adénylate cyclase (AC) et l'accroissement des taux intracellulaires de AMPc maintenant les plaquettes dans un état inactif.

Bien que ces deux molécules soient produites de manière constitutive par l'endothélium, la thrombine a pour effet d'augmenter les taux sécrétés par les cellules endothéliales, étant ainsi à l'origine d'un rétrocontrôle négatif sur la propagation du thrombus (5). Par

ce mécanisme, les abords sains de la brèche vasculaire circonscrivent le phénomène d'agrégation plaquettaire.

Les cellules endothéliales sont également le lieu de synthèse et d'expression et/ou sécrétion de plusieurs facteurs protéiques empêchant la dissémination du phénomène de coagulation en neutralisant certaines protéines pro-coagulantes. Ces facteurs sont : la thrombomoduline (TM) (9), le Tissue-Factor Pathway Inhibitor (TFPI) (10) et le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR)(11).

Si la thrombomoduline membranaire ne dispose d'aucune activité enzymatique connue, elle est cependant capable de lier la thrombine au niveau de ses sites de fixation du fibrinogène, des plaquettes et du facteur V (FV). Elle induit donc une compétition de substrat réduisant l'activité procoagulante de la thrombine (9). Par ailleurs, cette liaison de la thrombomoduline à la thrombine permet un changement radical des fonctions de la thrombine. Liée à la thrombomoduline, la thrombine acquiert la capacité d'activer la protéine C et le Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI), dont les fonctions anticoagulantes et anti-fibrinolytiques seront détaillées (*2.5 Régulation de la réponse pro-coagulante*).

Le TFPI est retrouvé sous la forme de deux isoformes : le TFPI $\alpha$  soluble et d'origine plaquettaire et le TFPI  $\beta$  membranaire et d'origine endothéliale. Les deux isoformes sont capables, via leurs domaines K1 et K2, d'inhiber respectivement le facteur VII activé (FVIIa) et le facteur X activé (FXa) (10). (*2.5 Régulation de la réponse pro-coagulante*) Cependant les deux protéines étant issues de l'épissage alternatif du même gène, elles ont des spécificités différentes. Ainsi le TFPI  $\beta$ , capable de s'ancrer dans la membrane cellulaire par le biais d'une chaîne glycolipidique (GPI), inhibe le complexe ténase (FVIIa-TF) et le FXa depuis la surface de l'endothélium vasculaire. En revanche, le TFPI $\alpha$  ne possède pas de site d'ancrage similaire. Si son activité n'en dépend pas, il doit donc se lier à un cofacteur, la protéine S (PS, cofacteur de la protéine C), pour s'ancrer dans les membranes plaquettaires et inhiber le FXa. De plus, son extrémité C-ter exempte de

liaison à un glycolipide d'ancrage, possède une fonction d'inhibition de l'activation de la prothrombine en thrombine. Il peut donc, depuis la surface plaquettaire moduler la propagation de la coagulation dès les premiers instants suivant son initiation.(10)

Enfin le EPCR, exprimé à la surface des cellules endothéliales des larges vaisseaux (12) se lie à la protéine C, augmentant ainsi son taux d'activation d'un facteur 20 (13) participant au maintien d'une action locale des mécanismes pro-coagulants. (2.5 Régulation de la réponse pro-coagulante)

#### 1.1.1.1.2 Endothélium thrombogène

Comme l'illustre son appartenance à la triade de Virchow, une lésion de l'intégrité de l'endothélium vasculaire, en plus d'abolir l'activité anti-thrombogène de son manteau glycoprotéique, entraîne la production et la sécrétion de protéines hautement thrombogènes : le facteur tissulaire (TF) et le facteur Von Willebrand (VWF).

Le facteur tissulaire n'est pas constitutivement exprimé par les cellules directement en contact avec le sang que sont les endocytes. Seul un état inflammatoire ou pathologique(14, 15) est capable d'induire la production de TF par les cellules endothéliales et ainsi de favoriser la coagulation (voir 2.2 Phase d'initiation).

En revanche, l'endothélium vasculaire est le lieu de synthèse privilégié (16) du VWF alors stocké dans les corps de Weibel-Palade (17). A l'état physiologique, la sécrétion du VWF se fait au niveau basal et apical de la cellule endothéliale, et la cellule dispose de trois modes de sécrétion, adaptés au besoin en VWF (5).

La sécrétion basale se fait par exocytose simple dans l'espace sous-endothélial (18). Cependant, des pools de corps de Weibel-Palade peuvent fusionner avant la libération de grandes quantités de VWF (19). Enfin, une sécrétion de type « kiss-and-run » permet la formation d'un pore membranaire étroit n'autorisant la libération que de molécules de taille réduite et retenant les polymères de VWF de taille importante (20). Ces mécanismes variés permettent d'adapter la sécrétion du VWF aux besoins physiologiques.

### 1.1.1.1.3 Endothélium thrombolytique

L'endothélium vasculaire est également le site principal de la production de tissu-type Plasminogène Activator (t-PA) et de son inhibiteur le Plasminogène Activator Inhibitor 1 (PAI-1)

L'activité du t-PA, produit et sécrété parallèlement à son inhibiteur, est régulée par la présence de TAFI activé dans la circulation (21). Il transforme par protéolyse le plasminogène en plasmine, responsable de la dégradation des polymères de fibrine en résidus peptidiques : les D-dimères et autres produits de la dégradation de la fibrine, marqueurs sériques de l'activité fibrinolytique du plasma.

L'action du t-PA est extrêmement localisée, puisque son activité est fibrine dépendante. Il n'est donc capable d'activer le plasminogène qu'aux abords du caillot de fibrine.(22)

Enfin, l'annexine II dont le rôle est de lier et donc de réunir le plasminogène et ses activateurs permet une activation localisée de la fibrinolyse et empêchant ainsi tout risque hémorragique induit par cette voie.(23)

### 1.1.1.2 Plaquettes

#### 1.1.1.2.1 Structure

Les plaquettes comptent parmi les actrices principales de l'hémostase primaire. Ces cellules discoïdes et anucléées, formées dans la moelle, sont issues de la voie mégacaryocytaire et sont le fruit du bourgeonnement des mégacaryocytes. En conditions physiologiques, elles circulent à des taux normaux de  $150 \text{ à } 400 \cdot 10^9$  par litre de sang. Après leur migration depuis la moelle osseuse dans le sang, elles ont une durée de vie moyenne de dix jours. Au terme de cette durée, elles seront phagocytées dans le foie, la rate où retourneront dans la moelle osseuse.

En leur sein, des compartiments vésiculaires spécifiques concentrent les protéines et molécules nécessaires à leur fonction : activer d'autres plaquettes et initier le processus hémostatique. Ce n'est que lorsque qu'elles seront activées que le contenu de ces granules sera déversé dans la circulation sanguine.

Les granules alpha (granules  $\alpha$ ) comportent des protéines plaquettaires spécifiques comme le PF4 et la  $\beta$ -thromboglobuline ainsi que des protéines non-spécifiques : fibronectine, thrombospondine ou VWF (24).

Les granules denses regorgent de petites molécules telles que le calcium, l'adénosine triphosphate (ATP) et la sérotonine (5-HT) nécessaires également à l'activation plaquettaire et/ou au maintien des processus de coagulation (25).

Elles sont également caractérisées par des systèmes de canaux permettant une libération rapide de molécules dans leur environnement dès lors qu'elles sont activées. Le système canaliculaire ouvert est un réseau d'invagination membranaire améliorant les échanges de part et d'autre de leur membrane par augmentation de l'étendue de l'interface intra- et extracellulaire.(26) Le système tubulaire dense est lui un centre de synthèse analogue au réticulum endoplasmique responsable notamment de la production des prostaglandines et du stockage du calcium plaquettaire,(27) tous deux nécessaires à leur fonction dans l'hémostase.

#### 1.1.1.2.2 Activation

Les plaquettes peuvent donc être activées selon deux mécanismes : leur rencontre avec les couches plus internes de la paroi vasculaire et notamment le sous-endothélium ou par la présence d'agonistes dans la circulation sanguine.

##### 1.1.1.2.2.1 Activation par contact avec le sous-endothélium vasculaire

Les composants du sous-endothélium sont en effet hautement thrombogènes. Dans des conditions de flux normal, la reconnaissance des grands multimères du VWF et du collagène permet le ralentissement puis l'arrêt des plaquettes en une monocouche recouvrant la lésion vasculaire.

Si dans la circulation sanguine, la métalloprotéase ADAMTS13 fragmente les multimères du VWF alors incapables de se lier à des plaquettes non-stimulées, la longueur des

fragments leur permet d'être « déroulés » sous l'effet du flux sanguin et donc d'exposer des domaines de fixation au complexe glycoprotéique GPIb-V-IX (28).

Une fuite de sang hors des vaisseaux modifie la répartition laminaire des flux sanguins, provoquant le déroulement des multimères de VWF. Ils acquièrent donc leur pleine fonction au moment de la rupture vasculaire.

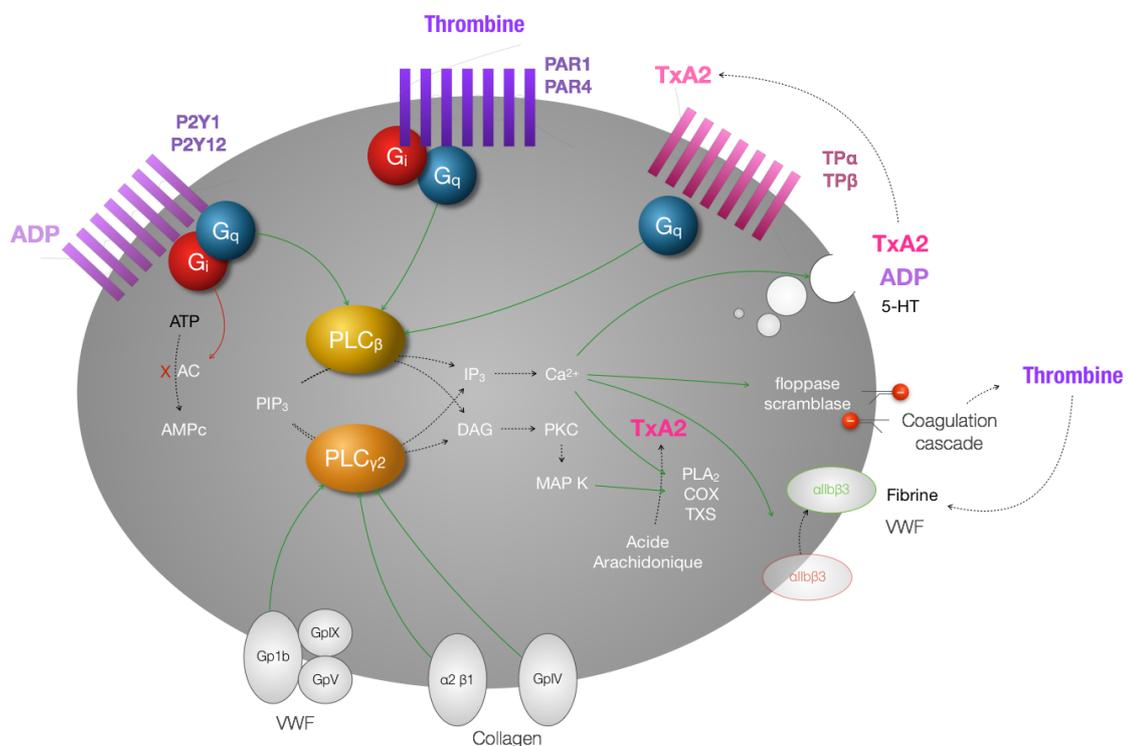
Cette perte sanguine se réduit à mesure que les plaquettes s'activent et colmatent la brèche. Parallèlement, par l'association d'un réflexe neuronal sur les cellules musculaires et la libération par les plaquettes (thromboxane, prostaglandines) et cellules endothéliales activées (endothélines, NO), une vasoconstriction est induite : le vasospasme. Cette vasoconstriction permet l'induction d'une nouvelle modification de flux, différente de celle de la rupture vasculaire. Elle permet également le déroulement des multimères de VWF, entretenant ainsi la réponse plaquettaire (29)

Avec l'action combinée du collagène liant la GPVI et l' $\alpha_2\beta_1$ , la liaison du VWF provoque l'activation intracellulaire de la voie de la phospholipase C (PLC)  $\gamma_2$ , elle-même responsable d'une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (voir *Figure 2*).

Cette augmentation du calcium intra-plaquettaire permet donc :

- L'activation des cyclooxygénases : l'acide arachidonique, issu de la transformation des phospholipides membranaires (phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine) par la phospholipase A<sub>2</sub>, est alors transformé en prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Celle-ci pourra alors être transformée en thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) par l'action de la thromboxane synthase. Le TxA<sub>2</sub>, en plus de son effet vasoconstricteur a la capacité à lier les récepteurs TP  $\alpha$  et  $\beta$  plaquettaire et donc induire leur activation (30) ;
- La dégranulation et la libération dans la circulation des activateurs plaquettaires solubles que sont l'ADP, l'ATP, le calcium et le TxA<sub>2</sub> ;

- Un réarrangement complet du cytosquelette plaquettaire: les plaquettes émettent des pseudopodes et s'amassent au niveau de la lésion vasculaire en une première couche de plaquettes liées entre elles par les polymères du VWF ;
- L'activation d'enzymes, floppase et scramblase, altérant l'asymétrie phospholipidique membranaire et permettant ainsi l'exposition de la phosphatidylsérine et donc l'exposition de charges négatives extraplaquettaires. La plaquette devient alors le siège de la cascade de coagulation aboutissant à la génération d'une grande quantité de thrombine (31).



**Figure 2. Activation plaquettaire.** La rencontre avec les composants du sous-endothélium (collagène et VWF) permet l'activation des plaquettes par activation de la voie de la PLC γ2 quand l'activation des récepteurs RCPG des agonistes solubles est relayée par la PLC β. Les deux enzymes permettent une augmentation des taux intra-plaquettaires de calcium. Cette augmentation est responsable des réponses membranaires (activation des intégrines, dégranulation, flip-flop phospholipidique) et de synthèse (TxA<sub>2</sub>).

#### 1.1.1.2.2 Activation par fixation de ligands solubles

La première couche plaquettaire ayant adhéré à la lésion vasculaire libère donc dans la circulation les agonistes solubles. Tous activent de différentes manières des récepteurs membranaires de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs à sept domaines transmembranaires sont eux-mêmes couplés au niveau intracellulaire à des protéines à activité GTPase dont les voies cellulaires diffèrent (voir *Figure 2*).

L'ADP reconnaît et fixe les récepteurs P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>12</sub> couplés à des protéines G<sub>i</sub> et G<sub>q</sub> (32). La protéine G<sub>i</sub> inhibe alors l'adénylate cyclase (AC) et provoque une chute de la transformation de l'ATP en AMPc (33) et la protéine G<sub>q</sub> participe à l'activation de la PLC β à l'origine de l'activation de voies de signalisation semblables à la PLC γ<sub>2</sub> (34).

Le TxA<sub>2</sub> se fixe quant à lui sur les récepteurs TP α et β couplés à des protéines G<sub>q</sub> activant la PLC γ<sub>2</sub> (35).

La thrombine, activée depuis la membrane de plaquettes activées, clive l'extrémité N-terminale des récepteurs PAR<sub>1</sub> et PAR<sub>4</sub>. La nouvelle extrémité N-terminale agit alors comme un agoniste intramoléculaire et permet l'activation de ces récepteurs. Les protéines G<sub>q</sub> et G<sub>i</sub> couplés au récepteur sont alors activées (36, 37).

C'est ainsi que la dégranulation des premières plaquettes accrochées au sous-endothélium, permet l'activation des plaquettes de la circulation. Celles-ci s'activent alors, renforcent le clou plaquettaire et libèrent à leur tour dans la circulation de grandes quantités d'agonistes. Elles participent ainsi la boucle d'amplification de la réponse plaquettaire.

#### 1.1.1.2.3 Agrégation

Les voies des PLC, initiées par la reconnaissance des agonistes solubles ou des agonistes du sous endothélium, et l'augmentation des taux intracellulaires en calcium en découlant, par ouverture de canaux ou mobilisation du calcium du RE, aboutissent également à la modification conformationnelle de l'intégrine majeure de l'agrégation plaquettaire : αIIb β<sub>3</sub> (38).

Ce signal, d'origine cytosolique, responsable d'activation de protéines membranaires est appelé signal « inside out ».

L'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  est capable de lier différents ligands selon les conditions de flux et des forces de cisaillement en découlant. En condition de flux faible, elle ne peut lier que le fibrinogène et la fibrine (39). Si les forces de cisaillement augmentent, alors les multimères de VWF se « déroulent » et se lient à  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  (40).

Le caractère divalent du fibrinogène et multimérique du VWF permettent la liaison à de mêmes molécules d'une ou plusieurs plaquettes. Ces molécules agissent donc comme des ciments et augmentent de manière considérable la stabilité du clou plaquettaire.

De plus, leur liaison à l'intégrine initie au niveau intracellulaire des signaux d'activation, appelés par opposition « outside in » (41). Ces signaux mettent en jeu des effecteurs à activité tyrosine kinase (Syk) responsables de l'adressage à la membrane de nouvelles intégrines, leur changement de conformation, permettant la liaison de nouvelles molécules de fibrine ou de VWF. Ces signaux induisent la dégranulation plaquettaire, des modifications du cytosquelette et de l'exposition des phospholipides anioniques sur la face externe de la bicouche lipidique (41).

La succession de signaux inside-out/outside-in est responsable d'une boucle d'amplification majeure dans la solidité du thrombus plaquettaire. Cette position centrale de l'intégrine  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , a conféré à cette molécule un potentiel majeur dans la recherche de nouvelles thérapies anti-agrégantes plaquettaires.

## 1.1.2 Acteurs plasmatiques

### 1.1.2.1 Facteur Von Willebrand

Le facteur VW est composé d'un nombre très hétérogène de multimères, synthétisés par les cellules endothéliales qui le libèrent dans le sous-endothélium par leur versant basal, ou dans le plasma. Il est également synthétisé par les mégacaryocytes et stocké dans les granules  $\alpha$  plaquettaires. (24)

La préproprotéine suit la voie sécrétoire cellulaire, traversant le RE et l'appareil de Golgi, après élimination de son peptide d'adressage, afin d'être correctement maturée. La proprotéine résultante se compose de plusieurs domaines :

- Les domaines D1-D2 du propeptide (16) ;
- Les domaines D'-D3 N-terminaux dont le D3 comporte le site de liaison au FVIII (42) ;
- Les domaines A1-A2-A3 ; le domaine A1 permet la liaison aux intégrines  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 et GpIb $\alpha$  et le domaine A2 est la cible d'ADAMTS13 responsable du clivage de la molécule ;
- Le domaine CK C-terminal impliqué dans la formation d'un pont disulfure entre deux monomères de VWF (pont inter-monomère) (43) ;
- Le domaine D4, les domaines B et les domaines C1-C2 permettent, après la formation du pont inter-monomère, l'adoption d'une conformation en bouquet de l'unité dimérique rapprochant ainsi les régions N-ter des deux monomères (16).

Des ponts disulfures seront ensuite formés entre les unités dimériques (pont inter-dimères) aboutissant à la forme multimérique du VWF (44). L'ensemble des « têtes » N-ter, liées les unes aux autres, adopte la conformation d'une hélice, compactant les nombreuses molécules de VWF pour un stockage efficace dans les organelles spécifiques : les corps de Weibel Palade (45).

Ce « zipping » est adopté dans des conditions de pH spécifiques aux réseaux golgiens et aux corps de Weibel Palade à des fins de stockage uniquement (46). Ainsi dans le RE, la molécule est adéquatement conformée par une synthèse efficace tandis que dans le sang, elle se soumet aux conditions dynamiques pour adopter une conformation fonctionnelle et déroulée ou circulante et empaquetée (47).

Amassées au niveau du centromère du réseau de microtubules cellulaires, ces vésicules sont transportées à la membrane et leur contenu exocyté. Diverses voies répondent à de multiples stimuli et permettent ainsi une régulation fine des sécrétions et adressages membranaires des cellules endothéliales en fonction des besoins physiologiques.

Le VWF est libéré par élimination du propeptide D1-D2. Les monomères restent pourtant liés par le pont inter-monomères. Se détache alors une chaîne de monomères pouvant atteindre un poids moléculaire supérieur à 20000 KDa.

La fixation, sur les récepteurs endothéliaux, de ligands induisant une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium occasionne l'exocytose de tous les corps de Weibel Palade de la cellule et ainsi la sécrétion de grandes quantités de vWF. Ces mêmes ligands induisent également l'adressage à la membrane de la sélectine P, impliquée dans le recrutement cellulaire (plaquettes, cellules de l'immunité). En revanche, une augmentation des taux d'AMPc provoque la libération des corps contenant le vWF mais très pauvres en sélectine P (48).

Libéré dans le sang, le VWF est à son maximum d'activité pro-agrégante. Rapidement il sera clivé en unités multimériques plus petites, rapidement éliminées (28).

C'est une fois libéré dans la circulation qu'il jouera son rôle de chaperonne du FVIII. Sa libération impliquant la suppression du propeptide permet en effet la formation du complexe de haute affinité avec le FVIII (49). Dès lors qu'il sera protéolysé en multimères de taille inférieure, cette affinité diminue (49). De plus, lorsqu'il est soumis à des forces de cisaillement pathologiques (vasoconstriction, rupture vasculaire), le multimère de VWF adopte une conformation dépliée qui provoque la libération du FVIII et, par la présentation de son domaine A1, un basculement vers un rôle exclusivement pro-agrégant.

Paradoxalement, ce même changement conformationnel soumet la molécule à la protéolyse par la sérine protéase ADAMTS13, responsable du clivage et de la dégradation du VWF (29).

L'association de l'ensemble de ces caractéristiques est à l'origine de son importance au sein de la coagulation et de l'hémostase. Il est nécessaire, par son effet protecteur, à la présence du FVIII dans la circulation et il joue un rôle direct dans l'agrégation plaquettaire par la liaison aux intégrines ( $\alpha$ IIb  $\beta$ 3, GP1b $\alpha$ ). Ainsi lors d'un même changement conformationnel, induit par une situation pathologique, il libère *in situ* l'un des acteurs

majeurs de la coagulation tout en acquérant sa fonction intrinsèque d'activateur de l'agrégation plaquettaire.

#### 1.1.2.2 Fibrinogène et fibrine

Circulant à 1,5 à 4 g/L de plasma (50) chez un individu normal, le fibrinogène est le troisième composant protéique majoritaire du plasma ensuite de l'albumine et des immunoglobulines (51). Il joue un rôle important dans de nombreuses fonctions physiologiques et physiopathologiques essentielles comme l'hémostase, la cicatrisation tissulaire, l'inflammation et l'angiogenèse (52).

Synthétisées dans les hépatocytes, les trois chaînes sont rapidement assemblées au sein du réticulum endoplasmique avant la sécrétion. Cette synthèse est hautement régulée pour permettre une réponse adaptée au besoin de l'organisme et notamment à l'inflammation par l'interleukine 6 (Il-6) et nombre d'autres cytokines pro-inflammatoires (53, 54).

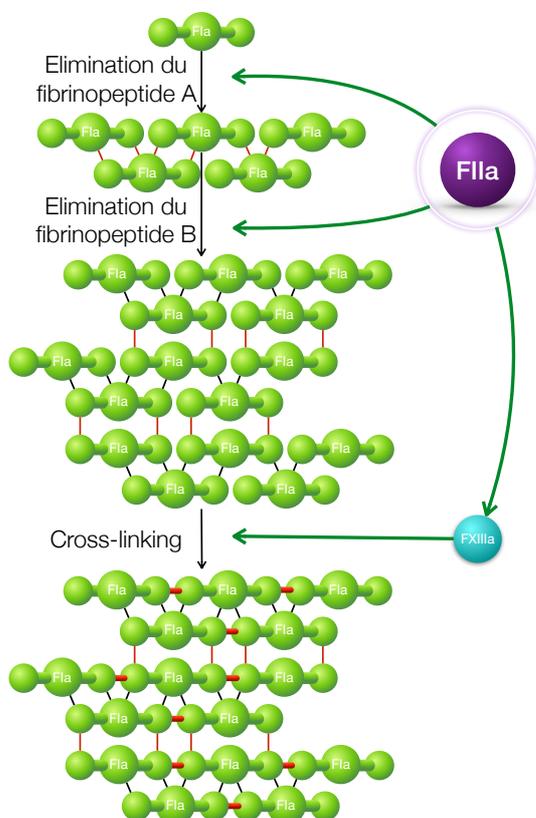
Le fibrinogène est composé de deux monomères, eux-mêmes constitués de trois chaînes polypeptidiques ( $A\alpha$ ,  $B\beta$  et  $\gamma$ ) convergeant toutes vers la région centrale de la glycoprotéine, E-region, où sont réunis les sites de clivage par la thrombine (55, 56).

Cette région E est reliée par une super-hélice (coiled-coil région) formée de l'enroulement des 3 chaînes polypeptidiques jusqu'au domaine D comportant les sites de liaisons aux autres molécules de fibrinogène, essentiels à la polymérisation (57). C'est dans cette région D que se situent les domaines terminaux des chaînes  $B\beta$  et  $\gamma$ , tandis que la chaîne  $A\alpha$  quitte cette région pour former une boucle de 350 AA supplémentaire ( $\alpha$ C-Region) (58).

Dans le processus hémostatique, la cascade de la coagulation aboutit à la formation de thrombine. La thrombine clive alors la molécule de fibrinogène, modifiant alors sa solubilité plasmatique en permettant la création du gel ou caillot de fibrine (52). En effet, après l'élimination des duos de fibrinopeptides A et B constitutifs des domaines C-ter des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  au niveau du domaine E central ; le fibrinogène devient fibrine (59).

L'élimination des deux fibrinopeptides A, permet l'exposition de sites de fixation du domaine D et autorise la molécule de fibrine à se lier à deux autres molécules, chacune d'elles étant capable de se fixer à une molécule supplémentaire. Cet assemblage permet la formation des premiers polymères de fibrine : la protofibrille (60, 61) (voir *Figure 3*).

L'élimination du fibrinopeptide B, plus lent que celle du fibrinopeptide A, permet l'exposition d'un autre site de fixation du domaine E au sein du domaine B et la libération de la boucle  $\alpha$ , nécessaire à l'action du Facteur XIII (FXIII) pour créer de nouvelles interactions intermoléculaires au sein des fibres de fibrine (61) (voir *Figure 3*).



**Figure 3. Fibrinoformation.** La thrombine élimine les fibrinopeptides A et B séquentiellement. L'élimination du fibrinopeptide A permet la formation de liaisons entre le domaine E central d'une première molécule de fibrine et 2 domaines D périphériques de deux autres molécules créant la protofibrille. L'élimination du fibrinopeptide B permet la liaison entre les domaines D des monomères appartenant à deux protofibrilles différentes permettant la création de la fibre de fibrine. Enfin, le FXIIIa permet la formation de cross-links entre les chaînes  $\alpha$  et  $\gamma$  des protofibrilles modifiant les caractéristiques physiques de la fibre.

En effet, le FXIIIa est une transglutaminase activée par la thrombine et dont l'activité enzymatique, portée par le domaine a (FXIII-a), permet l'augmentation de la densité des fibres de fibrine, diminue leur porosité en resserrant le maillage fibreux et l'augmentation de la résistance à la lyse (62).

L'activité enzymatique du FXIIIa se traduit par la création de ramification (« cross-linking ») entre les chaînes des molécules de fibrine. Ainsi, la liaison entre deux chaînes  $\gamma$  augmente la densité (63), tandis que les liaisons entre deux chaînes  $\alpha$  influence la tension et la rigidité des fibres (48), réduit la sensibilité à la fibrinolyse (64, 65) en réduisant notamment l'accessibilité des super-hélices  $\alpha \beta \gamma$  par la plasmine (66). Enfin, des liaisons entre les chaînes  $\alpha$  et  $\gamma$  résultent aussi de l'action du FXIIIa (67).

Le FXIIIa permet également l'apparition de ramification entre les chaînes de la fibrine et d'autres molécules diminuant la susceptibilité de la fibre à la protéolyse :

- L' $\alpha$ 2-antiplasmine se lie aux chaînes  $\alpha$  protégeant la fibre de l'action de la plasmine (68) ;
- Le TAFI empêche la liaison du t-PA sur les fibres de fibrine. Le rôle du t-PA dans l'activation du plasminogène en plasmine est dépendant de sa fixation aux fibres de fibrines (69) ;
- Le PAI-2 (Plasminogen Activator Inhibitor type 2) se lie aux chaînes  $\gamma$  des monomères de fibrine et permet l'inhibition de l'action activatrice du t-PA sur le plasminogène chez la femme en gestation (70).

La plasmine, enzyme de la famille des protéases à sérine, est l'agent majeur de la fibrinolyse (71). Par son action protéolytique, elle dégrade les fibres au niveau des super-hélices  $\alpha\beta\gamma$  en produits de dégradation de la fibrine (FDP) de taille variable et dont les plus petits sont composés de deux domaines D reliés par la liaison des régions  $\alpha C$  (D-dimères) (72).

La conversion du plasminogène en plasmine est médiée par deux activateurs principaux : le tissu-type Plasminogen Activator (t-PA) et l'urokinase-type Plasminogen Activator (u-PA) (73). En plus d'héberger des agents protecteurs, la fibrine joue également le rôle de surface catalytique pour les enzymes impliqués dans sa propre dégradation (51). En effet, le domaine kringle du plasminogène, en plus d'être le site de sa liaison à l' $\alpha$ 2-antiplasmine, lui permet de se lier aux résidus lysine C-terminaux créés sur la fibrine au cours de sa formation (74, 75). D'autre part, la fixation du t-PA sur les fibres de fibrine induit une

colocalisation de l'enzyme et de son substrat, le plasminogène, augmentant l'activité du t-PA d'un facteur 100 (76).

La résistance de la fibre de fibrine est hautement corrélée au nombre de fibres d'avantage qu'à leur épaisseur. En effet, si une fibre épaisse est plus lentement protéolysée qu'une fibre plus fine, un caillot comportant un nombre plus important de fibres fines est plus lentement dégradé qu'un caillot composé d'une quantité moindre de fibres épaisses (51). Ceci s'explique par la perméabilité amoindrie du caillot aux agents de la fibrinolyse (t-PA, plasminogène, plasmine) lorsque le nombre de fibres augmente. De plus, les fibres périphériques fixent le t-PA et le plasminogène. Plus le nombre de fibres augmente, plus le nombre de molécules de t-PA et de plasminogène fixé, rapporté à ce nombre, diminue (51).

## 2 Hémostase secondaire ou coagulation

### 2.1 Complexes moléculaires

Le cœur primaire de l'hémostase secondaire se compose de quatre complexes enzymatiques majeurs impliquant tous des enzymes vitamino-K dépendantes que sont les FVIIa, facteur IX activé (FIXa), FX activé (FXa) et la thrombine (FIIa) (77).

Le FXa, enzyme-clé du complexe prothrombinase, est activé par protéolyse par les complexes ténases intrinsèques et extrinsèques appartenant aux deux voies d'activation du même nom.

La voie intrinsèque aboutit à la formation d'un complexe ténase formé des FIXa, FVIIIa liés à une membrane phospholipidique activée et en présence de calcium.

La ténase extrinsèque se compose quant à elle du FVIIa et du facteur tissulaire (FT) ancrés à la bicouche lipidique en présence de polyphosphates et de calcium (78).

Tous ces complexes sont ainsi dotés d'une activité sérine-protéase vitamino-K dépendante et sont ancrés dans les parois lipidiques des cellules activées et donc à proximité du site de la lésion vasculaire.

Ces protéines se lient aux membranes cellulaires grâce à leur domaine GLA issu de la  $\gamma$ -carboxylation de leur résidu Glu. La régénération de la  $\gamma$ -carboxylase responsable de cette réaction est dépendante de la vitamine K (79). L'absence de cette vitamine aboutit à la production hépatique de protein induced by vitamin K absence (PIVKA)(80) non-fonctionnelles puisque incapables de se lier aux membranes cellulaires activées.

Les cofacteurs de ces sérine-protéases vitamino-K dépendantes peuvent être des protéines circulantes sous forme inactive comme le facteur VIII (FVIII) et V, cofacteurs des FIXa(81) et FXa(82) respectivement ou être des protéines transmembranaires et donc déjà présentes sur la surface cellulaire comme tels que la thrombomoduline (9) et le TF (83), cofacteurs des FIIa et FVIIa. Tous ces cofacteurs permettent une augmentation d'un facteur  $10^4$  à  $10^9$  de l'activité de l'enzyme dont ils catalysent la réaction.

Au concept désuet de coagulation en cascade, la communauté scientifique préfère le modèle cellulaire, proposé par Hoffman en 2001 (84). Ce modèle rétablit l'importance des membranes cellulaires dans le déroulement des processus de coagulation. En effet, le modèle en cascade offrait un point de vue séquentiel de l'activation des différents acteurs pourtant bien souvent activés de manière concomitante, sans notion de localisation cellulaire de l'intégralité de ces réactions enzymatiques.

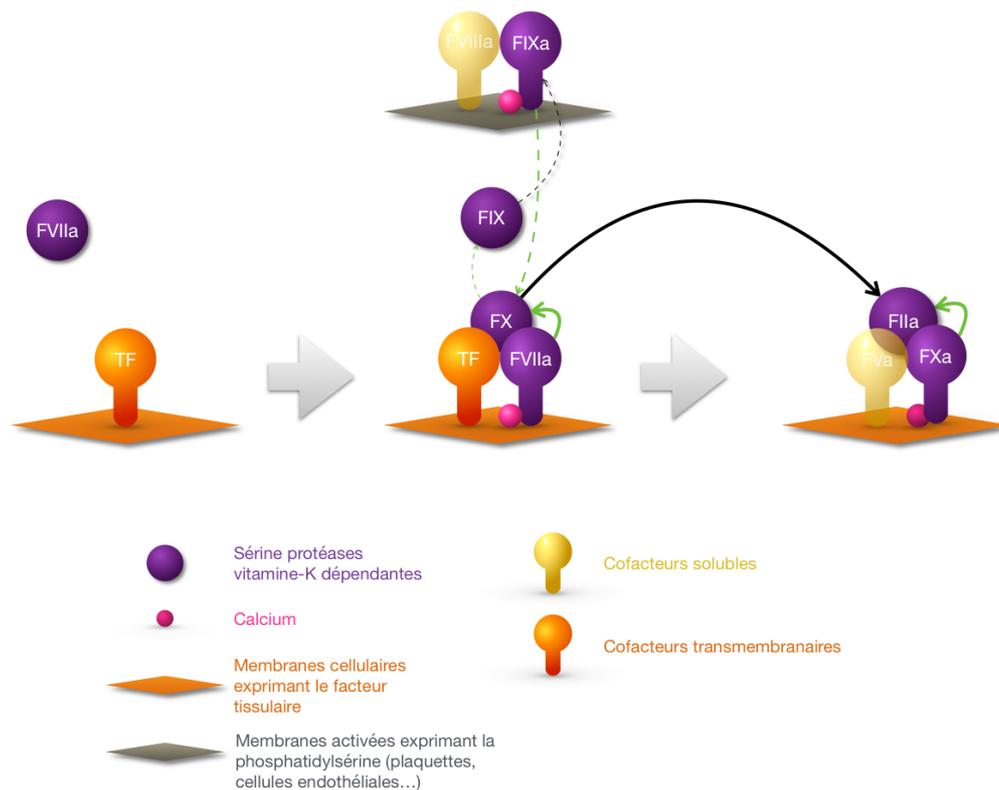
Le modèle cellulaire se découpe donc en trois phases. La phase d'initiation correspond à la voie intrinsèque du modèle en cascade et illustre la mise en place des premiers acteurs de la coagulation et la production des premières traces de thrombine. La phase d'amplification rend compte de l'augmentation de la vitesse de production de la thrombine dès lors que les premières traces sont formées, par la mise en place de boucles d'amplification. La phase de propagation s'oppose à la phase d'initiation par la diffusion des réactions à d'autres surfaces cellulaires. En effet, la phase d'initiation concerne les membranes cellulaires exprimant le facteur tissulaire que sont les cellules musculaires lisses et les fibroblastes du sous endothélium tandis que la phase de propagation permet la mise en jeu des membranes activées des plaquettes et de l'endothélium exprimant les phospholipides anioniques. Ces phosphatidylsérines permettent la fixation sur les membranes des trois complexes enzymatiques majeurs de la coagulation.

## 2.2 Phase d'initiation

La ténase extrinsèque, formée secondairement à un contact entre le sang et les tissus sous-endothéliaux, réunit sur la membrane des cellules du sous-endothélium, le FVIIa, retrouvé à l'état de trace dans le compartiment circulant (85), et le TF présenté par le sous-endothélium vasculaire ou par les membranes plaquettaires activées. Le complexe ainsi formé recrute, puis clive le FX en FXa et, à moindre mesure, le FIX en FIXa (86).

Seul, le FVIIa circulant est dénué d'activité et la liaison à son cofacteur, le TF, est nécessaire à la formation des FIXa et FXa.

Le FXa clive et active la prothrombine (FII) en FIIa (87), l'acteur majeur de la cascade de la coagulation mais également de l'initiation des systèmes anticoagulant et fibrinolytique stimulés de manière quasi-simultanée plus que séquentielle (88) (voir Figure 4).



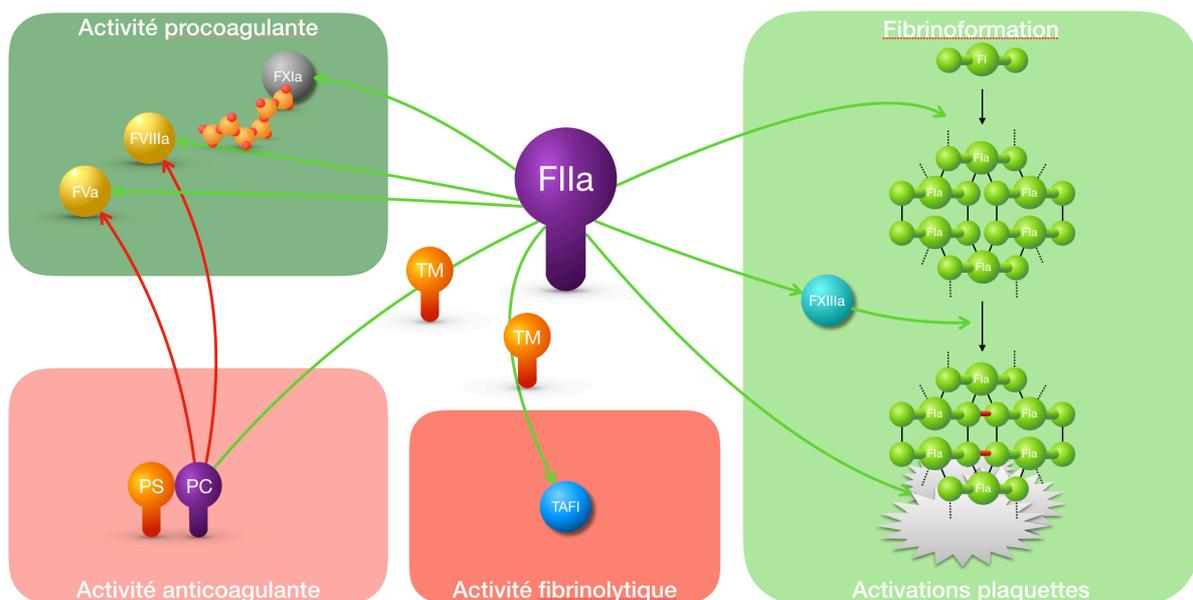
**Figure 4. Phase d'initiation de la coagulation.** Le TF exprimé à la surface des cellules musculaires lisses et des fibroblastes du sous-endothélium lie et active le FVII en FVIIa. Le complexe membranaire est alors capable de cliver les FX et FIX. Les premières traces de FX initient l'activation de la prothrombine en thrombine tandis que le FIXa accroît la production du FX.

## 2.3 Phase d'amplification

La thrombine joue en effet un rôle essentiel dans les boucles d'amplification du processus hémostatique (voir *Figure 5*) par sa capacité à activer :

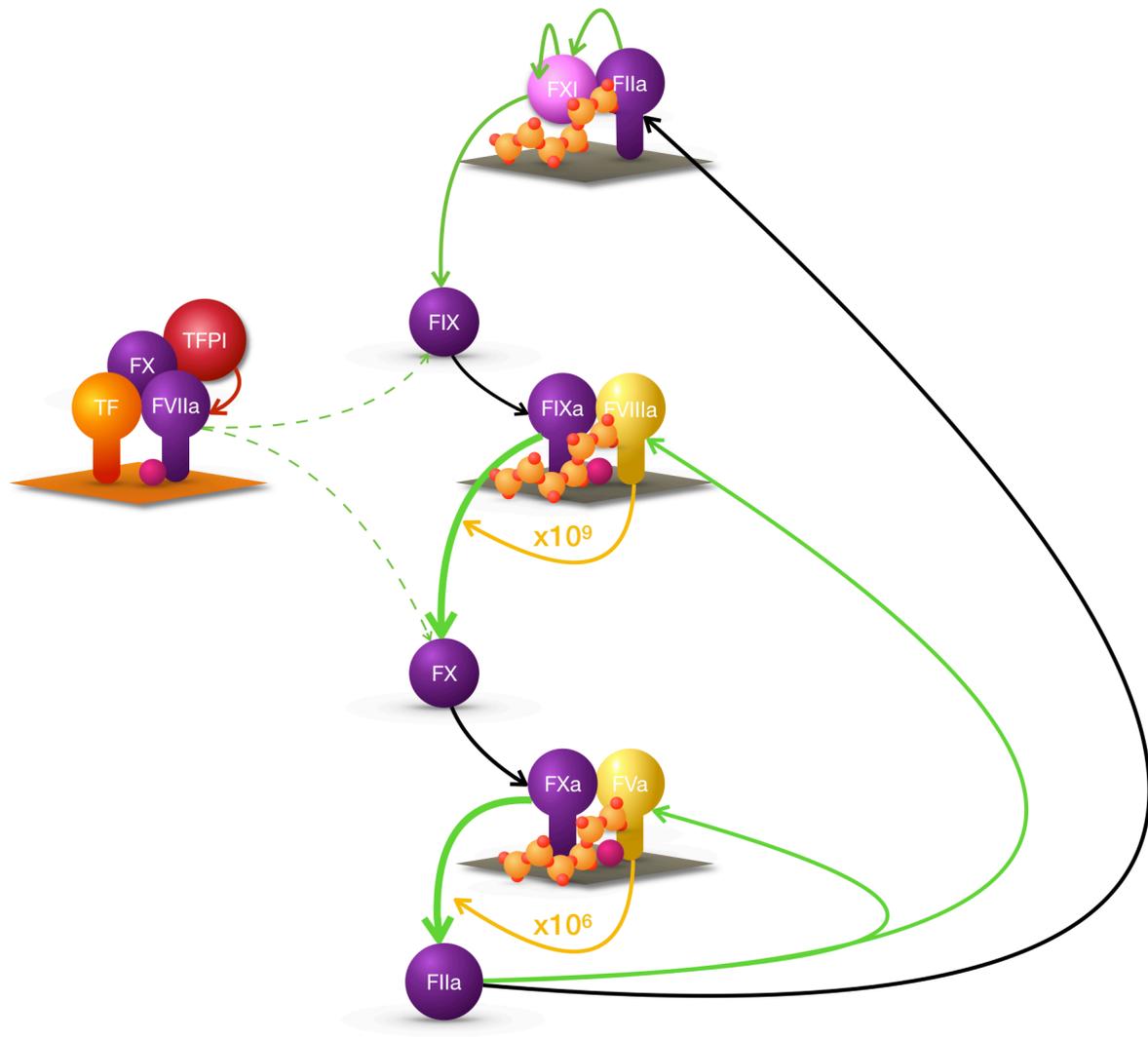
- Les plaquettes ;
- Les cofacteurs des FXa et FIXa que sont les facteurs V et VIII activés (FVa et FVIIIa) ;
- Le FXIII en FXIIIa, initiateur de ponts covalents entre les fibres de fibrine.

La thrombine formée au terme de la phase d'initiation occupe une place centrale dans le développement du processus de coagulation. Clivé par la thrombine, le fibrinogène s'assemble en multimères insolubles appelés fibrine. Ce réseau de fibrine enserre et stabilise l'amas plaquettaire formé au niveau de la brèche vasculaire.



**Figure 5. La place centrale de la thrombine.** La thrombine (FIIa) favorise sa propre génération par sa capacité à activer les acteurs de la phase d'amplification. Elle permet ainsi un accroissement de production de thrombine responsable de la formation des fibres de fibrine à partir du fibrinogène et leur stabilisation via l'activation du FXIII. Elle est responsable également du recrutement et de l'activation plaquettaire permettant ainsi la phase de propagation, multipliant les surfaces de support à la coagulation. Associée à la thrombomoduline, elle est l'activateur du TAFI (**Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor**), inhibiteur des effets des activateurs de la plasmine et joue donc un rôle antifibrinolytique. Paradoxalement, toujours liée à la thrombomoduline, elle est l'activateur du complexe protéine C/protéine S, complexe majeur de l'inhibition des cofacteurs de la phase d'amplification : les FVa et FVIIIa. Elle participe donc activement à l'arrêt de la coagulation.

La quantité de thrombine initialement générée étant insuffisante, la thrombine est capable d'induire une amplification de sa formation. Elle clive et active pour cela les FV (89) et FVIII (90) de la coagulation, cofacteurs des FXa et FIXa respectivement. Le FVa se liera au FXa pour former le complexe prothrombinase, augmentant la vitesse de formation de la thrombine d'un facteur  $3 \cdot 10^5$ . De même, le complexe ténase, associant les FIXa et FVIIIa, permet une augmentation de  $10^9$  fois de l'activité enzymatique du FIX (voir Figure 6).



**Figure 6. Phase d'amplification de la coagulation.** Les premières molécules actives de thrombine permettent l'activation des FVIII et FV, cofacteurs des FIX et FXa respectivement. Ces protéines sont capables d'augmenter l'activité enzymatique des FIX et FXa aboutissant à la formation d'une boucle de régulation positive de la coagulation incluant des complexes ténase, prothrombinase et la thrombine : FIX -> FX -> FII -> FIX + FX. Cette augmentation de la production de thrombine permet de produire de grandes quantités de fibrine à partir du fibrinogène soluble et de cimenter le caillot sanguin.

La thrombine active également le facteur XI (FXI), alors capable d'activer le FIX, amplifiant alors indirectement la production de FXa et de thrombine elle-même.

Le complexe ténase intrinsèque, ayant une activité 50 fois supérieure au complexe formé du FVIIa et du TF, devient alors la source majeure de production du FXa et ainsi de FIIa (91, 92).

L'inactivation rapide du complexe extrinsèque FVIIa-TF par le TFPI d'une part (93), et la nette supériorité de la ténase intrinsèque d'autre part (94) sont les deux raisons majeures de la place cruciale des composants du complexe FVIIIa-FIXa dans la formation d'un caillot stable.

## 2.4 Phase de propagation

Si dans les premiers instants qui suivent la rupture vasculaire, les processus de coagulation s'initient sur des membranes exprimant le TF, les plaquettes interviennent rapidement sur le site de la lésion.

Leur activation par contact avec les cellules du sous-endothélium, par liaison d'agonistes solubles qu'elles sécrètent elles-mêmes et par la thrombine, modifie la composition en phospholipides de la couche externe de leur membrane. L'expression de phospholipides anioniques transforme ainsi ces cellules en site de choix pour la fixation des complexes enzymatiques de la coagulation.

Les cellules endothéliales proches subissent les mêmes réarrangements membranaires suite à leur activation. De plus, dès lors qu'elles sont activées, elles sécrètent le TFPI, inhibiteur précoce de la ténase extrinsèque.

Ainsi, tandis que les voies TF dépendantes sont peu à peu inhibées, les membranes des plaquettes et les cellules endothéliales deviennent le siège d'intenses réactions enzymatiques dès lors qu'elles sont activées. L'étendue sur laquelle peuvent donc s'exercer les réactions impliquées dans la coagulation s'en retrouve donc considérablement amplifiée, tout en restant limitée aux abords de la lésion vasculaire.

Les facteurs de la coagulation sont donc activés en quantité infiniment supérieure à la phase d'initiation, du fait de l'existence de boucles d'amplification FIIa-FIXa-FIXa/FVIIIa-FXa, et de l'activation par la thrombine, en quantité croissante, de nouvelles plaquettes.

Le déclenchement rapide de la réponse anticoagulante par les premières traces de thrombine participe à une propagation limitée à ces membranes plaquettaires activées. Les acteurs enzymatiques ne peuvent alors exercer qu'une action fugace, avant d'être inactivés, leur nombre et leur activité permettant une réponse adaptée.

La balance entre intensité de la production des facteurs, rapidité de leur action s'ils sont fixés sur des membranes adéquates et en présence de leurs cofacteurs ainsi que la vitesse de leur inactivation est la principale explication de l'efficacité et de la précision des étapes de la coagulation.

## 2.5 Régulation de la réponse pro-coagulante

Le TFPI, produit par les cellules endothéliales est capable de se lier au FXa lorsqu'il s'est fixé au complexe FVIIa-TF. Il est ainsi capable d'inhiber réversiblement le FXa et d'inactiver le complexe ténase extrinsèque de manière FXa-dépendante, ralentissant le processus d'amplification de la coagulation par la diminution induite de la formation du FXa et de la thrombine.(10)

Si le TFPI n'est capable que de ralentir le processus hémostatique, d'autres mécanismes anticoagulants initiés par la thrombine permettent d'inhiber la coagulation.

Le complexe formé de la thrombine et de la thrombomoduline membranaire est capable d'activer la protéine C ainsi que son cofacteur la protéine S. Le complexe protéine C activée (PCa) se lie au complexe prothrombinase ou ténase intrinsèque afin d'inactiver par protéolyse les FVa et FVIIIa, freinant l'intégralité de la voie commune de la coagulation.

L'association du TFPI et du complexe PCa/PS est capable d'inhiber la formation de thrombine.

Parallèlement, la présence d'héparanes sulfate sur la surface des cellules endothéliales permet à l'antithrombine en circulation de former des complexes ternaires avec ses cibles enzymatiques : FIIa, FIXa, FXa, FXIa et FXIIa. Si l'héparane sulfate ne lie pas essentiellement les enzymes cibles de l'AT, il est néanmoins nécessaire à une activité inhibitrice efficace. Une fois l'AT liée à sa cible, une modification induite de sa conformation rend cette liaison covalente et donc irréversible. Le complexe AT-enzyme cible se détache ensuite des héparanes sulfate et se retrouve en circulation avant de lier des récepteurs hépatiques et d'être ainsi internalisé.

Les héparanes sulfate ainsi libérés sont à nouveau capables de lier l'AT et de participer à nouveau à l'inhibition de nouvelles enzymes cibles de l'AT.

### 3 Le Facteur VIII

#### 3.1 Introduction

La réaction en chaîne aboutissant à la formation du caillot de fibrine est donc nécessaire au maintien de l'intégrité vasculaire et donc du volume sanguin.

C'est pourquoi, l'activation rapide et séquentielle des ténases extrinsèque et intrinsèque et de la prothrombinase permettant la formation et la stabilisation du caillot de fibrine sont cruciaux.

Le FVIII est le cofacteur essentiel du FIXa avec lequel il forme un complexe responsable de la formation de 90 % de la thrombine produite suite à une brèche vasculaire. Une mutation du gène *F8* de laquelle découle un déficit quantitatif et/ou qualitatif en FVIII conduit à l'expression clinique de l'hémophilie A.

L'hémophilie A est un trouble de la coagulation d'origine génétique et transmis sur un mode récessif et lié au chromosome X. Elle est caractérisée par des saignements disproportionnés, non spontanément résolutifs, induits ou spontanés particulièrement au niveau des articulations (hemarthroses), des muscles (hématomes).

Le traitement consiste en une thérapie substitutive par apport intraveineux du facteur de la coagulation manquant. Si les premiers substituts injectés ont été le sang total,

l'amélioration des techniques de purification puis le clonage du gène *F8* ont rapidement permis l'utilisation de FVIII dérivé du plasma (pdFVIII) puis de FVIII recombinant (rFVIII) produit par Génie Génétique.

Le facteur VIII est caractérisé par un nombre très important de modifications post-traductionnelles. Ces modifications dont l'importance s'est établie lentement au sein de la communauté scientifique semblent devoir être considérées dans l'élaboration et la production de rFVIII et dans le ciblage cellulaire au cours d'essais de thérapie génique.

### 3.2 Gène du FVIII

Cloné pour la première fois en 1984 (95, 96), le gène *F8*, long de 186 kbp et localisé sur le bras long du chromosome X, fait partie des plus grands gènes du génome humain. Il se compose de 26 exons dont les tailles varient de 69 à 262 kbp et dont les exons 14 et 26 sont les plus longs avec des tailles respectives de 1959 et 3106 bp. L'exon 26 code pour la région 3' non traduite (UTR) et l'exon 14 pour le domaine B du FVIII qui est le plus grand domaine de la protéine. La taille des introns varie quant à elle de 0,2 à 3,5 kbp et la taille totale en séquence codante est de 9 kbp.

L'intron 22, séquence épissée la plus longue du gène *F8*, contient une région riche en CpG et a une fonction unique de promoteur bidirectionnel à l'origine de deux transcrits (97).

Le premier, appelé F8A et de 200 kb, est transcrit en anti-sens du gène *F8*. Sans intron propre, l'intégralité de sa séquence est contenue dans l'intron 22. Deux autres copies de ce gène existent au niveau télomérique du chromosome X, à une distance de 300-400 kbp du gène *F8* (98), ce dont résulte un grand nombre de réarrangements intra-chromosomiques aboutissant à une inversion de l'intron 22 et à une fermeture prématurée de la phase de lecture ouverte du gène *F8*.

Le second, F8B, est transcrit dans le même sens de lecture que le gène *F8* et se compose de 5 exons ; le premier lui est propre et se compose de 24 pb et les 4 autres sont les exons 23 à 26 du transcrit du gène *F8* (98) correspondant au domaine C du FVIII.

Si la fonction du F8B n'est pas connue, il a été démontré que le F8A code pour une protéine, HAP40, liant l'Huntingtine, et participant à sa fonction notamment par son bon adressage à la membrane (99).

Les premières transplantations hépatiques réalisées sur des hémophiles A ont permis la disparition du phénotype hémophilique, laissant suspecter une production hépatique du FVIII et ainsi une expression génique dite « tissu-spécifique ». Pourtant, l'hépatectomie chez le sujet sain n'étant pas responsable d'apparition d'un déficit en FVIII, l'existence de foyers de production ectopiques fut retenue (100).

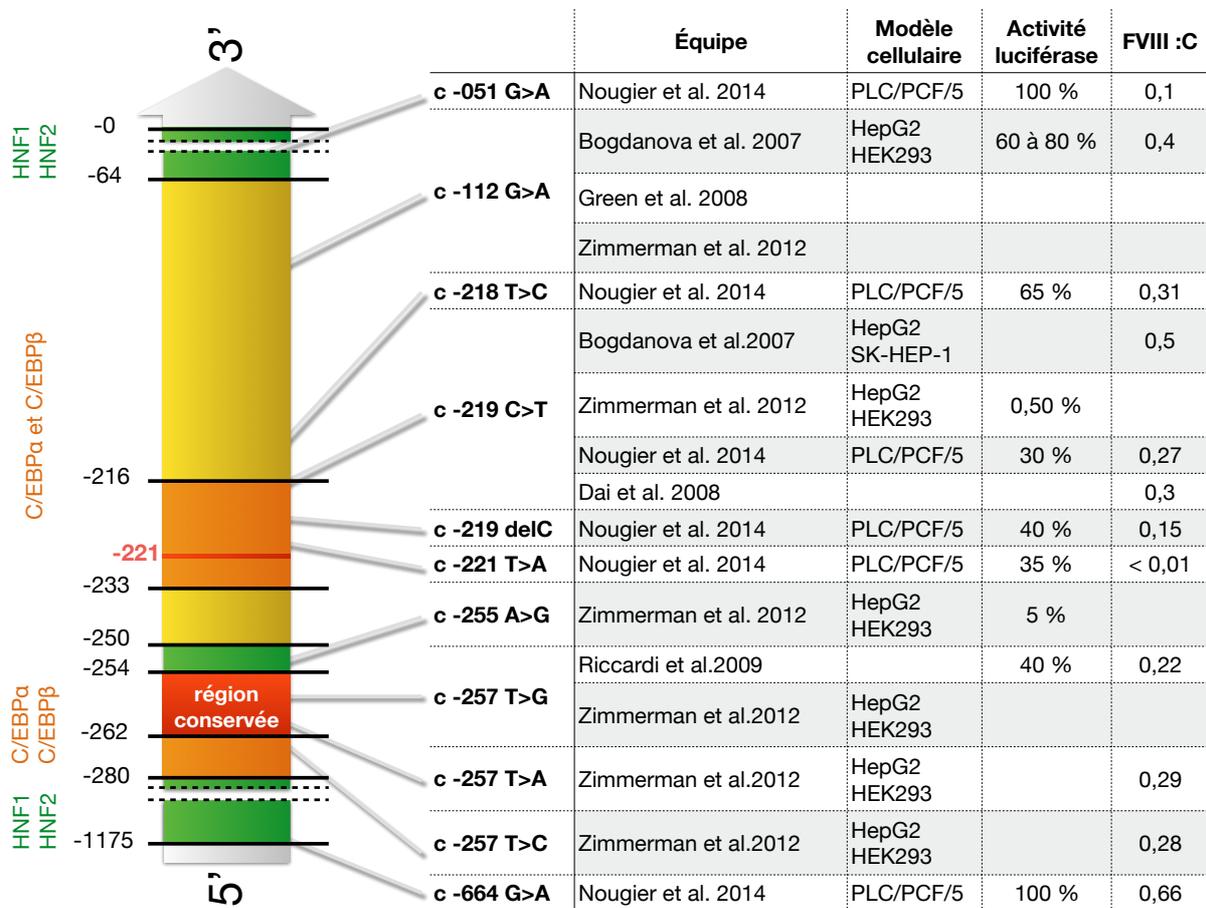
Depuis, l'étude des transcriptomes cellulaires a permis de mettre en évidence l'ARN messenger (ARNm) de 9 kb du FVIII dans de nombreux tissus (101, 102) jusqu'à ce que des études récentes la découvrent majoritaire au niveau de l'endothélium des sinus hépatiques (103), confirmant l'existence de foyer de production endothéliaux secondaires (104).

Au moment du séquençage du gène, en 1984 par Gitschier et al. (96), la région promotrice s'étendait jusqu'en position -1175. Des études de liaison protéique ont permis d'établir une liste de facteurs de transcription fixant cette région sans considération pour leur importance dans l'induction de la transcription du gène *F8* : les hepatocytes nuclear factors 1 et 4 (HNF1 et 4) sur les domaines A et E, le nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) sur la région 5' du domaine B, les CCAAT/EBP  $\alpha$  et  $\beta$  (C/EBP $\alpha$  et  $\beta$ ) sur les domaines C et D(105) et le NFy (106).

Ensuite, des études de délétion ont réduit la zone minimale nécessaire à l'activité maximale du promoteur à la région séparant les résidus -279 à -64 correspondant aux domaines B, C et D de la région promotrice initialement décrite (105). Les domaines A et E, comportant des sites de liaison au HNF1 et HNF4 se sont donc révélés d'une importance moindre (105).

Dès lors, des cas de troubles hémorragiques avec déficit en FVIII sans explication dans la structure codante ont permis de décrire les premières mutations de la région promotrice

ayant une expression biologique et clinique (Figure 7) après vérification sur des modèles *ex vivo*.



**Figure 7. Séquences conservées et mutations de la région promotrice du gène F8.** La flèche représente la région promotrice dans le sens 5'-3' où les barres représentent des sites nucléotidiques numérotés par leur distance avec le premier nucléotide transcrit. En gris sont représentées les séquences n'appartenant pas au promoteur, en vert, les séquences sur lesquelles des mutations semblent sans conséquences et en jaune, orange et rouge, les régions où une mutation a une répercussion biologique sinon phénotypique par ordre croissant de risque statistique sans considération pour la gravité clinique. La liste des mutations décrites dans la littérature, le modèle cellulaire sur lesquels ils ont été étudiés et l'activité FVIII (FVIII :C) mesuré dans le plasma des patients ont été collectés à partir de plusieurs références : Nougier et al (2014) (107) ; Bogdanova et al (2007)(108) ; Green et al. (2008) (109) ; Zimmerman et al. (2012) (110) ; Dai et al (2008)(111) ; Riccardi et al. (2009) (112)

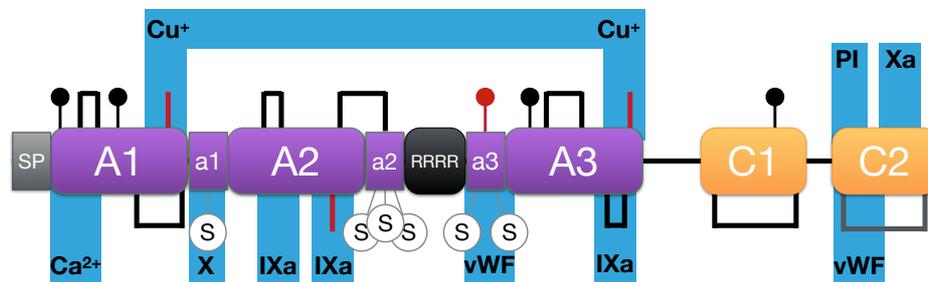
### 3.3 Structure protéique du FVIII

Longue de 2332 acides aminés, la protéine sortie des machineries traductionnelles cellulaires est constituée de 6 domaines principaux : A1, A2, B, A3, C1 et C2 (voir Figure 8). À chaque domaine A, un sous-domaine acide (a) est associé.

Les domaines A présentent de nombreuses similitudes entre eux, ainsi qu'avec les domaines A du FV (35 %) et avec la céruléoplasmine (35 %) (113). Le domaine A1 est impliqué dans la liaison à l'ion cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), les domaines A2 et A3 dans les interactions avec le FIX au sein du complexe ténase intrinsèque.

Les domaines C1 et C2 ont également une grande similitude avec les domaines C du FV (40 à 45%) et avec d'autres protéines capables de lier les domaines glucuronoconjugués et les phospholipides.

Le domaine C2 comporte également le site de liaison du FVIII au VWF avec lequel il est lié dans la circulation sanguine.



**Figure 8. Représentation de la préproprotéine du FVIII à sa sortie des machineries de la transcription** (adaptée de Orlova et al. 2013). Les • représentent les N-glycosylation et O-glycosylation (rouge), les |\_| représentent les ponts disulfures et les (S) les sulfatations de résidus tyrosine. Le domaine SP (signal peptide) permet l'adressage au réticulum endoplasmique où les modifications post-traductionnelles seront initiées. Le domaine B sera éliminé avant la sécrétion du dimère à chaîne lourde (A1-A2-B résiduel) et légère (A3-C1-C2).

Le domaine B est codé par un unique exon et sa structure n'est similaire à aucune séquence protéique connue. Cependant il est le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles (PTMs) notamment de N-glycosylation. Cette caractéristique, conservée au cours de l'évolution, est en faveur de l'importance de ces PTMs dans la production d'un FVIII optimal en termes de fonction et/ou de tolérance.

La présence des ions divalents cuivre et calcium est capitale pour la fonction pro-coagulante de la protéine (114). Deux ions cuivre,  $\text{Cu}^{2+}$ , coordonnent l'interaction entre les domaines A1 de la chaîne légère et A3 de la chaîne lourde grâce aux résidus H267, C310, H315 et H1954, C2000 et H2005 respectivement.

S'ils sont tous les deux à l'interface entre les chaînes légère et lourde et en dépit de leur rôle capital dans la fonction de cofacteur du FVIII, ils ne semblent pas être cruciaux pour la liaison entre les deux chaînes. Seul le résidu C310 a été décrit comme étant à l'origine d'un phénotype d'hémophilie sévère.

De la même manière, les ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ou manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ) sont capitaux pour les fonctions du FVIII ; si la dimérisation des deux chaînes est indépendante de leur présence, leur bonne conformation en dépend.

### 3.3.1 Biosynthèse du FVIII

La production du FVIII est soumise à de nombreux systèmes de contrôles, de régulations cellulaires qui imposent à la cellule un coût énergétique important (115).

Chaque étape de la synthèse protéique depuis son arrivée dans la lumière du réseau réticulaire est donc vérifiée. Les machineries cellulaires de transcription et de traduction réservent donc nécessairement une partie de leur activité à une production protéique suffisante à leur maintien.

De plus, par son appartenance à la famille des glycoprotéines, le FVIII monopolise de nombreuses voies enzymatiques de PTMs au cours de sa migration à travers le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. Là encore, les coûts cellulaires pour le maintien de toutes ces voies est considérable.

C'est pourquoi, dès son arrivée dans la lumière du RE, le FVIII est pris en charge par une protéine chaperonne, BiP, de la famille des protéines de choc thermique (Heat Shock Protein 70, Hsp70). La simple libération du FVIII de cette chaperonne est Adénosine Triphosphate (ATP) dépendante, donc énergivore (116). La cellule utilise pourtant la protéine à des fins économiques. Si la transcription du gène *F8* est augmentée, la quantité de BiP s'accroît et la rétention du FVIII dans le RE l'est également (115). Ainsi, la quantité de FVIII pris en charge par les protéines et enzymes impliqués dans sa conformation, dans la réalisation des PTMs, et dans les systèmes de contrôle reste stable et adaptée à la capacité du RE. Cette régulation minimise les risques délétères d'une accumulation de protéines anormales et/ou mal repliées (117).

### 3.3.1.1 Dans le réticulum endoplasmique

#### 3.3.1.1.1 Glycosylations

Après transcription du gène dans le noyau de la cellule endothéliale, l'ARNm est traduit. La chaîne polypeptidique est alors progressivement introduite dans la lumière du réticulum endoplasmique pour y subir les premières modifications post-traductionnelles.

Le peptide signal, long de 19 acides aminés, responsable de cet adressage au compartiment réticulaire est clivé.

Après l'ajout des chaînes oligosaccharidiques sur les résidus asparagine (N-glycosylation), les glucosidases I et II agissent de manière séquentielle afin d'éliminer respectivement le résidu  $\alpha(1,2)$ -glucose terminal et les deux  $\alpha(1,3)$ -glucoses suivants (117, 118).

Les protéines chaperonnes, calnexine (CNX) et calréticuline (CRT), appartiennent à la famille des lectines. Elles sont capables de fixer le FVIII et ce n'est que lorsque les parties terminales de ses oligosaccharidiques sont glycosylées qu'elles le libèrent (117, 118). Un système de contrôle consistant en la suppression d'un résidu mannose, s'il est en position terminal, par la  $\alpha(1-2)$  mannosidase atteste de la bonne déglycosylation et le FVIII peut ainsi être envoyé vers le réseau golgien.

Les protéines non conformes sont donc maintenues dans le RE par les chaperonnes CNX et CRT, pour y être glycosylées à nouveau par l'uridine diphosphate (UDP)-glycosyltransferase (UGT) avant d'être reprises en charge par les glucosidases I et II. Au terme de quelques cycles CRN/CRT-glucosidases-UGT (117), les protéines n'ayant pas été correctement processées seront adressées au protéasome cytoplasmique et détruites et induiront la production de protéines chaperonnes régulatrices ou pro-apoptotiques (119). Une quantité importante de FVIII est éliminée par ces voies de dégradation. Cependant, l'inhibition de ses acteurs principaux n'entraînent qu'une faible augmentation de FVIII au niveau intracellulaire, et d'autres voies jouent un rôle majeur dans la rétention des protéines du FVIII qu'elles soient conformes ou non.

La majeure partie des sites de N-glycosylation étant portée par le domaine B de la protéine, la suppression de celui-ci de l'ADN complémentaire du FVIII permet une sécrétion augmentée de la protéine (120).

#### 3.3.1.1.2 Ponts disulfures

La mise en place des ponts disulfures (S-S) du FVIII est dépendante de la correcte N-glycosylation de la protéine. La protéine comporte un total de 8 ponts S-S. Chaque domaine C et chaque domaine A comportent respectivement un ou deux ponts S-S internes. Sept de ces 8 ponts sont situés à l'intérieur de la structure tertiaire du FVIII et permettent un maintien de la structure de la protéine et ainsi son intégrité, sa fonctionnalité (121). Une mutation sur les résidus impliqués dans la formation de ces 7 ponts disulfures, homologues à ceux retrouvés sur le FV, est donc fondamentalement responsable d'un phénotype hémorragique (121).

Le dernier, exposé vers l'extérieur, semble avoir un rôle moins capital puisque son élimination par substitution de l'un des résidus cystéine (Cys) en C1899 ou C1903 par un autre acide aminé permet une augmentation de la sécrétion du FVIII sans affecter sa fonction. Cette suppression permet donc le shunt d'un second contrôle réticulaire à la bonne conformation protéique (121).

#### 3.3.1.1.3 Depuis le RE vers le réseau golgien

Après formation de ces ponts S-S, la protéine est finalement adressée au réseau golgien suivant la voie sécrétoire classique. Des systèmes cellulaires ERGIC (Endoplasmic Reticulum to Golgi apparatus Intermediate Compartment) spécifiques reconnaissent les FVIII et FV de la coagulation dans le RE : les ERGIC53. LMAN1, une protéine transmembranaire de la famille des lectines (122), et MCFD2, protéine soluble de 16 kDA comportant une séquence médiatrice de la translocation dans l'ER, forment un complexe de stœchiométrie 1:1, dont la formation est calcium-dépendante, impliqué dans le transfert du FVIII et du FV depuis le ER au Golgi (123).

Si LMAN1 est le cargo de nombreuses protéines connues, notamment des glycoprotéines, (124-126), MCFD2 n'est connu que pour son implication dans le transport intracellulaire des facteurs V et VIII de la coagulation (127).

Grâce à la reconnaissance calcium-dépendante des résidus mannose terminaux, les complexes de chaperonnes LMAN/MCFD2 organisés en clusters vont fixer les FVIII et FV(128). La membrane du RE s'invagine alors afin de former des vésicules de transport peu à peu transformées en vésicules cis-golgiennes. Pour cela, le complexe doit s'ancrer à COPII, complexe protéique hétérodimérique recouvrant la face interne des vésicules de transport intracellulaire, par le biais de la chaîne cytoplasmique de LMAN1 (129). MCFD2 ne comporte quant à lui aucun site d'interaction avec COPII et dépend donc de LMAN1 pour assurer la spécificité du transport des facteurs VIII et V (130).

Des mutations des gènes codant pour LMAN1, MCFD2 et COPII (131) sont tous deux impliqués dans l'apparition d'un déficit combiné en FVIII et FV (130). (<http://www.isth.org/?MutationsRareBleedin>)

La modification du pH à l'intérieur de la vésicule au cours de sa migration vers le réseau golgien provoque la libération du FVIII et le recyclage du complexe LMAN/MCF2 (132).

### 3.3.1.2 Dans l'appareil de Golgi

#### 3.3.1.2.1 Modifications des N-glycosylations

Dans l'appareil de golgi, les N-glycosylations seront à nouveau modifiées. Ainsi divers résidus glucidiques seront ajoutés à l'extrémité des « cores » riches en mannose pour former des chaînes complexes. Ces structures finales sont intimement liées à l'équipement enzymatique de la cellule, à la manière d'une empreinte glycoprotéique renseignant sur son origine cellulaire de la protéine finale. L'équipement enzymatique étant dépendant de l'origine cellulaire (gènes tissu-spécifiques) et de l'espèce (évolution du génome et donc du protéome), la nature des sucres ajoutés sur les chaînes polysaccharidiques est donc elle-même espèce- et tissu-dépendante. (120, 133)

On retrouve donc chez de nombreux mammifères des motifs acide sialique et galactose, absents des glycoprotéines produites par des cellules humaines. En effets l'α-

galactosyltransferase et la Cytidine MonoPhosphate (CMP)-N-acetylneuraminase mono-oxygenase responsables de l'ajout de résidus comme Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-GlcNAc-R ( $\alpha$ -Gal) et l'acide N-glycolylneuraminique (Neu5Gc), perdues au cours de l'évolution par les cellules humaines sont exemptes des épitopes polysaccharidiques des glycoprotéines humaines (133, 134).

#### 3.3.1.2.2 O-glycosylations

Concomitamment, les groupes hydroxyle des sérines ou thréonines seront O-glycosylés. Les acides aminés choisis appartiennent le plus souvent à des clusters, riches en résidus proline notamment. Ces chaînes polysaccharidiques s'ancrent donc à la protéine par un pont O-glucose/N-acetylgalactosamine et leurs motifs sont également fonction de l'arsenal enzymatique cellulaire.

De récents travaux ont décrit les importantes différences entre le FVIII lorsqu'il est extrait du plasma, produit par des cellules endothéliales humaines, majoritairement localisées dans les sinus hépatiques, et le FVIII recombinant produit par génie génétique sur des cellules de mammifère, choisies pour leur adaptabilité à une production industrielle. Jusqu'à ce jour, aucun essai clinique n'a permis d'établir une différence entre les rFVIII issus de lignées BHK (Baby Hamster Kidney), porteurs des épitopes  $\alpha$ -Gal, ou des lignées CHO (Chinese Hamster Ovary) en termes de demi-vie plasmatique, d'efficacité ou de tolérance. Pourtant, afin de minimiser ces différences, la recherche s'oriente maintenant sur des essais de production du rFVIII sur des cellules humaines. L'élimination du biais de l'espèce d'origine pourrait réduire le risque sous-jacent de réaction immunitaire contre des épitopes non-humains (voir 4.6.3 *Facteurs VIII recombinants*).

### 3.3.1.2.3 Sulfatation des tyrosines

La sulfatation consiste en l'ajout sur des résidus tyrosine (Tyr, Y) de groupement sulfate par l'action de la tyrosylprotein sulfotransferase qui utilise pour cela des Phospho-Adenosine Poly-Sulfates (PAPS). Ce type de modification PTM est très fréquent et concerne un grand nombre de protéines assignées à suivre la voie sécrétoire au niveau du Golgi, notamment des protéines impliquées dans des interactions avec la thrombine. Elles sont les garantes d'une activité biologique, de l'affinité des protéines pour leurs substrats et de leur bonne sécrétion.

On dénombre sur l'ensemble de la protéine du FVIII six sites de sulfatation, tous aux abords des sous-domaines acides (a) et proches des sites de clivage du FVIII par la thrombine (135).

Toutes ces sulfatations sont nécessaires à la pleine activité du FVIII.

Les sites Y72 et Y1664 sont impliqués dans le clivage du FVIII par FIIa et assurent ainsi son activation.

Les sites Y718, Y719 et Y723 permettent l'activité du FVIIIa au sein du complexe ténase intrinsèque.

Enfin, la sulfatation de Y1680 pérennise la bonne affinité du FVIII avec le VWF et ainsi la formation du complexe circulant le protégeant d'une dégradation trop précoce (136).

Ces sulfatations comme les PTMs précédemment décrites, varient entre les espèces. En effet, si l'intégralité de ces sites est systématiquement sulfatée chez l'homme, le FVIII produit sur des modèles cellulaires non-humains et ne l'est qu'à 90 % (134).

### 3.3.1.2.4 Finalisation de la protéine

Les dernières étapes de la biosynthèse du FVIII consistent en l'ajout de l'ion Cu coordinateur de l'unité de l'hétérodimère mature et inactif, issu de la protéolyse limitée.

En effet, deux sites du domaine B, au niveau des résidus arginine R1313 et R1648, des séquences conservées sont reconnues par l'enzyme furine/PACE entraînant un dernier clivage protéolytique et donc l'obtention d'une protéine atteignant une masse moléculaire de 280 kDa.

Le FVIII se compose alors d'une chaîne lourde contenant les domaines A1-a1-A2-a2 et le domaine B résiduel de taille variable (90 à 200 kDa) et d'une chaîne légère composée des domaines a3-A3-C1-C2 de 80 kDa (120).

Paradoxalement, cette première protéolyse, dans la vie de la protéine, la fragilise. Des mutations au niveau des sites de clivage de la furine/PACE l'attestent en augmentant la stabilité de la protéine en circulation. C'est pourquoi, s'il n'est pas pris en charge immédiatement par son transporteur plasmatique le VWF, le FVIII est très rapidement détruit dans la circulation (137).

Complexé au VWF, sa demi-vie est comprise en 10 et 16 h.

### 3.3.2 *Dans la circulation sanguine*

#### 3.3.2.1 *Interaction avec le facteur Von Willebrand*

Immédiatement après son excrétion dans la circulation sanguine, le FVIII se lie au VWF pour former un complexe non-covalent de forte affinité. La concentration plasmatique moyenne normale du FVIII est de 100-250 ng/mL (soit environ 1 nM). Celle du VWF est de 10 µg/mL (soit environ 50 nM) circulant ainsi en excès de 30 à 50 fois la concentration molaire du FVIII. Ainsi, dans la circulation normale, la majorité des multimères du VWF n'est pas liée au FVIII tandis que la quasi-totalité du FVIII circule liée au VWF.

Cette liaison au domaine D'D3 du VWF est suffisante et nécessaire (138, 139) à la présence du FVIII dans le plasma ; en effet, une mutation de la région D'-D3 du VWF ou une absence de VWF est à l'origine d'un profil hémorragique secondaire à l'absence de FVIII en quantité suffisante (140).

Le complexe VWF-FVIII est nécessaire à la stabilité du FVIII ; la demi-vie plasmatique du FVIII atteint alors la demi-vie du complexe (141). Il permet également la régulation de son activation par la thrombine, de son clivage par le FXa et par la protéine C activée (APC) et ainsi permet la conservation du FVIII. Il prévient également toute fixation intempestive et non-spécifique du FVIII sur les cellules endothéliales ou les membranes plaquettaires.

Trois domaines sont impliqués dans la liaison du FVIII au VWF :

- Le sous-domaine acide a<sub>3</sub> : il contient un résidu tyrosine (Y1680) dont la sulfatation est nécessaire à la liaison du FVIII au VWF (142) ;
- Le domaine C1 : dont 4 mutations ont été décrites comme diminuant l'affinité du FVIII pour le VWF. Toutes sont localisées dans une région allant du résidu 2098 au résidu 2150 (143) ;
- Le domaine C2 : 4 résidus hydrophobes (Met<sup>2199</sup>/Phe<sup>2200</sup> et Leu<sup>2151</sup>/Leu<sup>2152</sup>) ont été décrits comme impliqués, par paire, dans l'affinité du FVIII avec le VWF et avec les phospholipides de membrane (144). Remplacer ces 4 résidus par des alanines réduit l'affinité avec les phospholipides membranaires de 95 % et diminue l'affinité du FVIII pour le VWF d'un facteur 20.

Le clivage protéique par la thrombine au niveau du résidu Arg1689 aboutit à l'élimination du sous-domaine acide a<sub>3</sub>. Cette étape protéolytique de la vie de la protéine permet, à elle seule, la dissociation du FVIII de son complexe avec le VWF. L'affinité du FVIII pour le VWF chute en effet d'un facteur 1400 ; des modifications conformationnelles réduisent l'affinité des domaines C1 et C2 avec le VWF et augmentent leur affinité pour les phospholipides membranaires (145, 146). Seul le domaine a<sub>3</sub> semble donc directement impliqué dans l'interaction avec le VWF, les domaines C1 et C2 n'ayant qu'une participation a<sub>3</sub> dépendante(147).

Les modifications protéolytiques conduisant à la transformation du FVIII en hétérotrimère de haute affinité pour les phospholipides des membranes plaquettaires et endothéliales activées sont donc la première étape de la formation du complexe de génération de FXa (148).

### *3.3.2.2 Activation et formation du complexe ténase intrinsèque*

L'activation du FVIII est secondaire à la protéolyse limitée, réalisée par la thrombine et le FXa. En clivant le FVIII au niveau de l'arginine 1689, la thrombine permet l'élimination du domaine a<sub>3</sub> et le détachement du FVIII du complexe avec le VWF. Les clivages au niveau des résidus 372 et 740 permettent respectivement la coupure de la chaîne lourde en deux

domaines distincts, A1 et A2, et l'élimination du domaine B résiduel. La libération de chaîne A2 est responsable de l'activation du FVIII. La présence de l'ion cuivre monovalent permet alors son maintien au sein du complexe hétérotrimérique dont l'intégrité est essentielle à l'activité du FVIIIa (120, 149) (voir Figure 9).

L'activation par le FXa est secondaire et nettement moins efficace voire négligeable (146). En plus des trois sites de clivage, communs à la thrombine et permettant donc l'activation du FVIII, le FXa clive le FVIII au niveau des résidus R1721, R336 partagés avec la protéine C activée, et K36 (120, 149, 150) et qui sont des sites d'inactivation.

Le FVIII activé par le FXa forme avec le FIXa un complexe ténase d'activité très modérée et dont le FVIIIa est donc très rapidement inactivé.

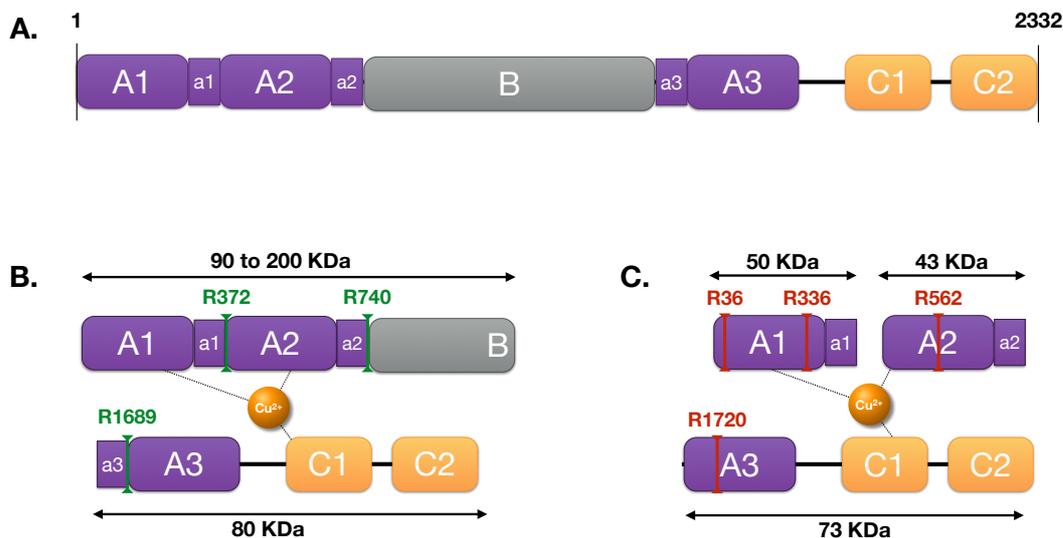


Figure 9. Structure protéique du FVIII au moment de (A) sa synthèse, (B) sa sécrétion et (C) son activation. Les | correspondent aux sites de protéolyse permettant l'activation de la protéine et les | représentent les sites protéolytiques aboutissant à l'inactivation du FVIII. Au moment de sa synthèse le FVIII est monomérique. Avant d'être sécrété, il adoptera une structure hétérodimérique (B) par protéolyse limitée aboutissant à l'élimination d'une partie ou de la totalité du domaine B. Son activation par la thrombine ou le FXa lui confère sa structure hétérotrimérique active (C).

	FXa	FIIa	APC
R372	x	x	
R740	x	x	
R1689	x	x	
R36	x		x
R336	x		x
R562	x		x
R1720	x		

Tableau 1. Description des enzymes intervenant dans l'activation (■) et l'inactivation (■) du FVIII. La thrombine est capable de réaliser une protéolyse sur l'intégralité des sites activateurs. Le clivage par le FXa conduit à la production d'un dimère fragilisé puisque pré-inactivé.

En présence de phospholipides anioniques des membranes cellulaires activées, le FVIIIa forme donc avec le FIXa le complexe ténase intrinsèque. Différents domaines interviennent dans la liaison entre les facteurs VIIIa et IXa :

- Dans le domaine A2 du FVIIIa : les régions Arg<sup>484</sup>-Phe<sup>509</sup> (151), Tyr<sup>555</sup>-Arg<sup>571</sup> ou hélice 558 (152, 153) et Arg<sup>698</sup>-Asp<sup>712</sup> (154) sont impliquées dans la liaison du FVIIIa à la chaîne lourde du FIXa. L'hélice 558 du FVIIIa se lie à la surface formée par les hélices 300 et 228 du domaine Sérine Protéase (SPase) du FIXa (153) ;
- Interaction du domaine acide A3 et du domaine C1 avec les domaines EGF1 et GLA du FIXa ;
- La chaîne légère A3-C1-C2 doit être alignée dans le même plan que le domaine GLA du FIXa par rapport à la surface membranaire (153).

Lorsque le complexe adopte la conformation adéquat, l'activité SPase du FIXa sur son substrat, le FX, se voit multipliée par  $10^4$  à  $10^6$  par rapport à l'activité sans le FVIIIa (146).

### 3.3.2.3 *Inactivation*

Afin d'éviter la production illimitée de FXa, le FVIIIa est rapidement éliminé de la circulation.

Premièrement, si le FVIII est une molécule fragile, l'hétérotrimère activé l'est davantage du fait des liaisons non-covalentes qui maintiennent l'intégrité des trois composants de la molécule : le domaine A1, le domaine actif A2 et la chaîne légère. En quelques minutes seulement, la molécule est dégradée par dissociation spontanée (155, 156).

La molécule est pourtant stabilisée par son intégration dans le complexe ténase intrinsèque en présence de phospholipides et par le FX et est protégée par le VWF lorsqu'elle n'est pas encore activée. Différentes protéases sont alors capables de dégrader la molécule et de fait, de l'inactiver.

### 3.3.2.3.1 Par le FX

En plus d'être capable de l'activer par des clivages dont les sites sont partagés avec la thrombine, le FXa peut inactiver très rapidement le FVIIIa.

L'ambivalence des rôles du FXa vis à vis du FVIIIa est donc tout à fait singulière. Au sein du complexe ténase intrinsèque, il participe à sa stabilisation (157) voire son activation tandis qu'il est capable de cliver la molécule en plusieurs sites aboutissant à son inactivation :

- Le clivage en position R 1721 fragilise l'association des trois dimères de la molécule, induisant une inactivation spontanée accrue (158) ;
- Les clivages en R36 et en R336 sont également responsables d'une diminution de la cohésion entre les domaines A1 et A2 et donc d'une augmentation de la vitesse de dissociation du complexe (159-161) sans permettre la pleine inactivation du FVIIIa ;
- Enfin, le clivage en position R562 est le seul à avoir pour effet l'abolition totale de l'activité du FVIIIa au sein de la ténase intrinsèque (150).

### 3.3.2.3.2 Par le complexe de la protéine C activée

Longtemps décrite comme étant la seule protéine de la cascade de la coagulation à cliver le FVIIIa au niveau de son arginine R562 et donc à pouvoir l'inactiver totalement, la PCa conserve un rôle majeur dans l'inactivation du FVIIIa.

Elle partage avec le FXa tous ses sites de clivage mais a pour le FVIIIa une affinité supérieure et une spécificité de rôle qui lui permettent de l'éteindre avec plus d'efficacité.

La PCa est capable de cliver le FVIII en deux sites : R336 et R562, localisés respectivement dans les domaines A1 et A2 du FVIII.

Le premier, R336, permet la fragilisation de l'hétérotrimère, augmentant ainsi la fréquence de dissociation spontanée. Un clivage en R562 permet quant à lui la destruction du site actif du FVIII et donc la neutralisation de son activité procoagulante.

Seule, la APC a une affinité six fois supérieure pour le site R336 par rapport au R562.

Deux cofacteurs ont été décrits : le FV (162, 163) et la protéine S activée (PS) (164).

Tous deux sont capables d'augmenter l'activité anticoagulante de la PCa sur ses deux sites de clivage. Cependant, l'augmentation de l'affinité de la PCa est supérieure pour le site R562, inactivateur strict, que pour le R336, fragilisateur.

Ainsi, l'activité protéolytique de la PCa seule est supérieure au niveau du site R336 du FVIII, ne permettant pas l'abolition totale de l'activité cofacteur du FVIII au sein de la ténase. En revanche, en présence des cofacteurs PS et FVa, la vitesse catalytique du clivage en R562 est très augmentée, jusqu'à n'être plus que deux fois inférieure à la vitesse de clivage en R336 (165).

#### 3.3.2.4 *Élimination, clairance*

Le FVIII a été décrit comme étant capable de se lier au LRP1 (LDL receptor-related protein) (166, 167), également appelé  $\alpha$ 2-macroglobuline récepteur, afin d'être endocyté puis dirigé vers les voies cataboliques intracellulaires. L'étude de modèles murin KO (168) et celles de nombreux polymorphismes humains (169-172) ont toutes confirmé le rôle du LRP1 dans la clairance du FVIII circulant.

Pourtant, malgré la haute affinité du FVIII pour le LRP1, la diminution partielle de sa clairance laisse suggérer qu'il existe d'autres voies d'élimination physiologique du FVIII (166).

D'autre part, le blocage du récepteur à l'aide d'inhibiteur tel que RAP, permet une diminution supérieure de la clairance du FVIII (167, 168). Cet antagoniste des LRP1 est également un inhibiteur des récepteurs au LDL (LDLR) et c'est grâce à cette observation que Bovenschen et collaborateurs ont mis en évidence la coopération des LDLR avec LRP1 dans l'élimination du FVIII (173). La même étude montrait la capacité des héparanes sulfate recouvrant les cellules endothéliales, à favoriser la rencontre du FVIII avec ces récepteurs en le séquestrant sur la surface cellulaire.

Le FVIII possède plusieurs sites de liaison aux LRP1 : 3 sites de faible affinité dans la chaîne légère et 1 site de forte affinité dans le domaine A2 (Arg484-Phe509). Ces domaines recouvrent les domaines d'interaction avec le FIX au sein de la ténase (174).

La capacité de fixation du domaine A2 a été sujet à débats quant à la capacité de la chaîne lourde à lier le LRP1 avant l'activation du FVIII. En réalité, la liaison à la chaîne lourde intacte est relativement faible et est compensée par la liaison de la chaîne légère, indépendante de la protéolyse du FVIII (175).

La liaison du FVIII au LRP1 est donc régulée par le VWF (166), complexé à la chaîne légère du FVIII et entravant sa capture par les LRP1. Ce n'est qu'après activation par la thrombine que le FVIIIa hétérotrimérique sera libéré de son complexe. Sa chaîne légère permettra alors sa liaison au LRP1 au même titre que son domaine A2, alors disponible.

## 4 Hémophilie A

Les hémophilies A et B sont des maladies hémorragiques et génétiques causées par des mutations dans les gènes des facteurs IX et VIII, tous deux impliqués dans la formation de la ténase intrinsèque.

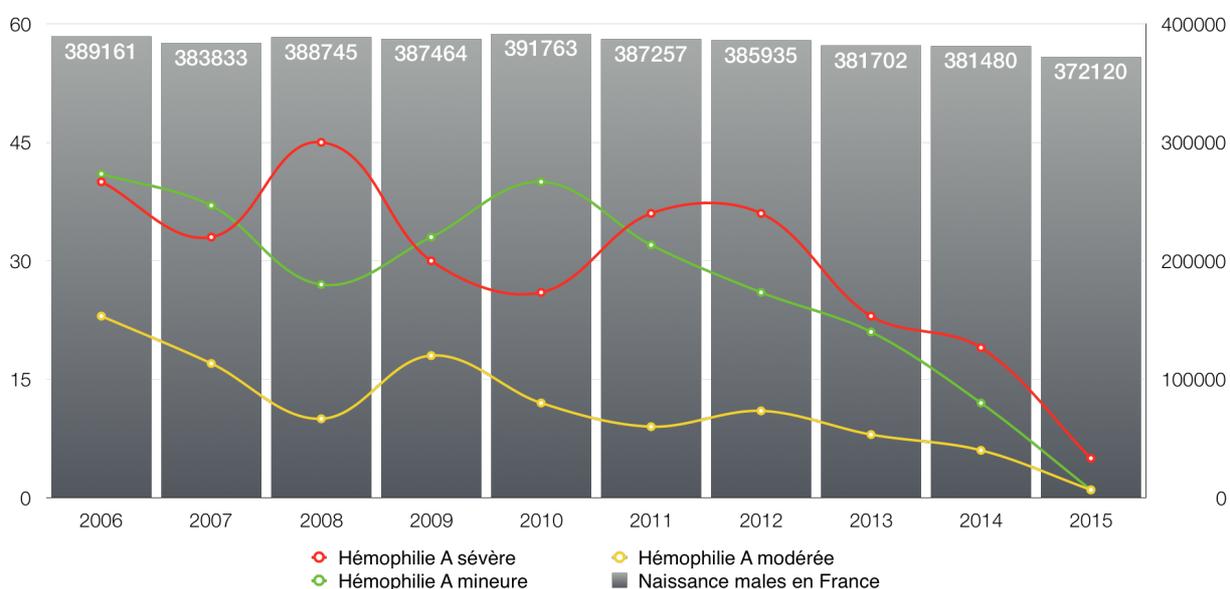
Par leur implication dans les processus d'amplification de la coagulation, l'absence de l'un ou l'autre de ces facteurs ne permet plus la production des quantités de thrombine nécessaires à la formation du caillot de fibrine et ainsi à l'arrêt du saignement.

Ces mutations sont sporadiques dans 30 % des cas. Elles sont décrites pour la première fois chez un enfant au sein de famille sans cas d'hémophilie connu. Ces cas comprennent majoritairement les familles de conductrices sur plusieurs générations ou les mutations spontanées, dites *de novo*, apparues dans les gamètes de l'un des parents ou, plus rarement, à un stade précoce du développement embryonnaire.

Beaucoup de ces mutations ont été décrites comme les inversions des introns 1 et 22, certaines délétions, insertions et mutations ponctuelles des séquences exoniques. Pourtant, l'origine génétique de 2 à 5 % des cas d'hémophilie A n'a pas été élucidée à ce jour.

L'hémophilie A est six fois plus fréquente que l'hémophilie B et plus de la moitié des patients atteints d'hémophilie A ont un phénotype hémorragique sévère. Elle est également la plus fréquente des maladies hémorragiques sévères.

La prévalence est de 1 sur 5000 naissances mâles à travers le monde. L'incidence est pourtant en baisse depuis 2012 dans les pays où le recours au diagnostic anténatal accompagné du conseil génétique est systématiquement proposé et l'aide à la procréation efficace. Si le recensement du nombre d'hémophiles sur l'année 2015 manquent probablement d'exhaustivité, la diminution du nombre de naissances est significative (voir Figure 10).



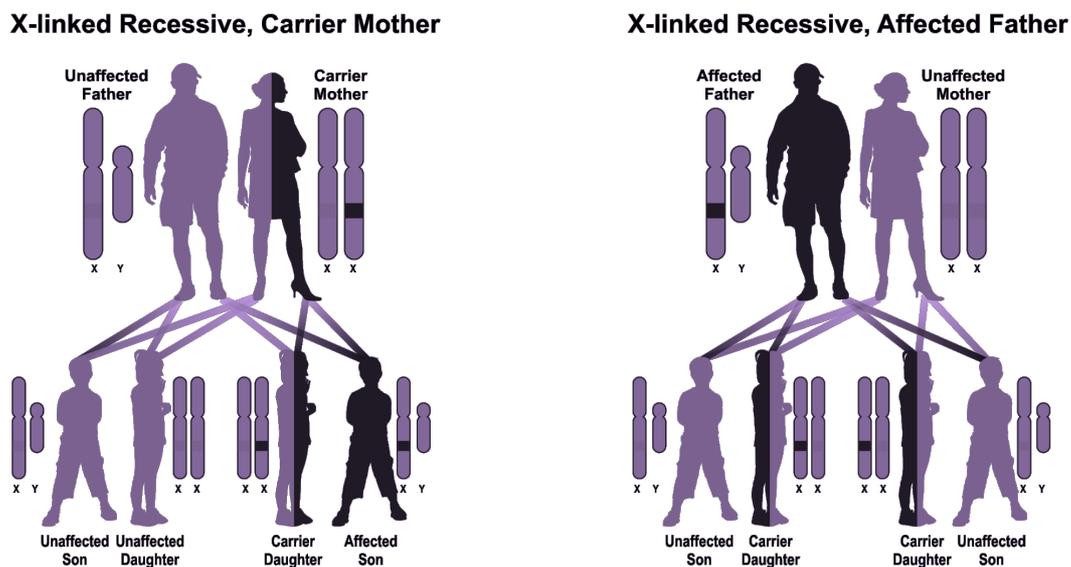
**Figure 10. Histogramme démographique du nombre de naissances mâles et du nombre d'hémophiles A recensés au cours de la période 2006-2015.** Les valeurs démographiques nationales sont issues de la combinaison des recensements de l'INSEE (nombre de naissances) (<https://www.insee.fr>) et de l'INED (sex-ratio) ([www.ined.fr](http://www.ined.fr)). Les valeurs du nombre d'hémophiles sévères, modérés et mineurs sont issus de ([www.francecoag.org/](http://www.francecoag.org/)). Depuis 2012, l'inflexion de l'incidence de l'hémophile A est nette.

#### 4.1 Génétique de l'hémophilie A

Les gènes *F8* et *F9* étant portés par le chromosome X, les hémophilies A et B sont deux maladies transmises selon un mode récessif lié à X. Suivant les règles de l'hérédité par reproduction sexuée, les individus féminins héritent de deux chromosomes X, le premier

étant transmis par la mère, le second par le père. En revanche, les individus masculins héritent d'un unique chromosome X par leur mère, héritant du père leur chromosome Y (voir Figure 11).

Ce schéma général explique pourquoi un garçon qui hérite de sa mère d'un chromosome portant une mutation sur le gène *F8* sera atteint d'hémophilie. Il explique également pourquoi les pères ne transmettent pas l'hémophilie à leurs fils mais passeront le gène muté à toutes leurs filles, alors considérées vectrices de la maladie.

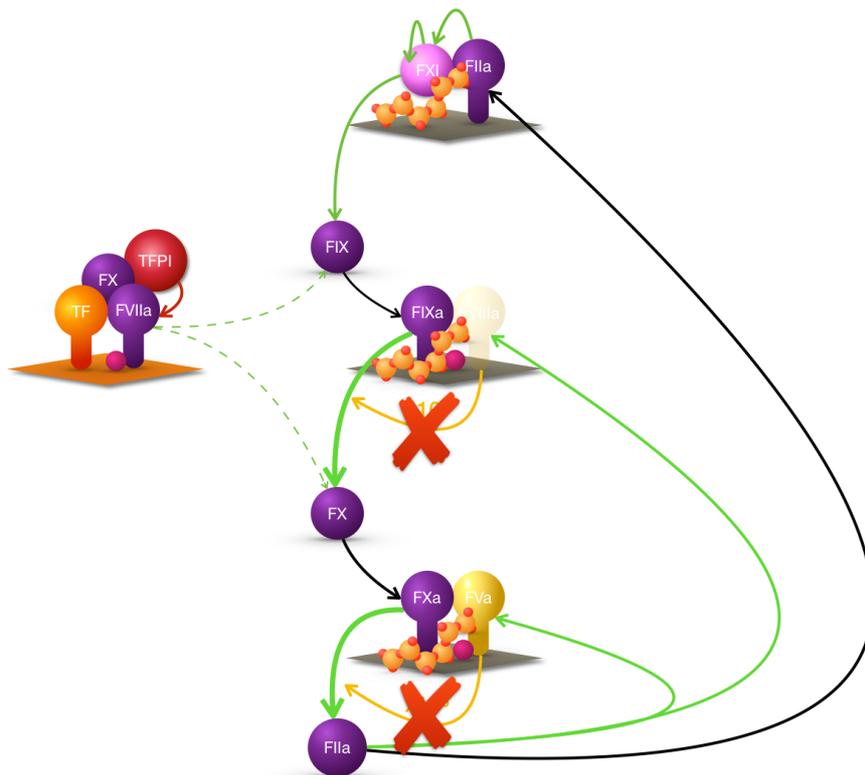


**Figure 11. Schéma de la transmission d'une maladie héréditaire liée à X selon le parent affecté.** La mère transmet le gène muté à la moitié de sa descendance ; si 50 % de gène fonctionnel suffisent, ses filles seront vectrices et ses fils atteints. Le père transmet le gène muté à l'intégralité de ses filles, toutes vectrices, mais à aucun de ses fils.

En raison de leurs deux chromosomes X, les filles ne sont que très rarement atteintes d'hémophilie, même si elles héritent d'un gène non fonctionnel. Pourtant, les mécanismes de cette inactivation sélective restent aujourd'hui inconnus. Ces filles qui héritent d'un chromosome X portant un gène muté sont appelées vectrices. Elles transmettront le gène muté à la moitié de leur descendance indépendamment du sexe ; la moitié de leurs fils seront donc hémophiles tandis que la moitié de leurs filles hériteront du statut de vectrice.

## 4.2 Physiopathologie

Dans l'hémophilie, le défaut de coagulation est à l'origine de saignements disproportionnés ou spontanés. L'hémostase primaire ou agrégation plaquettaire permet la formation du clou plaquettaire précoce et l'initiation de la coagulation par l'action du complexe ténase extrinsèque. Cependant ni l'amplification, ni le relai de la génération du FXa par la ténase intrinsèque, ne pourra donc être effectuée. Or l'action transitoire et insuffisante du complexe FVIIa-TF rend capitale la mise en fonction du complexe FVIIIa-FIXa (voir chapitre : « 2.3 Phase d'amplification », voir *Figure 12*). Les quantités générées de FXa lors des phases d'amplification et de propagation et, *a fortiori*, les quantités de thrombine formées sont alors insuffisantes à la production et à la stabilisation de fibrine. L'hémophilie se caractérise donc par la formation d'un clou plaquettaire normal, mais d'un défaut de production de thrombine interdisant la formation d'un caillot de fibrine adapté.



**Figure 12. Phase d'amplification de la coagulation dans le cadre de l'hémophilie A.** Les premières molécules actives de thrombine ne permettent plus l'activation du FVIII. L'inhibition rapide de la ténase extrinsèque provoque un arrêt de l'activation du FX. La génération de thrombine est insuffisante et ne permet pas la formation d'un caillot de fibrine suffisamment stable pour enrayer l'hémorragie.

### 4.3 Clinique

La HA est caractérisée par des saignements qui peuvent être disproportionnés, spontanés ou provoqués, et non résolutifs en l'absence de prise en charge efficace. Les hémorragies spontanées de la forme sévère, apparaissant dès l'enfance, sont à l'origine de déformations articulaires irréversibles et caractéristiques de l'hémophilie sévère : les hémarthroses.

La sévérité et la fréquence de ces saignements sont étroitement corrélées à la concentration résiduelle en facteur VIII. On observe donc un phénotype sévère quand le taux résiduel est inférieur à 1 %, modéré quand la concentration plasmatique en FVIII est comprise entre 1 et 5 %, et mineur pour des taux allant de 6 à 40 % de la valeur normale. Il existe pourtant des exceptions à cette classification.

Le phénotype sévère est caractérisé par des saignements provoqués disproportionnés mais également par des hémorragies spontanées et fréquentes, notamment au niveau des muscles (hématomes) et des articulations (hémarthroses). Ces saignements répétés conduisent à une dégradation irréversible des articulations, une mortalité augmentée due aux hémorragies internes. On estime que :

- 70 à 80 % des hémorragies ont lieu au niveau intra-articulaire (hémarthroses) ;
- 10 à 20 % sont d'origine musculaire (hématomes) ;
- 5 à 10 % sont de localisation intra-cavitaire (hématuries, hémorragies digestives, hémorragies intracrâniennes).

Les patients atteints d'hémophilie modérée présentent des hématomes et hémarthroses seulement après un traumatisme. Les femmes hémophiles modérées peuvent être alertées par des ménorragies, des menstruations importantes ou des hémorragies à l'accouchement.

Les hémophiles mineurs n'ont généralement pas de saignement spontané. Ce n'est donc qu'en cas de chirurgie ou traumatisme accidentel qu'ils seront sujets à des saignements accrus. Dans la majorité des cas, ils ne sont pas diagnostiqués avant l'âge adulte, au moment d'un acte chirurgical ou d'une extraction dentaire.

L'hémarthrose est le signe pathognomonique de l'hémophilie sévère ou modérée. Elle est spontanée dans les cas les plus sévères et secondaire à un traumatisme mineur pour les phénotypes modérés. Leur apparition s'accompagne d'une sensation de gêne, accompagnée d'un fourmillement et d'une limitation de l'amplitude articulaire. En l'absence de traitement, la sensation devient douloureuse et cette douleur est exacerbée par le mouvement, l'articulation gonfle et devient inflammatoire. Enfin, elle aboutit à une impotence fonctionnelle et le patient adopte une attitude antalgique.

Les hémarthroses sont préférentiellement localisées au niveau des articulations les plus mobilisées, notamment celles supportant le poids du corps (genoux, chevilles) et restent moins fréquentes dans d'autres localisations (épaule, coudes).

L'apparition d'une hémarthrose est à l'origine d'une lésion des tissus cartilagineux et osseux sous-chondraux fragilisant l'articulation et favorisant donc la récurrence ; on parle alors d'articulation cible. L'articulation irréversiblement détériorée et déformée devient raide et n'est alors plus mobilisable favorisant l'atrophie musculaire. Ce stade, appelé arthropathie hémophilique, est une indication pour une intervention de chirurgie orthopédique et/ou prothétique.

Les hématomes affectent les tissus sous-cutanés et musculaires. Ils sont expansifs et peuvent par ce fait engager le pronostic vital via deux mécanismes : la compression d'organes ou de voies veineuses ou nerveuses et l'anémie sévère.

## 4.4 Dépistage biologique de l'hémophilie A

### 4.4.1 Contexte

Le contexte est le premier critère de dépistage de la pathologie. En effet, les règles de l'hérédité liée au chromosome X limitent l'affection symptomatique aux individus masculins, ayant le plus souvent des antécédents familiaux de troubles hémorragiques.

Un interrogatoire détaillé des antécédents personnels et familiaux et des conditions de survenue de ces accidents est nécessaire à la détection de la pathologie hémophilique.

#### 4.4.2 Dépistage

La Haute Autorité de Santé (HAS) recommande (rapport 2007, MAJ 2010) un bilan adapté à l'âge, aux circonstances du diagnostic, au déficit suspecté et aux signes cliniques.

Globalement, ce dépistage contient les mesures :

- Du taux de prothrombine (TP) ou temps de Quick : il permet l'exploration de la phase d'initiation de la coagulation, correspondant à la voie extrinsèque (FVII) et à la voie commune (FX, FV et FII) de la coagulation ;
- Du temps de céphaline avec activateur (TCA) : il évalue les composants de la voie intrinsèque et de la voie commune (FXII, FXI, FIX, FVIII, FX, FV et FII). Puisqu'il concerne la majorité des anomalies de la voie intrinsèque, l'activité coagulante du FVIII doit être mesurée dès lors que le TCA est allongé. D'autre part, un TCA normal ne permet pas d'éliminer l'éventualité d'une hémophilie A ou B mineure. Ainsi, en cas d'antécédents familiaux ou de suspicion de conduction, le dosage du FVIII est conseillé même si le TCA s'avère normal ;
- Un hémogramme avec numération plaquettaire notamment.

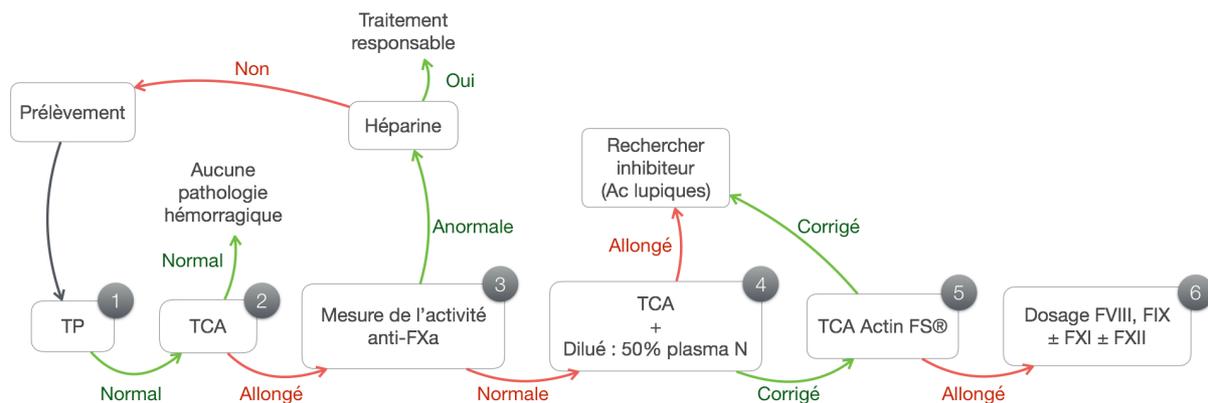
L'hémophilie A, comme l'hémophilie B et le déficit en FXI, se caractérise par un allongement isolé du TCA avec un TP et un temps de saignement normaux. L'exploration des taux antigéniques et de la fonction du VWF permettent d'éliminer les déficits en FVIII secondaires à un déficit en VWF.

Ces examens globaux de l'hémostase doivent être accompagnés d'une recherche du groupe sanguin ABO.

L'association d'un TP normal avec un TCA allongé peut être la conséquence d'étiologies variées qu'ils convient d'éliminer avant de procéder aux dosages des facteurs de la coagulation de la voie intrinsèque : les FVIII, FIX, FXI et FXII. Ainsi les examens complémentaires permettent d'éliminer la présence potentielle d'un inhibiteur circulant non-spécifique des facteurs de la coagulation (anticorps lupique) et un déficit en prékallitréine ou de kininogène de haut poids moléculaire.

Le bilan doit donc être complété par des examens spécifiques qui permettent un diagnostic précis de la pathologie (voir *Figure 13*) :

- Recherche d'un inhibiteur spécifique d'un facteur (en l'occurrence, un anticorps dirigé contre le FVIII) ;
- Absence d'héparine : mesure de l'activité anti-FXa
- Dosage des facteurs : FVIII:C, FIX ;
- Enquête génétique et génotypage.



**Figure 13.** Recommandation dépistage et diagnostic de l'hémophilie A selon le rapport de la World Federation of Hemophilia (WFH).

#### 4.4.3 Test de mélange

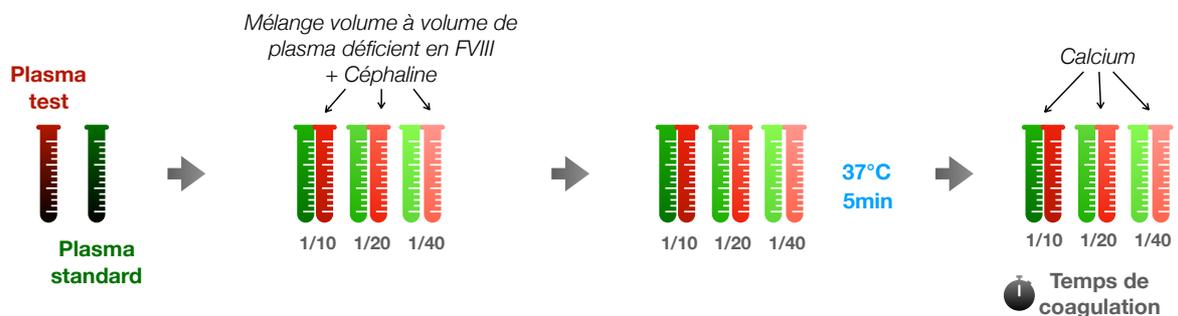
Afin d'éliminer la présence d'un anticoagulant circulant un test de mélange peut être réalisé. Il permet d'évaluer la capacité d'un plasma normal, à rétablir la capacité de coagulation du plasma testé (TCA corrigé après mélange, indiquant un déficit en facteur) ou non (TCA non corrigé, indiquant la présence d'un anticoagulant circulant). Les anticorps anti-FVIII ne sont généralement pas détecté par cette technique, car leur action sur un plasma témoin nécessite une incubation de 2h (non réalisé dans le test classique de mélange).

#### 4.4.4 Dosage de l'activité procoagulante du FVIII

La sévérité clinique étant très dépendante de la concentration résiduelle en FVIII, le dosage de l'activité pro-coagulante est capitale.

##### 4.4.4.1 Méthode coagulométrique ou méthode en 1 temps

La méthode en 1 temps est de loin la méthode la plus utilisée dans les laboratoires de biologie médicale dans le monde. Elle repose sur le principe du TCA (voir Figure 14) et sur la capacité du plasma test à corriger le TCA d'un plasma déficient en facteur à doser (ici, le FVIII).



**Figure 14. Protocole opératoire de la méthode coagulométrique de mesure de l'activité pro-coagulante du FVIII.** Le plasma de référence et le plasma à doser sont dilués au  $1/10^e$  puis par plusieurs dilutions au  $1/2$  jusqu'à la dilution minimale de  $1/40$ . Les plasmas sont mélangés volume à volume à un plasma déficient en FVIII et après ajout de l'activateur, les mélanges sont incubés 5 min à  $37^{\circ}\text{C}$ . Après recalcification, le temps de coagulation est mesuré.

Un plasma de référence, étalonné contre un étalon international, permet d'établir une droite de calibration par la capacité de différentes dilutions à corriger le déficit en facteur FVIII du plasma déficient, donc le TCA. Les temps sont reportés en semi-logarithme où le temps est fonction de  $\log[\text{FVIII} : \text{C}]$  et la droite est tracée.

Une deuxième courbe est tracée après la mesure des temps de coagulation en utilisant le plasma test. Les deux droites de références doivent être parallèles. Dans le cas contraire :

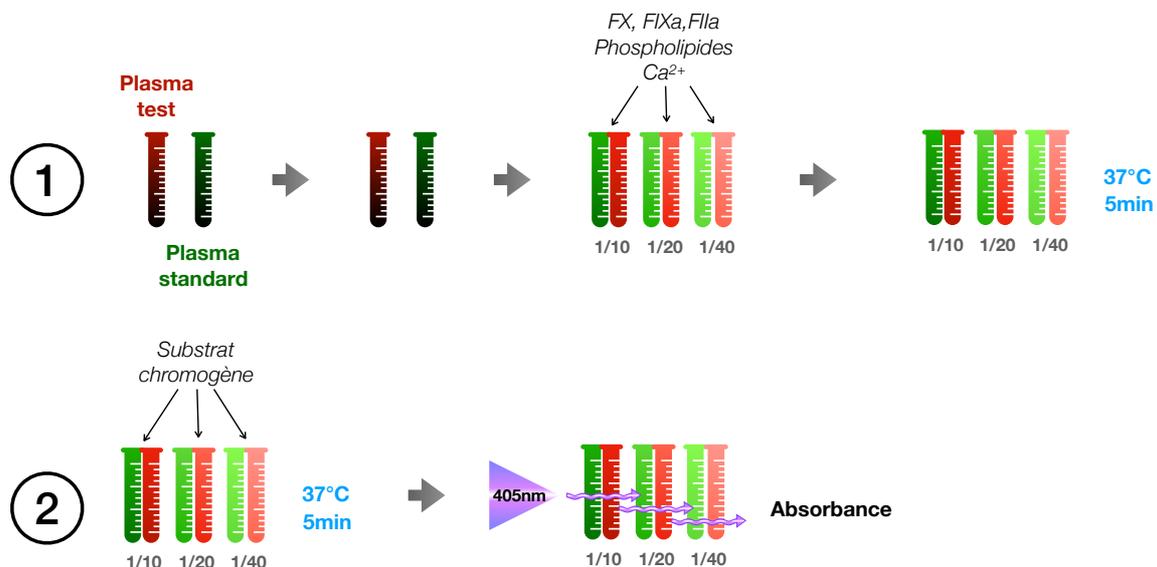
- Une erreur technique peut être survenue ;
- Si l'erreur est exclue, un inhibiteur circulant, spécifiquement anti-FVIII ou lupiques, doit être recherché ;

- Si la concentration du facteur (FVIII) est < 1%, alors les temps obtenus avec toutes les dilutions donneront des valeurs proches de celle du tampon (témoin négatif) et la droite ne sera donc pas parallèle à la droite du plasma de référence.

Si les droites sont effectivement parallèles, le temps de coagulation du plasma test peut être lu, sur la courbe de référence, pour cette dilution.

#### 4.4.4.2 Méthode chromogénique

La méthode chromogénique est une méthode en deux temps. Un premier mélange réactionnel permet de générer du FXa de manière FVIII-dépendante. Ensuite, la mesure de la quantité de FXa ainsi générée permet la détermination de la quantité de FVIII dans le plasma test (voir Figure 15)



**Figure 15. Protocole de mesure d'activité pro-coagulante du FVIII par la méthode chromogénique.** La première étape consiste en la dilution du plasma de référence et du plasma à doser au 1/10, puis par dilution au 1/2 successive jusqu'à la dilution minimale à 1/40. Après ajout de FX, FIXa et FIIa en excès ainsi que de phospholipides et calcium, les dilutions sont incubées pendant 5 min à 37°C. La deuxième étape mesure la quantité de FXa générée au cours de la première par l'ajout d'un substrat chromogénique et 5 min d'incubation à 37°. La mesure d'absorbance à 405 nm permet de déterminer la quantité de FXa de manière FVIII-dépendante et d'en déduire l'activité pro-coagulante du FVIII dans l'échantillon à doser.

La génération de FXa est initiée par l'ajout d'un mélange de FIXa, FX en excès et de thrombine. Pendant l'incubation à 37°C (5 min), la thrombine active le FVIII en FVIIIa, en

présence de calcium et de phospholipides. La génération du FXa par le complexe ténase sera donc dépendante de l'activité du FVIII dans l'échantillon de plasma.

Cette quantité de FXa est mesurée dans un second temps, par l'ajout d'un substrat chromogénique de haute affinité pour le FXa et dont le produit (p-nitroanilline) est responsable d'une coloration jaune du mélange. Après cette deuxième incubation, l'absorbance du plasma est mesurée, à la longueur d'onde de 405nm, puis comparée à la gamme d'étalonnage en double logarithme établie avec un plasma de référence dont la concentration en FVIII est connue.

La méthode chromogénique, plus couteuse, présente néanmoins de nombreux avantages qui ne peuvent être négligés :

- Elles sont insensibles à la présence d'héparine ou d'anticorps inhibiteurs, spécifiques du FVIII ou non-spécifiques ;
- Elles permettent de s'affranchir de la présence éventuelle dans le plasma du patient de facteurs activés ;
- Certaines mutations du FVIII (176) ne peuvent être mises en évidence avec les tests en un temps, les déficits en FVIII:C ne pouvant être détectées qu'avec des tests à deux temps ;
- *A contrario*, d'autres mutations (177) à l'origine d'une diminution de l'activité pro-coagulante du FVIII ne peuvent être détectées avec les tests chromogénique ;
- Le phénotype clinique semble d'avantage corrélé à la valeur d'activité obtenue avec du test chromogénique (178).

Pour ces raisons, il est recommandé aux laboratoires spécialisés en hémostase de disposer des deux tests afin d'explorer, de manière fiable, les déficits en FVIII et les risques hémorragiques chez des patients présentant des mutations à l'origine de discordance entre les tests biologiques de mesure d'activité.

#### 4.4.5 Dosage antigénique du FVIII

Dans la très grande majorité des cas, le dosage de la protéine est effectué sur la base d'une technique ELISA. Chez certains patients hémophiles sévères (FVIII :C < 1UI/dL ou 1%), on retrouve la protéine, en quantité variable. Dans ces cas, le déficit est qualitatif ; la protéine est synthétisée mais n'est pas fonctionnelle et est donc dénuée d'activité procoagulante.

Ce dosage présente pourtant un intérêt puisque la détection de la protéine, même à l'état de trace, semble d'un pronostic favorable au regard de l'apparition d'anticorps inhibiteurs anti-FVIII secondairement à l'initiation du traitement substitutif (179).

#### 4.4.6 Diagnostic génétique

Le diagnostic génétique repose premièrement sur l'étude familiale de la pathologie. Comme expliqué précédemment, l'hémophilie A, au même titre que l'hémophilie B, est une maladie à transmission héréditaire récessive et liée au chromosome X. Les hommes sont donc théoriquement les seuls porteurs de la mutation délétère à exprimer la maladie. Les femmes quant à elles, sont dites vectrices ou conductrices. Parmi elles, les conductrices obligatoires seront différenciées des conductrices potentielles. Les premières sont filles d'un homme hémophile ou mères d'au moins deux enfants hémophiles, tandis que les vectrices potentielles sont filles d'une mère vectrice obligatoire et/ou sœur d'un hémophile ou mère d'un enfant hémophile.

Si les femmes sont habituellement exemptes de signes cliniques voire biologiques en conséquence de leur allèle muté, certaines auront pourtant des taux bas de FVIII dans les cas de :

- Lyonisation déséquilibrée : l'extinction du chromosome X concerne alors préférentiellement le chromosome ne portant pas la mutation sur le gène F8 ;
- Syndrome de Turner (45, X0) : ces femmes ne disposent que d'un seul exemplaire du chromosome X. L'allèle exprimé est systématiquement celui porté par cet unique exemplaire ;
- Filles de mère conductrice et de père hémophile (cas anecdotiques).

L'hémophilie A étant caractéristique d'un déficit fonctionnel et/ou qualitatif en FVIII, deux types de mutations seront retrouvées en conséquence. Ainsi les déficits qualitatifs sont dus à la production d'une protéine non ou peu fonctionnelle et affectée d'un défaut de stabilité, d'un défaut de liaison au complexe ténase, d'un retard de l'activation par la thrombine ou par une instabilité intrinsèque et sont donc très souvent liés à des mutations faux-sens. Au contraire, les déficits quantitatifs ou déficit en quantité de la protéine, sont secondaires à des défauts de synthèse, de sécrétion ou la sécrétion d'une protéine tronquée.

Dans l'hémophilie A, un seul réarrangement chromosomique est à l'origine de 45% des phénotypes sévères (180) et retrouvé chez près de 23 % des hémophiles (181). Cette anomalie est le résultat d'un réarrangement chromosomique entre une séquence de 9503 nucléotides située dans l'intron 22 du gène *F8* (int22h1) et l'une des deux copies de cette même séquence (int22h-2 et int22h-3) qui sont localisées à l'extrémité télomérique du même chromosome. Les séquences int22h-2 et int22h-3 étant respectivement à 300 et 400 kb de distance de la fin du chromatide, celui-ci peut, par repliement, appairer ces séquences inverses à celle de l'intron 22. Ce mésappariement conduit à deux types de réarrangements, type 1 et type 2, mettant en jeu l'une des deux séquences extragéniques (182). D'autres réarrangements, plus rares et mettant en jeu des séquences de moindre analogie avec l'intron 22, ont été mis en évidence (183) et confirment l'importance de l'intron 22 du gène du FVIII dans la fragilisation du bras long du chromosome X.

Sur le même principe, des séquences homologues de 1041 nucléotides situées dans l'intron 1 du gène *F8* (int1h-1) et environ 150 kb plus loin en position plus télomérique (int1h-2) sont la cause d'un réarrangement du chromosome retrouvé chez 5 % des hémophiles sévères (184, 185).

En dehors de ces grands réarrangements, la grande majorité des mutations à l'origine d'hémophilie A, tout phénotype confondu, sont des mutations dites ponctuelles et des réarrangements de petite taille. D'après les données issues de la littérature et de la base de données CHAMPs, remplaçante de la base HAMSTeRS (<https://www.cdc.gov>), les mutations faux-sens aboutissant à l'intégration d'un acide aminé anormal concerne 40 à

50% des mutations, suivi des petites délétions (20%), des mutations non-sens (8 à 11 %) et les erreurs d'épissage (6 à 7%) (186) (voir *Tableau 2*).

Mutations uniques	Nombres (%)		HA sévère (%)		HA modérée (%)		HA mineure (%)		Phénotype variable (%)		Inhibiteurs (%)		Sans inhibiteurs (%)		
<b>Total</b>		2931	1665	57 %	353	12 %	615	21 %	161	5 %	407	14 %	1586	54 %	
Mutation « single base »	Faux-sens	1439	49 %	480	33 %	242	17 %	541	38 %	125	9 %	94	7 %	886	62 %
	Non-sens	331	11 %	285	86 %	16	5 %	2	1 %	6	2 %	70	21 %	162	49 %
	Épissage	197	7 %	120	61 %	22	11 %	32	16 %	4	2 %	22	11 %	95	48 %
Insertions		95	3 %	66	69 %	13	14 %	7	7 %	0	0 %	10	11 %	51	54 %
Insertions/délétions															
Délétions	TOTAL	664	23 %	543	82 %	48	7 %	13	2 %	15	2 %	172	26 %	297	45 %
	Petites	526	18 %	424	81 %	41	8 %	13	2 %	11	2 %	92	17 %	263	50 %
	Large (> 50bp)	138	5 %	119	86 %	7	5 %	0	0 %	4	3 %	80	58 %	34	25 %
Duplications	TOTAL	182	6 %	151	83 %	11	6 %	2	1 %	10	5 %	34	19 %	77	42 %
	Petites	158	5 %	133	84 %	9	6 %	1	1 %	8	5 %	32	20 %	64	41 %
	Large (> 50bp)	24	1 %	18	75 %	2	8 %	1	4 %	2	8 %	2	8 %	13	54 %

**Tableau 2. Compilation des mutations enregistrées dans la base de données CHAMPs (MAJ 2014).** Le pourcentage des types de mutations a été calculé par rapport au nombre total de mutations répertoriées dans la base de données (nombre de mutations du type/nombre total de mutations). Les phénotypes cliniques et la susceptibilité à l'apparition d'auto-anticorps (lorsqu'elle est décrite) ont été calculés au regard du total des mutations de même type (phénotype/nombre de mutations du type).

Dans le cadre du diagnostic moléculaire de l'hémophilie A chez un patient, la recherche de la mutation familiale sera effectuée en première intention, le cas échéant. En l'absence de mutation connue ségrégant dans la famille du patient, le phénotype de la pathologie conditionnera la stratégie. En cas d'hémophilie A sévère, la recherche des inversions de l'intron 22 ou de l'intron 1 sera effectuée en première intention par Southern Blot après digestion par une enzyme de restriction (*BclI*) pour l'inversion de l'intron 22 ou par PCR longs fragments. En cas d'hémophilie modérée ou légère, ou en cas d'absence d'inversion d'intron chez un hémophile sévère, les exons seront étudiés par technique de criblage, de séquençage Sanger ou actuellement par séquençage haut débit (NGS : Next Generation Sequencer).

#### 4.4.7 Diagnostic prénatal

Le diagnostic prénatal s'inscrit dans une prise en charge globale d'une femme, supposée ou effectivement vectrice, en âge de procréer. C'est un acte médical, comportant dans le

cas de l'hémophilie sévère, une exploration génétique de la mère puis du fœtus, est encadré par les lois de Bioéthique.

Il doit systématiquement être accompagné d'un conseil génétique loyal, clair et adapté à la situation. Les possibilités de recours et les risques inhérents aux actes nécessaires pour parvenir au diagnostic doivent être formulés avec la même attention. La prise en charge de sa grossesse et de son accouchement doit également être expliquée.

Le diagnostic prénatal concerne les couples dont la femme est conductrice, potentielle ou obligatoire d'hémophilie sévère.

Dans le cas de la conduction, le statut génétique de la femme doit être confirmé. Le statut de conductrice sera confirmé après étude familiale (voir 4.4.6 Diagnostic génétique) où après recherche de la mutation ségrégant dans la famille.

Si la mère est conductrice, le sexe de l'enfant devra être déterminé. En effet, puisque l'hémophilie se transmet selon un mode récessif lié au chromosome X, seuls les hommes sont susceptibles d'exprimer un phénotype hémorragique. Cette étape nécessite une étude de l'ADN libre circulant fœtal dans le plasma maternel à partir duquel le sexe sera déterminé.

S'il s'agit d'un garçon, la recherche de l'anomalie génétique doit être effectuée. Dans le cas d'une suspicion d'hémophilie A sévère, une demande d'interruption médicale de grossesse peut être formulée.

La détermination du statut de conductrice d'une vectrice potentielle doit être faite de préférence avant la grossesse, dans le cas de mutation familiale. En effet, le diagnostic prénatal comporte de nombreuses étapes analytiques et pré-analytiques. Chacune de ces étapes est susceptible d'allonger de plusieurs jours le temps nécessaire au diagnostic, souvent source d'anxiété, et diminuant d'autant le temps disponible à la prise de décision par le couple au regard des différentes possibilités (187).

#### 4.5 Modèles animaux hémophiles A

Les modèles animaux sont cruciaux dans l'étude des nouvelles thérapeutiques. Les concentrés de FVIII recombinant ne font pas exception. Toutes les nouvelles molécules doivent être testées *in vivo*, par le biais de ces modèles, et faire preuve d'efficacité pro-coagulante, avant d'envisager un usage thérapeutique. Les doses et l'efficacité de ces molécules doivent être établies chez l'animal, atteint d'une pathologie identique, avant de permettre l'établissement d'un protocole d'essai clinique.

Le premier modèle animal est apparu en 1947, lorsqu'un éleveur a remarqué la susceptibilité au saignement de chiens de race Irish Setter. Brinkhous et collaborateurs se sont alors intéressés à ces chiens et ont ainsi été les premiers à mettre en évidence la déficience complète en FVIII de ces animaux (188, 189). Chez le chien, le phénotype clinique est proche de celui de l'homme avec une corrélation phénotype et activité résiduelle en FVIII semblable, permettant une classification de l'hémophilie en 3 grades similaires de sévérité. Depuis, d'autres lignées de chiens hémophiles A ont été établies (190).

Le second cas documenté d'hémophilie A chez l'animal concernait un mouton dont la naissance a été compliquée d'hémorragies (191, 192).

Cette lignée ovine n'a pas été entretenue mais les gamètes ont été cryo-conservés jusqu'en 2009 où la lignée a été réanimée. La mutation a alors été étudiée, révélant un codon stop prématuré dans l'exon 14. Chez le mouton, la corrélation clinique est biologique est similaire au chien et à l'homme. En revanche, les hémarthroses sont plus sévères que chez le canidé (193).

Pour ces deux modèles animaux, comme chez l'homme, les chances de survie sont limitées en l'absence d'injections de FVIII. Les concentrés de FVIII humains, s'ils sont efficaces, induisent un risque d'apparition d'inhibiteurs anti-espèces très important, rendant l'entretien de ces lignées difficile et coûteux (194).

Les premiers modèles murins hémophiles A transgéniques ont été générés en 1995 par l'équipe de Kazazian, après l'induction d'une interruption de l'exon 16 (E-16) ou de l'exon 17 (E-17) du gène *F8* (195).

Les souris ainsi obtenues par manipulation génétique, avaient des taux indétectables de FVIII. Pourtant, elles ne présentaient pas ou très peu de manifestations cliniques, conséquences de leur déficit en FVIII (196).

Par conséquent, si les incisions et le « tail clipping » (coupure du bout de la queue) induisaient des hémorragies mortelles en l'absence de cautérisation, le prélèvement dans les plexus retro-orbitaires a rapidement été décrit sans conséquence pour la souris hémophile. L'avantage de la maniabilité du modèle hémophilique s'ajoutait donc à celui de la praticité de l'espèce.

En effet, les souris sont, dans l'écrasante majorité des cas, le modèle le plus utilisé dans la recherche fondamentale et clinique. Ils ont l'avantage d'être peu coûteux, d'hébergement simple et leur reproduction rapide permet le maintien des lignées composées d'un nombre important d'individus. Pour ces raisons, le modèle murin est l'un des plus adaptés pour des études statistiques et pharmacocinétiques.

Enfin, Rockwell et collaborateurs ont décrit pour la première fois un cas de rat présentant spontanément un phénotype hémorragique associant saignements spontanés, hémarthroses, déformations articulaires (197). L'étude de ces rats, femelles et mâles, a permis la découverte d'une mutation faux-sens (p.Pro176Leu) dans le gène *F8* localisé sur le chromosome 18 et transmis sur un mode autosomique récessive.

Le modèle de rat présente de nombreux avantages similaires à la souris : reproduction rapide, faible coût d'hébergement, maniabilité. De plus, l'expression phénotypique de la déficience en FVIII en fait un modèle particulièrement adaptée à l'évaluation clinique des thérapies substitutives et des prises en charge associées dans le cadre de l'hémophilie A. Enfin, la caractérisation biochimique des molécules injectées est facilitée par la possibilité de prélever des volumes sanguins plus importants chez le rat que chez la souris.

## 4.6 Traitement de l'hémophilie

Jusqu'aux années 1940, la médecine est restée impuissante face à l'hémophilie limitant l'espérance de vie des malades, notamment celle des cas les plus sévères, à une dizaine d'années. Les transfusions sanguines ont, pour la première fois, permis la correction sur une courte durée du phénotype hémophilique (198, 199).

Pourtant, la découverte des cryoprécipités, plus riches en facteurs de la coagulation que le sang frais, a réellement révolutionné les traitements (200).

À partir de la fin des années 1960, les traitements évoluent très rapidement. Dès le milieu des années 70, les préparations de PPSB, concentrées en FII (**P**rothrombine), FVII (**P**roconvertine), FX (**S**tuart), FIX (facteur antihémophilique **B**) sont produits et utilisés dans la prise en charge de l'hémophilie B (201-203).

Parallèlement, Manucci et ses collaborateurs ont proposé pour la première fois l'utilisation de la desmopressine dans le traitement pour les hémophiles A modérés et certains patients atteints de la maladie de Willebrand (204).

Les avancées thérapeutiques étaient telles, qu'entre 1944 et 1989, l'espérance de vie d'un patient hémophile est passé de 17 à 50-60 ans.

Malheureusement, les pools de plasmas utilisés à la production des concentrés, mélangeant le sang de milliers de donneurs, ont permis la diffusion d'agents infectieux graves dont le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), identifié en 1983. La fréquence des injections de ces concentrés et la réunion en pool des plasmas nécessaires à leur production ont eu pour conséquence la contamination de la quasi-totalité des hémophiles par le virus du VIH et/ou des virus des hépatites C et B.

Après avoir balayé l'euphorie de cette révolution thérapeutique, ces années noires ont poussé les laboratoires pharmaceutiques à créer des facteurs recombinants, dénués de potentiels agents infectieux humains, à partir de la séquence des gènes du FVIII clonés en 1984 (95, 96). L'évolution des techniques de purification des facteurs issus de pools de plasmas humains a permis de limiter les risques de contamination jusqu'à le voir disparaître, tandis qu'en 1991-92, le premier facteur VIII recombinant était injecté (205, 206).

S'en sont suivies plusieurs générations de concentrés de FVIII associant minimisation des risques (infectieux notamment puis inhibiteurs) et amélioration de la protéine (voir 4.6.3 *Facteurs VIII recombinants*)

#### 4.6.1 *Rationnelle du traitement substitutif*

Si la Thérapie Génique quitte peu à peu ses airs de science-fiction, il n'existe toujours pas de traitement définitif de l'hémophilie.

Le traitement repose donc encore très majoritairement sur l'administration des concentrés de FVIII.

Historiquement deux protocoles thérapeutiques ont été avancés : les traitements dits « à la demande » et le traitement prophylactique. Les premiers proposent des injections de concentrés de FVIII lors de la survenue d'un saignement quand le deuxième préfère des injections régulières afin de minimiser le risque d'hémorragies, qu'elles soient provoquées ou spontanées. Depuis maintenant de nombreuses années, les avantages d'un traitement prophylactique ont été avancés au regard des séquelles irréversibles secondaires à des saignements répétés, même rapidement interrompus et ainsi de la qualité de vie des patients (207, 208).

Aujourd'hui encore, la prophylaxie primaire est recommandée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la World Federation of Hemophilia (WFH) (209) et l'International Society on Thrombosis and Hemostasis (ISTH) (210).

Deux paramètres majeurs doivent être considérés afin de fixer les modalités du traitement : la pharmacocinétique et la cible thérapeutique en activité pro-coagulante. La littérature est riche de protocoles divers variant sur les doses et les intervalles entre ces injections. Pourtant, ces études statuent toutes sur l'importance d'adapter le traitement en considérant donc la cible thérapeutique, la demi-vie de la protéine injectée, le patient et son activité, le phénotype hémorragique et le coût du traitement (207, 211, 212).

La cible thérapeutique conventionnelle est atteinte lorsque les taux circulants sont supérieurs à 1UI/dL à tout moment, c'est donc *a fortiori* la valeur cible de la résiduelle. Le taux de récupération des produits, quels qu'ils soient, est théoriquement de 200 % pour le FVIII. En pratique, cela signifie que l'injection d'1UI/kg permet d'obtenir une élévation de l'activité du plasma de 2 %. Ce taux de récupération doit être évalué pour chaque patient et sera pris en compte dans la mesure de la dose à injecter après le calcul suivant :

$$\text{Unités nécessaires} = P \times \text{FVIII :C} \times 1/n \quad (213)$$

Où :

- P : Poids corporel (kg) ;
- FVIII:C : augmentation souhaitée du taux de FVIII (%)(IU/dL) ;
- n : taux de récupération chez le patient (si 200% alors  $n=200/100=2$ ).

Pour prévenir les détériorations irréversibles secondaires aux hémarthroses même asymptomatiques, la prophylaxie reste l'attitude de choix (214). Elle doit être débutée avant les 3 ans de l'enfant après un maximum d'une seule hémarthrose et doit, si possible être continuée à vie. La prophylaxie primaire est cruciale durant les premières années de la vie, de la naissance et jusqu'à l'achèvement du développement. Il semble qu'à l'âge adulte, un relâchement de la prophylaxie pourrait avoir de moins lourdes conséquences (214). Cependant, aucune étude ne permet d'évaluer sur le long-terme, les risques d'une prophylaxie moins stricte chez le jeune adulte.

#### 4.6.2 Facteurs VIII dérivés du plasma : pdFVIII

Les concentrés de FVIII, comme pour le FIX, ont grandement souffert de la contamination massive des hémophiles au cours des années 1980. Après des avancées thérapeutiques vertigineuses, l'espérance et la qualité de vie des patients atteints d'hémophilie se sont améliorées pour la première fois et de manière spectaculaire. L'apparition du VIH et la découverte des contaminations de plusieurs milliers d'hémophiles à travers le monde ont

cependant entaché la réputation naissante des concentrés plasmatiques (voir 4.7.1 *Complications infectieuses*).

Pour réduire ce risque et tandis que la recherche internationale progressait sur le clonage du gène *F8*, les donneurs étaient désormais sélectionnés tandis que les industriels élaboraient des techniques de dépistage des agents infectieux, alors réalisés de manière systématique. Enfin, l'amélioration des protocoles de d'inactivation virale visant à éliminer toutes traces d'agents infectieux a permis de réduire le risque de contamination à son minimum.

Le traitement à la chaleur par pasteurisation modifiée a permis l'élimination du VIH, des virus de l'hépatite A (HAV) et B (HBV) des cryoprécipités, mais altérait les fonctions du FVIII. Les contaminations par le virus de l'hépatite C (HCV) perdurèrent (215, 216) jusqu'à l'élaboration des traitements des plasmas par solvant/détergent (217).

Enfin, différentes étapes de chromatographie ont achevé d'augmenter la sécurité des produits dérivés du plasma (218), qui associées à un dépistage strict de tous les dons de sang, ont permis de minimiser le risque infectieux.

<b>FVIII product</b>	<b>Factane®</b>	<b>Octanate®</b>
<b>DCI</b>	Moroctocof alfa	Turoctocog alfa
<b>Laboratoire</b>	LFB	Octapharma
<b>Génération</b>	Dérivé du plasma	Dérivé du plasma
<b>Structure</b>	FVIII humain	FVIII humain
<b>Origine</b>	Pools de donneurs bénévoles	Pools de donneurs bénévoles
<b>Demi-vie</b>	12h	12h
<b>Protéine dans le milieu de culture</b>	NC	NC
<b>Stabilisation par le vWF</b>	Oui	Oui
<b>Inactivation virale</b>	Traitement solvant/détergeant Nanofiltration	Traitement solvant/détergeant Traitement final à la chaleur sèche
<b>Purification</b>	Chromatographie par échange d'ions Ultrafiltration	Chromatographie par échange d'ions Ultra-diafiltration
<b>Statut</b>	Disponible	Disponible

**Tableau 3. Les concentrés de FVIII dérivés du plasma, disponibles en France.** Tous les produits dérivés du sang commercialisés en France doivent être obtenus à partir de sang de donneurs bénévoles. Les deux concentrés de FVIII plasmatique disponibles sont stabilisés par le facteur Von Willebrand. Les étapes de purification, associées aux procédés d'inactivation virale, participent à la sécurité infectieuse des produits.

Actuellement, les protocoles associent obligatoirement une technique d'inactivation des virus (solvant/détergent ou traitement à la chaleur sèche) ainsi que la nanofiltration pour les virus nus et la protéine prion pour le nouveau variant de la maladie de Creutzfeld-Jacob.

Aujourd'hui, deux concentrés de FVIII sont disponibles sur le marché en France (voir *Tableau 3*).

Aujourd'hui, l'initiation de traitement par des facteurs dérivés du plasma (pdFVIII) est devenue plus marginale au profit des concentrés de rFVIII. Depuis quelques dizaines d'années, des études visent à établir un lien de causalité entre l'apparition des inhibiteurs (voir *4.7.2 Complications non-infectieuses*), complication désormais majeure du traitement, et l'utilisation des rFVIII.

#### *4.6.3 Facteurs VIII recombinants : rFVIII*

Parallèlement à l'amélioration rapide des procédés de purification et de sécurisation des concentrés dérivés du plasma et dès le clonage du gène du FVIII, l'industrie pharmaceutique s'est attelée à développer des concentrés recombinants par génie génétique. Moins de 10 ans après le clonage, les premiers rFVIII étaient évalués au cours d'essais cliniques (219, 220).

Trois générations différentes se sont succédées ces 30 dernières années. La première concernait les rFVIII dit « full length » (pleine longueur) dont la production cellulaire nécessitait l'utilisation de sérum protéique animal (bovin) et dont le conditionnement contenait un ajout d'albumine aux fins de stabilisation. La deuxième génération a éliminé l'albumine des conditionnements, la remplaçant par des stabilisateurs chimiques de la famille des oses (sucrose, tréhalose...) tout en utilisant des milieux de culture cellulaire enrichis des mêmes sérums. Enfin, la troisième a définitivement éliminé les protéines humaines ou animales des procédés de production et de conditionnement (voir *Tableau 4*).

Les concentrés de rFVIII diffèrent sur plusieurs critères (voir *Tableau 4*) :

- Le type cellulaire utilisé pour leur production ;
- Les protocoles de purifications utilisés afin d'éliminer les impuretés des produits finis ;
- Les traitements anti-infectieux dont la rigueur n'a cessé d'augmenter au fil des générations.

Les premiers rFVIII utilisaient l'ADN complémentaire (ADNc) de la molécule native du FVIII. La production des premiers rFVIII était réalisée sur des lignées cellulaires rénales de bébés hamsters (BHK). En 1991, les résultats des essais cliniques confirmaient l'absence de différences pharmacocinétiques entre ce premier rFVIII et les pdFVIII. Par conséquent, l'efficacité clinique était comparable, que ce soit en prophylaxie primaire ou en cas d'épisode hémorragique (219).

L'existence dans le plasma humain de multiples formes du FVIII au regard de la taille du domaine B résiduel, conservant pourtant la même activité pro-coagulante, a poussé la recherche à imaginer la création d'un variant protéique sans domaine B (résidus 760 à 1639), celui-ci étant remplacé par un « linker ».

Les premiers variants (LA-rFVIII), portant une délétion des résidus 760 à 1639, ont ainsi permis de décrire d'importantes améliorations de la transcription en conséquence de la délétion du domaine B. Une augmentation du taux d'ARNm d'un facteur 10 a été mesurée sur des lignées COS-1, et d'un facteur 17 sur des lignées CHO(221). Pourtant, la sécrétion de la protéine s'avérait décevante avec une augmentation limitée à 30 %. Ce variant était similaire au pdFVIII en termes de caractéristiques biochimiques à l'exception d'une sensibilité augmentée au clivage par la FIIa (222).

Le variant rFVIII delta II (délétion du résidu 771 à 1666) obtenait des résultats similaires mais les formes majeures retrouvées dans les surnageants de production était des formes monomériques combinant de manière covalente la chaîne lourde et la chaîne légère du FVIII, ainsi que deux formes de chaînes lourdes monomériques et de taille variable (223).

	Recombinat®	Kogenate®	Helixate®	Kogenate FS®	Helixate FS®	ReFacto®	Kovaltry®	Advate	ReFacto AF®	Novoeight®	Nuwiq®	Adynovate®	N8-GP®	Elocta®	Afstyla®
<b>DCI</b>	Octocog alfa					Moroctocog alfa	Octocog alfa		Moroctocof alfa	Turoctocog alfa	Simoctocog alfa	Octocog alfa pegol	Turoctocog alfa pegol	Efmoroctocog alfa	Lonoctocog alfa
<b>Laboratoire</b>	Shire	Bayer	CSL Behring	Bayer	CSL Behring	Pfizer	Bayer	Shire	Pfizer	Novo Nordisk	Octapharma	Shire	Novo Nordisk	Biogen	CSL Behring
<b>Génération</b>	Première			Deuxième		Deuxième	Troisième	Troisième	Troisième	Troisième	Troisième	Quatrième	Quatrième	Quatrième	Quatrième
<b>Structure</b>	Pleine longueur	Pleine longueur	Pleine longueur	Pleine longueur	Pleine longueur	BDD-rFVIII	Pleine longueur	Pleine longueur	BDD-rFVIII	BDD-rFVIII	BDD-rFVIII	rFVIII pégylé	rFVIII pégylé	Protéine de fusion : rFVIII+Fc	FVIII « single chain »
<b>Lignée cellulaire</b>	CHO	BHK	BHK	BHK	BHK	CHO	BHK	CHO	CHO	CHO	HEK	CHO	CHO	HEK	CHO
<b>Demi-vie</b>	14,6 ± 4,9	14,6 ± 4,9	13,7 ± 4,9	13,74 ± 1,82	13,7 ± 1,82	11,2 ± 5,0	14,2 ± 3,5	12,0 ± 4,2	11,2 ± 5,0	10,8-12h	17,1 ± 11,2	14,69 ± 3,79	22h	19,7 ± 2,3h	14,2
<b>Protéine dans le milieu de culture</b>	BSA Aprotinine	Albumine (plasma humain)	/	/	/	/	/	/	/	/	/				
<b>Stabilisation</b>	Albumine humaine	Albumine humaine	Albumine humaine	Sucrose	Sucrose	Sucrose	Sucrose	Mannitol Tréhalose	Sucrose	Sucrose	Sucrose	Mannitol Tréhalose	NC	Sucrose	Sucrose
<b>Inactivation virale</b>	Pasteurisation	Traitement solvant/détergeant Nanofiltration	Traitement solvant/détergeant	Traitement solvant/détergeant Nanofiltration	Traitement solvant/détergeant Nanofiltration	Traitement solvant/détergeant Nanofiltration	Traitement solvant/détergeant	NC	Traitement solvant/détergeant Nanofiltration	NC					
<b>Chromatographie immuno-affinité</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	NC	+	NC
<b>Statut</b>	Disponible	Arrêt	Arrêt	Disponible	Disponible	Arrêt	Disponible	Disponible	Disponible	Disponible	Disponible	AMM en cours	Essai clinique	Disponible	AMM (2017)

**Tableau 4. Historique des concentrés de FVIII recombinant de 1<sup>ère</sup>, 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> générations.** BHK : Baby Hamster Kidney ; CHO : Chinese Hamster Ovary ; HEK : Human Embryonic Kidney ; BDD : B-domain deleted ; Fc : Fragment Fc des Immunoglobulines humaines ; BSA : Bovin Serum Albumin

Sources : RCP et commissions de transparence (<https://www.has-sante.fr/>) (<https://www.vidal.fr/>) et Comparison Charts (<http://www.bdipharma.com>), informations laboratoires (<https://www.eloctate.com>),

D'autres variants ont été étudiés, tous concernés par la contamination par cette même forme monomérique et inactive du FVIII (224). Un seul d'entre eux (délétion des résidus 797 à 1562) a démontré une nette augmentation de la production d'une forme active de la protéine(225), mais dont l'injection induisait une forte réponse immunitaire contre le linker résiduel(226).

Une étude a alors déterminé l'emplacement des points d'initiation et de terminaison de la délétion du domaine B, afin d'obtenir une protéine finale :

- Active (donc hétérodimérique) ;
- Dépourvue de domaine B : sous sa forme minimale composée d'une chaîne légère de 80 KDa et chaîne lourde de 90 KDa (correspondant à une délétion du résidu 740 au résidu 1648) ;
- Sans trace d'un linker non-naturel : afin de minimiser l'immunogénicité du variant protéique.

En 1998, ReFacto® est alors commercialisé par le laboratoire Wyeth (Madison, NJ, USA) et ce, après avoir évalué son efficacité et son innocuité (227-229). Il est le premier rFVIII comportant une délétion entre les résidus 749 et 1639 (variant rFVIII BDD SQ), permettant la production accrue d'un variant protéique à deux chaînes. Le domaine B est réduit à une séquence de 5 acides-aminés (230).

Aujourd'hui, le ReFacto® AF (Pfizer, NYC, NY, USA) remplace son prédécesseur de 2<sup>e</sup> génération après l'élimination des protéines humaines et animales des procédés de fabrication (231).

Le NovoEight® (NovoNordisk, Glaxo, Danemark), commercialisé en 2014, variant BDD-rFVIII, a montré son efficacité tout en ayant l'avantage de ne pas être sujet aux discordances entre l'essai chromogénique et sa mesure coagulométrique à l'inverse du ReFacto® (232, 233). Le suivi thérapeutique par mesure d'activité pro-coagulante du FVIII peut donc être réalisé avec les deux tests.

Enfin, le Nuwiq® (Octapharma, Lachen, Suisse) diffère de ses deux concurrents par une production sur des lignées cellulaires humaines, avec une fidélité augmentée par rapport au pdFVIII au regard de ses PTMs (134, 234).

Plus récemment, la modification des procédés de fabrication du Kogenate® a abouti à la commercialisation du Kovaltry® (Bayer, Leverkusen, Allemagne). La même lignée cellulaire est utilisée (BHK) mais a été co-transfectée par le gène de la HSP70, permettant une production augmentée ainsi qu'une meilleure sialylation des N-glycosylation de la protéine. Les procédés de purification ont également été améliorés afin d'accroître la sécurité infectieuse tout en minimisant la contamination par des impuretés (235) (voir 3.3.1 Biosynthèse du FVIII).

L'ensemble des FVIII recombinants disponibles en France ont été listés dans le *Tableau 3*.

#### 4.6.4 Facteurs VIII à demi-vie prolongée

Les facteurs à demi-vie prolongée comptent parmi les derniers concentrés de rFVIII commercialisés, le but étant, alors que la sécurité de leurs prédécesseurs est éprouvée, d'améliorer les protéines aux fins de réduire le nombre d'injections hebdomadaires (voir *Tableau 3*).

Plusieurs techniques ont été utilisées :

- Protéines chimériques : Elocta® (Bioverativ, Biogen, Cambridge, MA, USA)

Le FVIII est ici « fusionné » à une autre protéine afin de moduler les voies d'élimination métabolique du FVIII et de permettre un recyclage de la protéine. En effet, les immunoglobulines sont connues pour utiliser les voies métaboliques du FcRn (neonatal Fc Receptor), permettant aux protéines endocytées, d'éviter les voies du catabolisme intracellulaire au profit d'un recyclage vers la membrane et d'une remise en circulation (236). Si les immunoglobulines ont une demi-vie très longue dans l'organisme, l'accroissement de la demi-vie du FVIII fusionné à leur fragment Fc s'est avéré beaucoup plus modeste. Une affinité amoindrie avec le VWF a alors été suspectée (137). Elocta se caractérise pourtant par l'accroissement le plus important parmi ses pairs actuels et

permet ainsi un espacement des injections suffisant pour améliorer la qualité de vie des patients traités (237, 238); Il est le seul variant à demi-vie prolongée à être actuellement commercialisé en France.

- Variant « single chain »: Afstyla® (CSL Behring, King of Prussia, PA, Australie)

La demi-vie du FVIII est grandement limitée par sa fragilité. Cette labilité intrinsèque est le résultat de sa conformation hétérodimérique, maintenue par des liaisons faibles et la coordination par l'ion cuivre divalent. L'Afstyla est caractérisé par sa conformation monomérique, les deux chaînes étant alors liées de manière covalente, rendant ainsi la protéine plus stable. Les zones ciblées par les subtilisines, responsables de sa dimérisation, ont, en effet, été mutées. D'autre part, l'affinité pour le VWF, protecteur physiologique du FVIIIa est augmentée significativement induisant une meilleure protection de la protéine en circulation (239, 240). En plus de participer à l'accroissement de la demi-vie de la protéine, cette liaison accrue au VWF pourrait permettre une réduction de l'immunogénicité de la protéine en réduisant l'endocytose par les cellules dendritiques (241, 242).

Enfin, au moment de son activation, la molécule se dimérise et est libérée du complexe pour assurer ses fonctions pro-coagulantes. Les résultats obtenus lors des essais cliniques ont permis de démontrer sa bioéquivalence tandis qu'aucun des patients inclus (« previously treated patients ») n'a développé d'anticorps inhibiteurs (238).

En revanche, l'augmentation de la demi-vie apportée par la molécule ne semble pas en mesure de permettre une réduction du nombre d'injection hebdomadaire chez les patients hémophiles A. De plus amples études cliniques pourraient confirmer ou infirmer sa place au sein des concentrés de la 4<sup>e</sup> génération.

- Pegylation : Adynovate® (Shire, Dublin, Irlande) et N8-GP (NovoNordisk, Glaxo, Danemark).

La capacité de la pégylation à influencer positivement la pharmacocinétique de molécules est aujourd'hui utilisée pour de nombreuses autres classes pharmaceutiques (243). Elle

permet en effet de réduire la dégradation du FVIII en introduisant sur le manteau glycoprotéique, des résidus poly-éthylène-glycol réduisant la clairance et la sensibilité au catabolisme enzymatique de ces protéines. L'encombrement stérique résultant de leur intégration pourrait également avoir un effet positif sur l'immunogénicité des rFVIII (243). Contrairement aux concentrés FIX de demi-vie allongée, les résultats pour l'amélioration du FVIII sont nettement moins spectaculaires avec une augmentation d'un facteur 1,2 à 1,8 (voir *Tableau 4*).

Actuellement, Elocta® (Bioverativ, Biogen, Cambridge, MA, USA) est le seul variant à être commercialisé, en France, avec une demi-vie d'environ 19h (x 1,6).

La société Bioverativ travaille actuellement l'une des molécules les plus prometteuses en termes de demi-vie et d'amélioration de la qualité de vie. En effet, la protéine de fusion rFVIII<sub>1-2</sub>Fc-VWF-XTEN a été décrite comme ayant une demi-vie 4 fois supérieure à la demi-vie du FVIII plasmatique tout en permettant une injection sous cutanée de la molécule (244). Le rFVIII<sub>1-2</sub>Fc-VWF-XTEN est une protéine de fusion FVIII<sub>1-2</sub> à laquelle ont été greffés en position C-terminale, les domaines D'-D<sub>3</sub> du VWF. Cette association covalente au domaine D'D<sub>3</sub> permettrait de (1) s'affranchir de la demi-vie du VWF, facteur crucial de la demi-vie du FVIII, et (2) d'apporter à la molécule une stabilité intrinsèque sans nécessiter sa prise en charge par la protéine en milieu physiologique. A cette construction, sont ajoutées des chaînes peptidiques de la technologie XTEN (peptides composés d'acides aminés hydrophobes, Genentech), dont la séquence et la longueur sont définies en fonction des caractéristiques physicochimiques adaptées à la modification pharmacocinétique souhaitée (245).

#### 4.6.5 Anticorps bispécifiques

L'apparition d'anticorps inhibiteurs concerne 30 % des patients atteints de formes sévères de l'hémophilie A. Ils sont de fait, la plus importante complication du traitement et ont un impact important sur la clinique, sur les possibilités thérapeutiques et sur le coût des traitements (246) (voir 4.7.2 *Complications non-infectieuses*).

Les anticorps bispécifiques sont des immunoglobulines recombinantes et humanisées, affines pour le FX et le FIXa et capables de rapprocher ainsi l'enzyme de son substrat zymogène à la manière du catalyseur naturel : le FVIII (247).

Les essais cliniques l'ont montré non-toxiques aux doses thérapeutiques, et significativement efficace dans la réduction des saignements, chez des patients avec ou sans inhibiteur, à raison d'une unique injection hebdomadaire et sous-cutanée (248).

L'étude HAVEN a récemment démontré leur efficacité sur les patients hémophiles avec inhibiteurs. En effet, Emicizumab réduit le risque de saignement de 83% par rapport à l'absence de prophylaxie chez les patients avec inhibiteurs et réduit de 79% ce même risque lorsqu'il est comparé aux complexes de prothrombine activée (FEIBA) (249). Aucun patient n'a développé d'anticorps anti-immunoglobuline.

Quelques cas d'accidents thrombotiques graves ont été déclarés chez des patients dont le traitement associait Emicizumab et le FEIBA. Aucune complication de ce type n'a été retrouvée chez les patients sans traitement adjuvant ou en association avec le FVIIa.

Si leur place au sein des recommandations de prise en charge des hémophilies reste à déterminer, les anticorps bispécifiques sont la première alternative aux traitements substitutifs actuels, en cas d'apparition d'anticorps inhibiteurs anti-FVIII. Leur voie d'administration et la fréquence faible des injections, associées à une réduction nette du risque de saignement, pourraient représenter une amélioration importante de la qualité de vie des patients en prophylaxie primaire (250).

## 4.7 Complications liées au traitement

### 4.7.1 *Complications infectieuses*

La concomitance de ces avancées permettant d'isoler les facteurs dans les cryoprécipités de pools de plasmas et de la naissance de l'épidémie du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) a eu des conséquences dramatiques, et a anéanti les espoirs pour les jeunes hémophiles d'avoir une vie normale. Au début des années 80, le Center for Disease Control (CDC) reportait des cas de patients hémophiles atteints des symptômes d'une immunodéficience acquise (251). Ce même rapport identifiait pour la première fois

l'étroite ressemblance entre les infections intercurrentes observées et le syndrome d'immunodéficience alors réservé aux homosexuels masculins et aux consommateurs de drogues intraveineuses et identifié quelques années plus tard par l'équipe de Luc Montagnier (252) et renommé VIH en 1986.

A posteriori, le risque encouru était démesuré ; les facteurs étaient alors produits à partir de cryoprécipités issus des pools de dizaines de milliers de plasmas sans qu'aucune méthode ne puisse dépister les plasmas ou leurs donneurs. Ces mêmes produits étaient ensuite injectés par voie intraveineuse à tous les hémophiles. Le bilan s'est avéré très lourd ; il est estimé que près de 50% de ces hémophiles auraient ainsi été contaminés par le VIH, la totalité par le HCV (253).

Si l'infection par le HBV évolue majoritairement vers la clairance du virus sans retentissement clinique, l'infection par le HCV est de bien plus sombre pronostic puisqu'évoluant dans 90% des cas vers un portage chronique, une fibrose puis une cirrhose hépatique pour aboutir finalement à un carcinome hépatocellulaire dans près de 10 % des cas. Avant les récentes découvertes de l'industrie pharmaceutique, l'utilisation combinée de ribavirine et interféron n'offrait que très peu de résultat (254) et le recours à la transplantation hépatique est restée exceptionnelle et complexe chez ces patients (255).

La fréquence de la coinfection HCV/VIH eut également de graves conséquences, augmentant le risque d'évolution vers des pathologies hépatiques jusqu'à réduire leur survie à long-terme de plus de 51% (256).

Jusqu'à la fin des années 90, la survenue d'une potentielle nouvelle infection par ces virus a été scrupuleusement surveillée (257, 258). Malgré l'absence de nouvelle contamination depuis 1986, l'apparition d'un nouvel agent infectieux pourrait bouleverser à nouveau l'histoire du traitement. Les virus enveloppés sont éliminés par les traitements solvant/détergeant (217) et la nanofiltration élimine les virus non-enveloppés (259, 260). Cependant des doutes persistent, d'une part au regard d'agents infectieux non-viraux, comme les prions (258) et d'autre part à la possibilité de l'émergence d'un agent pathogène non-encore identifié, comme le fut le HIV, il y a maintenant 40 ans.

#### 4.7.2 *Complications non-infectieuses*

Les inhibiteurs sont des anticorps circulants, dirigés contre le FVIII et capables de l'inactiver par l'encombrement stérique de sites cruciaux pour les fonctions pro-coagulantes de la protéine.

Aujourd'hui encore, les conséquences de l'apparition de ces inhibiteurs sont lourdes au regard du pronostic, occasionnant un risque de saignement accru (261), et de la gestion du traitement (262).

La fréquence d'apparition de ces anticorps inhibiteurs est importante chez les hémophiles B (ils sont alors dirigés contre le FIX) mais l'est davantage chez les hémophiles A sévères avec une prévalence d'environ 30% dont la cause est sujette à débat (263-265).

Il est maintenant reconnu que certains facteurs génétiques influencent le risque d'apparition d'anticorps inhibiteurs :

- Histoire familiale de développement d'inhibiteur, notamment les enfants de même fratrie (179, 266, 267) ;
- Les origines ethniques avec un risque augmenté d'un facteur 2 pour les populations afro-américaines et hispaniques par rapport aux populations caucasiennes (268) ;
- Le type de mutation : les mutations ayant pour conséquence l'absence de FVIII, la production d'une protéine tronquée (269), un décalage important du cadre de lecture (270), ou une erreur d'épissage (271) sont à haut risque d'apparition d'anticorps inhibiteurs ;
- Certains polymorphismes génétiques concernant des gènes impliqués dans l'immunité ou l'inflammation induisent une augmentation du risque leur d'apparition (272).

Ces facteurs génétiques favorisant sont potentialisés par des facteurs des risques non-génétiques et hautement dépendants de la mise en place et des modalités du traitement. En effet, il a été montré que la thérapie prophylactique réduit le risque d'apparition d'anticorps inhibiteurs par rapport aux traitements à la demande, en permettant une exposition prolongée et moins immunogène au FVIII (265). L'exposition intensive au moment de la mise en place est un autre facteur prédisposant. Dans le cadre de l'initiation du traitement, le risque est corrélé à l'importance de la dose (273) et de la durée d'exposition à cette dose élevée (265, 273). Il est ainsi recommandé d'initier le traitement avec de faibles doses de concentré de FVIII pendant les premières semaines du traitement substitutif.

La fonction du FVIII au sein du processus de la coagulation est très dépendante de ses PTMs (voir 3.3.1. *Biosynthèse du FVIII*). Par sa haute glycosylation, le FVIII porte, de manière intrinsèque, un potentiel immunogène et une éventuelle différence entre le caractère immunogène des rFVIII et pdFVIII reste un sujet de recherche et de controverse.

Des études (274) et méta-analyses (275) tendent vers une immunogénicité supérieure des rFVIII par rapport aux pdFVIII, évaluée par l'incidence d'apparition *de novo* d'anticorps anti-FVIII inhibiteurs chez des patients au déficit en FVIII sévère (< 1 %) et naïf de traitement. D'autres études réfutent ce lien statistique entre l'augmentation du risque d'apparition de ces inhibiteurs et l'utilisation des rFVIII(264). Aledort et collaborateurs attribuaient une augmentation significative de l'incidence de ces inhibiteurs lors de l'utilisation de rFVIII dont la séquence codant pour le domaine B est supprimée (BDD-rFVIII) par rapport aux rFVIII pleine longueur (FL-rFVIII) (276, 277). La même étude ne mettait pas en évidence une différence significative entre les rFVIII produits sur des cellules ovariennes de hamsters chinois (cellules CHO) ou rénales de bébés hamsters (cellules BHK) ce qui est pourtant infirmé par trois autres suivis de cohortes prospectifs (278-280).

En 2013, les premières études de conception et de caractérisation du Nuwiq® apportaient des données concrètes sur les différences physico-chimiques des rFVIII selon leur origine en comparant les rFVIII de l'actuel arsenal thérapeutique, les pdFVIII et le premier rFVIII produit sur des cellules rénales humaines (HEK) (134). Kannicht et collaborateurs décrivaient alors pour la première fois l'influence du choix cellulaire pour produire les rFVIII sur les PTM observables sur la protéine finale non-activée. Deux grands axes causaux sont alors avancés :

- L'évolution du matériel enzymatique cellulaire au cours de l'évolution avec perte ou acquisition d'enzymes par les soumissions des espèces (mammifères) à des contraintes de sélection génétique différentes. Les motifs galactose-alpha<sub>1,3</sub>-galactose (alpha-Gal) et N-acetylneuraminic acid (Neu5c), produits par des enzymes perdus au cours de l'évolution par l'homme mais présents chez de nombreux mammifères, sont impliqués dans de nombreuses réactions immunitaires (134);
- L'existence de gènes à expression tissus-spécifique, notamment le FVIII, régissent les capacités enzymatiques selon l'origine tissulaire des cellules utilisées.

Si toutes ces études alimentent les controverses par leurs forces et leurs faiblesses statistiques, la communauté scientifique semble s'accorder sur l'existence de différences entre les FVIII issus du génie génétique et le FVIII plasmatique. En parallèle, de nombreuses recherches tendent à évaluer, de la manière la plus précise possible, l'impact des PTMs sur l'immunogénicité des FVIII. Des études ont démontré l'importance des PTMs du FIX (281), étant pourtant un moindre sujet aux variations épigénétiques, en fonction de l'origine cellulaire notamment au regard de son taux de récupération. Il est donc probable que les PTMs du FVIII, bien plus nombreuses, aient une influence sur son immunogénicité, sa stabilité dans le compartiment circulant sinon son activité plasmatique au sein de la cascade de la coagulation.

Parallèlement à la recherche d'amélioration des caractéristiques pharmacocinétiques, les études explorant la fidélité des modèles cellulaires utilisés au regard des caractéristiques post-traductionnelles du FVIII se sont accrues. Pourtant, aucune n'a évalué la possibilité de produire un FVIII sur des cellules hépatiques : hépatocytes ou lignées sinusoidales de l'endothélium.

Ce travail avait pour objectif de (1) créer un nouveau modèle cellulaire humain et hépatique capable de produire un rFVIII dont la séquence, élaborée au sein de l'unité de recherche, a démontré des capacités de production augmentée *in vitro* et (2) de caractériser cette séquence *in vivo*, par le biais de l'injection hydrodynamique sur des souris hémophiles A.

# MATÉRIELS & MÉTHODES

## 1 Conditions de culture et transfection cellulaire

### 1.1 Cellules eucaryotes

Quatre types cellulaires ont été inclus dans l'étude.

- Lignée CHO, cellules issues d'ovaires de hamsters chinois [ECACC 85050302, Sophia-Antipolis, France]. La lignée est cultivée dans un mélange de IMDM (milieu Dulbecco-Iscove, Gibco, ThermoFisher, distributeur français), L-glutamine (1%) (Gibco), pénicilline/streptomycine (1%) (Gibco) et de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF).
- Lignée hépato-carcinomeuse humaine (Huh7) [JCRB0403] dont l'intérêt dans la production du FIX a été démontré (282), est entretenue dans un milieu DMEM F12 en présence de L-glutamine (1%), de streptomycine et pénicilline (1%) et de 10 % de Fetal Clone II (FetalClone® II, GE Healthcare Lifescience, Vélizy, Villacoublay, France) décomplémenté.
- Lignée HEK [ATCC® CRL-1573™] immortalisée à partir de cellules rénales humaines est maintenue dans un mélange de DMEM, d'un mélange commercial d'acide aminé non-essentiels (NEAA), de L-glutamine (1%) et de pénicilline/streptomycine (1%) et de Fetal Clone II.
- Lignée TRP3 immortalisée à partir de cellules endothéliales sinusoidales d'un foie humain après hépatectomie (283) est cultivée dans un milieu MCDB 131 (Gibco) en présence de 12,5 mL d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Sigma-Aldrich, L'Isle-d'Abeau, France) (12,5mg/mL), de 39,5 mL d'hydrocortisone (35mM), de 25 mL de L-glutamine (Gibco) et de 5 mL du mélange pénicilline/streptomycine (100 X) (Gibco) et de 20 % de Fetal clone II.

L'atmosphère de culture, identique pour toutes les lignées, est composée de 5 % de CO<sub>2</sub> et est saturée en eau. La température est contrôlée et maintenue à 37°C.

Les cellules à confluence ont été lavées deux fois avec du PBS 1X (Phosphate Buffer Saline, Gibco) avant d'être décollées par une solution de trypsine 1X (Gibco) diluée dans du PBS 1X à 37°C pendant 5 min. Les cellules ont ensuite été reprises dans leur milieu de culture complet puis centrifugées à 1200 rpm pendant 5 min à 20 °C.

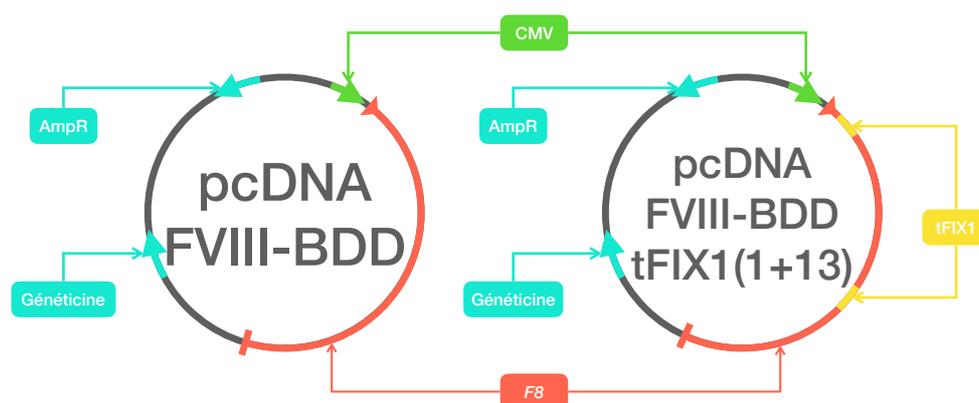
Le culot cellulaire a été ensuite repris dans le milieu de culture pour un nouvel ensemencement.

Les cellules TRP3 ont été ensemencées sur des surfaces ayant préalablement été recouvertes par 100 µL/cm<sup>2</sup> de gélatine 0,1% pendant ≥ 1h à 37°C, puis rincées au PBS 1X.

## 1.2 ADN complémentaire (ADNc) du FVIII

La séquence d'ADNc FVIII-BDD-tFIX1(1+13) (séquence L0), utilisée pour transfecter les différents types cellulaires a été créée (et brevetée) dans l'unité de recherche (284). Elle est caractérisée par l'absence de domaine B, remplacé par 4 résidus arginine (Arg).

Dans les domaines A1 et A2 du FVIII, en position des introns 1 et 13, ont ensuite été introduites deux copies d'une séquence tronquée de l'intron 1 du FIX (tFIX1) afin d'augmenter la sécrétion du FVIII d'un facteur 5 à 10 (284) (voir Figure 16)



**Figure 16.** Carte du plasmide pcDNA-FVIII-L0. Le gène du FVIII est placé en 3' d'un promoteur hépatique (promoteur du cytomégalovirus). Les deux copies de l'intron 1 tronqué du FIX ont été insérées en position des introns 1 et 13 du FVIII et sont flanquées de sites de restriction afin de permettre leur élimination.

Cette séquence a été insérée dans une structure plasmidique : le pcDNA3.1 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

Au cours de cette étude, elle sera comparée à une séquence complémentaire du FVIII identique à l'exception de l'insertion des introns : pcDNA FVIII-BDD-WT.

### 1.3 Transfection

Les cellules ont étéensemencées à raison de  $5 \cdot 10^5$  cellules/28,3 cm<sup>2</sup> ou  $1 \cdot 10^6$ /78,5 cm<sup>2</sup>. À 80% de confluence, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS 1X avant d'être placées dans leur milieu de culture complet pour la transfection.

Pour chaque puits de 3,5 ou 10 cm de diamètre, 1 ou 2 µg d'ADN respectivement ont été solutionnés dans 6 µL de réactif de transfection X-tremeGENE 9 (Roche diagnostics, Meylan, France). Ce mélange a été additionné à du milieu sans SVF en quantité suffisante pour un volume final de 200 à 250 µL/puits. Après 15 min de stabilisation à température ambiante, le mélange a été réparti goutte-à-goutte sur la surface du tapis cellulaire.

La construction plasmidique, pcDNA3 FVIII+tFIX1 (1+13), a été testée par :

- Transfection transitoire :

À 48h de la transfection, le milieu enrichi en SVF a été récolté et remplacé par un milieu sans SVF. Après 48h d'incubation en milieu SVF-, celui-ci a été récolté et les cellules lysées.

- Transfection clonale :

Après 24 h d'incubation, l'antibiotique de sélection, la généticine ou G418 (solution à 50mg/mL, 20 mL, Gibco), est ajoutée au milieu afin de sélectionner les lignées clonales effectivement transfectées.

### 1.4 Clonage

Après ajout de la généticine en quantité suffisante pour une concentration finale à 0,5mg/mL, les cellules ont été entretenues dans un milieu de culture renouvelé deux à trois fois par semaine (selon le développement). Après apparition de colonies clonales

délimitées sur la surface de culture, celles-ci ont été repiquées individuellement dans les puits d'une plaque 96 puits.

À confluence, la quantité de FVIII sécrétée dans le surnageant a été mesurée dans le milieu de culture à l'aide d'un kit ELISA ASSERACHROM® VIII :Ag (Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France). Seuls les clones les plus producteurs ont été amplifiés et congelés.

## 1.5 Lyse cellulaire

Le milieu de culture a été éliminé et après 2 lavages avec du PBS 1 X, les cellules ont été décollées de la surface par grattage dans un volume de 100 à 500 µL de PBS. Après centrifugation à 13 000 rpm pendant 15 min à +4 °C, le culot a été repris dans 200 mL de tampon de lyse.

Tampon lyse :

- 10mM HEPES, pH 7,5 (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne) ;
- 100 mM KCL (Chimieplus Laboratoire, Saint-Paul-de-Varax, France) ;
- 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Chimieplus Laboratoire) ;
- 0,5 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich).

Le mélange a été homogénéisé puis incubé pendant 20 min avant d'être centrifugé à nouveau à 13 000 rpm pendant 15 min. Le culot de débris cellulaires a été éliminé et le surnageant conservé à -20 °C.

## 2 Production de FVIII

La production de FVIII a été effectuée dans différents supports selon le tableau 1. Le FVIII a été obtenue par production dans ces différents contenant selon un protocole identique.

	<i>Triple Flasque</i>	<i>Roller</i>	<i>Sac fermenteur</i>
<i>Nombre de cellules</i>	25 à 30.10 <sup>6</sup>	25 à 30.10 <sup>6</sup>	210.10 <sup>6</sup>
<i>Volume de milieu</i>	25 mL	25 mL	500 à 750 mL

Tableau 5. Quantité de cellules et de milieu de culture utilisés en fonction du contenant de production.

Les cellules ont étéensemencées en quantité suffisante au regard du contenant dans un milieu de culture complet. Après 48h de croissance, le milieu a été éliminé et remplacé par un milieu de production sans SVF, après deux lavages de 25 mL de PBS 1X. Pour chacun des types cellulaires ce milieu correspondait aux milieux de cultures complets sans SVF et sans antibiotique de résistance et dans lesquels était ajoutés de la BSA (7,5 %) (Gibco) visant à stabiliser le FVIII produit.

Les cellules ont été incubées en milieu de production pendant 12 à 36 h. Le milieu de production a alors été collecté puis centrifugé à 5000 rpm pendant 4 min à + 4°C puis conservés à -20 °C. Les cellules ont été maintenues en milieu de culture complet pour un nouveau cycle. Après 15 jours d’alternance, les cellules ont été éliminées.

## 3 Purification du FVIII

### 3.1 Précipitation

Les surnageants de production ont été décongelés au bain-marie à 37°C puis poolés par clone producteur. La précipitation du FVIII a été réalisée par addition de 40mg/100mL de sulfate d’ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Chimieplus laboratoire).

Après une nuit de précipitation à +4 °C sous agitation magnétique, le surnageant a été centrifugé à 10 000 G pendant 10 min à +4 °C. Le précipité a été alors récupéré et solubilisé dans un volume de tampon de reprise égal à 10 % du volume initial de surnageant.

Tampon de reprise :

- 20 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, pH 6 (Chimieplus Laboratoire) ;
- CaCl<sub>2</sub> 5 mM (Chimieplus Laboratoire) ;
- 0,01 % Tween 20 (Chimieplus Laboratoire) ;
- NaCl 0.1 M (Chimieplus Laboratoire).

### 3.2 Dialyse

La solution obtenue par dissolution du précipité a été dialysée contre un bain de 2L de tampon de dialyse, sous agitation magnétique, à +4°C pendant 8 à 12 h.

Tampon de dialyse :

- 20 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, pH 6 (Chimieplus Laboratoire) ;
- CaCl<sub>2</sub> 5 mM (Chimieplus Laboratoire) ;
- 0,01 % Tween 20 (Chimieplus Laboratoire) ;
- NaCl 0.2 M (Chimieplus Laboratoire).

Ce bain de dialyse a été renouvelé à trois reprises.

### 3.3 Chromatographie échangeuse d'anions

Au terme des 36 h de dialyse, la solution a été chargée sur une colonne échangeuse d'anions (Hitrap Q FF 5mL ou 1mL, GE Healthcare) et éluée par un gradient de chlorure allant de 0,2 à 1 M. Les dix premiers millilitres ont été poolés et le reste des 60 fractions de 1 mL a été récupéré dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL avec une vitesse d'éluion de 1mL/min.

Au moment du chargement, le surnageant a été récupéré à la sortie de la colonne afin d'attester la fixation du FVIII sur celle-ci. De la même manière, les tampons de lavage post-chargement et post-élution ont été récupérés à la sortie de la colonne puis aliquotés avant d'être conservés à -20 °C.

## 4 Injection Hydrodynamique du plasmide chez la souris hémophile A

Toutes les manipulations animales ont été réalisées, au sein de la plateforme ALECS-conventionnelle (SPF, site de l'Université UCBLyon 1-Laennec) par le Dr Nathalie ENJOLRAS et par le Pr Yessim DARGAUD, toutes deux titulaires d'une habilitation à expérimenter sur l'animal de niveau 1.

Les souris hébergées au sein de l'ALECS ont un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les cages des animaux sont maintenues dans un environnement calme dont la température est contrôlée ( $20 \pm 2$  °C).

La technique d'injection hydrodynamique permet d'induire l'expression d'un gène exogène au niveau hépatocytaire, sans avoir recours à des vecteurs viraux (285, 286).

La méthode repose sur l'injection d'un large volume d'une solution plasmidique dans la veine caudale de l'animal (souris ou rat), en un minimum de temps. L'importance du volume injecté occasionne une congestion cardiaque transitoire faisant refluer la solution dans la veine cave puis le foie. La pression hydrodynamique permet alors (1) de repousser le sang irriguant le foie vers le réseau mésentérique, évitant ainsi la dégradation du plasmide par les nucléases plasmatiques et (2) d'occasionner une stase hépatique de la solution. Pendant cette stagnation de la solution plasmidique dans le réseau hépatique, la pression hydrostatique sur les sinus permet leur ouverture et le passage du plasmide dans le cytosol des hépatocytes (287).

Cette méthode permet une étude optimale et *in vivo* des facteurs de la coagulation, dont la synthèse naturelle est hépatocytaire.

#### 4.1 Conditionnement

Les plasmides sont d'abord amplifiés par des bactéries compétentes DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> (ThermoFisher, Courtabœuf, Villebon-sur-Yvette, France).

Les bactéries compétentes ont été décongelées lentement dans de la glace pilée et incubées pendant 30 min en présence de la solution du plasmide. Elles ont ensuite subi un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes puis ont été remises 2 min dans la glace. Après ajout de 350  $\mu$ L de S.O.C. medium (ThermoFisher) pour 50  $\mu$ L de suspension bactérienne, elles ont été incubées pendant 45 min à 37°C, sous agitation à 200 rpm. La suspension a ensuite été centrifugée et le culot bactérien dispersé sur une boîte de Petri (LB medium gélifié par Agar Agar, 1% ampicilline), incubée 8h-9h à 37°C.

Les colonies sont ensuite repiquées et amplifiées en préculture dans 1,5 mL de milieu Luria Broth (LB medium) (Sigma Aldrich) pendant 8h. De cette préculture, 500  $\mu$ L ont été dilués dans 2L de LB medium et incubés 12 à 16 heures dans des fioles de Fernbach, à 37 °C sous agitation (170 rpm).

Le plasmide a été extrait en utilisant un kit Plasmid Giga Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) puis repris dans un volume minimal de tampon Tris-EDTA (Sigma Aldrich) stérile.

#### 4.2 Injection des solutions plasmidiques

Toutes les souris incluses dans ce protocole sont issues d'une lignée de souris hémophiles A provenant du laboratoire Jackson (souche B6;129S-F8<sup>tm1Kaz</sup>/J, The Jackson Laboratory, Sacramento, CA, USA).

Pour chaque souris, 40  $\mu$ g de plasmide ont été dilués dans un volume de PBS 1X stérile et filtré (0,2  $\mu$ m) représentant, environ, 10% du poids de l'animal (g/mL).

Si la littérature préfère l'injection sur des souris vigiles, tant au regard des résultats que de la condition de l'animal, la technicité du geste nous a imposé de réaliser cette manipulation sur des souris anesthésiées.

Les souris ont donc été placées dans une chambre d'induction et anesthésiées à l'isoflurane 5%. Elles ont ensuite été placées dans une chambre de contention réalisée à

l'aide d'un tube Falcon de 50mL percé en plusieurs endroits pour maintenir l'anesthésie tout en permettant un flux d'air approprié au bien-être de l'animal.

La queue de la souris a été ensuite placée 2 à 5 min dans de l'eau chaude afin de favoriser la dilatation des veines caudales.

La queue a ensuite été nettoyée à l'alcool modifié par mesure d'asepsie mais également pour augmenter la dilatation vasculaire.

L'injection a été ensuite réalisée dans le réseau veineux, à l'aide d'une aiguille de 30 G (Terumo, Dutscher, Brumath, France) montée sur une seringue « Luer-Lock » de 3 mL (Becton Dickinson, Dutscher, Brumath, France) en 9 à 15 secondes.

Souris	Caractéristiques				Injection						
	Date de naissance	Sexe	Poids (g)		Heure	Δt (sec)	Volume (mL)	V/P (%)	Vitesse (mL/sec)	Q (μg)	Q/P (μg/g)
USA HA 1A	NC		1	18,20	20/02/2017	15,00	2,50	0,14	0,17	40,12	2,20
USA HA 2A	NC		1	20,30	20/02/2017	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
USA HA 3A	12/12/2016		2	19,90	20/02/2017	13,00	2,00	0,10	0,15	32,10	1,61
USA HA 4A	12/12/2016		2	20,50	20/02/2017	15,00	2,00	0,10	0,13	32,10	1,57
USA HA 5A	12/12/2016		2	20,60	20/02/2017	16,00	1,80	0,09	0,11	28,89	1,40
USA HA 6A	12/12/2016		2	17,32	21/02/2017	12,00	2,00	0,12	0,17	32,10	1,85
USA HA 7A	31/01/2017		1	16,80	21/02/2017	12,00	2,00	0,12	0,17	32,10	1,91
USA HA 8A	31/01/2017		1	18,50	22/02/2017	15,00	2,00	0,11	0,13	32,10	1,73
USA HA 9A	NC		1	18,20	22/02/2017	14,00	2,00	0,11	0,14	32,10	1,76
USA HA 10A	NC		1	15,80	22/02/2017	7,00	1,00	0,06	0,14	16,05	1,02
USA HA 11A	NC		1	16,80	22/02/2017	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Souris	Caractéristiques				Injection						
	Date de naissance	Sexe	Poids (g)		Heure	Δt (sec)	Volume (mL)	V/P (%)	Vitesse (mL/sec)	Q (μg)	Q/P (μg/g)
USA HA 1B	10/07/2017		1	19,2	18/09/2017 10:22	10	1,8	9,38	0,18	34,29	1,79
USA HA 2B	10/07/2017		1	17,5	18/09/2017 10:54	0	0		0,00	0,00	0,00
USA HA 3B	10/07/2017		1	17,7	18/09/2017 11:15	0	0		0,00	0,00	0,00
USA HA 4B	15/07/2017		2	21,3	18/09/2017 11:27	11	1,4	6,57	0,13	26,67	1,25
USA HA 5B	15/07/2017		2	22	18/09/2017 11:41	10	1,9	8,64	0,19	36,19	1,65
USA HA 6B	31/07/2017		2	20	18/09/2017 12:24	10	1,9	9,50	0,19	36,19	1,81
USA HA 7B	31/07/2017		2	24	18/09/2017 12:12	0	0		0,00	0,00	0,00
USA HA 9B	31/07/2017		2	20	18/09/2017 12:53	10	1,9	9,50	0,19	36,19	1,81
USA HA 8B	31/07/2017		2	20,3	18/09/2017 12:39	11	2	9,85	0,18	38,10	1,88

**Tableau 6. Collection des données sur les souris HA injectées.** La limite des volumes injectés fixée à 10% du poids a été respectée ( $Q/V \sim 10\%$ ) et toutes les souris injectées ont reçu une quantité Q de plasmide (μg) calculée sur la base du volume effectivement injecté, rapporté à la quantité totale de plasmide contenue dans la seringue.

### 4.3 Prélèvement de plasma par voie rétro-orbitaire

Plusieurs prélèvements de plasma ont été effectués à 24, 48, 72 et 96 heures.

Les prélèvements destinés à la mesure antigénique du FVIII ont été réalisés par ponction dans le plexus rétro-orbitaire chez la souris anesthésiée, à l'aide d'un capillaire hépariné.

Les prélèvements destinés à la mesure d'activité pro-coagulante du FVIII ont nécessité l'utilisation de capillaires siliconés (afin d'éviter l'utilisation d'héparine), réalisés au laboratoire.

Systématiquement, le sang prélevé a été dilué dans du citrate de sodium 3,2% à raison de 10% du volume total.

Les études de cinétique ont été réalisées par le suivi de l'évolution du FVIII antigénique. Les mesures d'activité procoagulante du FVIII ont été réalisées sur des prélèvements de sang effectués 24 h après l'injection.

Moins d'une heure après chaque prélèvement, le sang a été centrifugé à 3500 rpm pendant 15 min à +4°C.

## 5 Caractérisation biochimique du FVIII

### 5.1 Western Blot

La mise en évidence du FVIII a été réalisée à partir de la méthode de Laemmli. À 16 µL de surnageant ou de plasma ont été ajoutés 4 µL de tampon de Laemmli (0,125 M Tris, pH 6,8, 20 % glycérol, 4 % SDS, 0,004 % bleu de bromophénol et béta-mercaptoéthanol 10 %). La dénaturation des protéines a été alors activée par chauffage de l'échantillon pendant 5 min à 95 °C.

Les protéines ont été ensuite séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 7,5 % dans un tampon contenant du SDS à 0,1%, 25 mM de Tris, 250 mM de glycine, pH 8,3, dans un champ électrique de 200 V en continu pendant 1h30 environ.

Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose en milieu liquide dans un tampon de transfert (24 mM Tris, pH 8,3, 19,5 mM glycine, 20 % éthanol) sous un courant continu de 350 mA pendant 90 min.

La membrane a été alors récupérée, lavée dans 2 à 3 bains rapides de 15 mL de TBS-Tween 1X (40 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Tween, 1 % BSA).

Les sites de fixation non-spécifique ont été saturés par 30 min d'incubation de la membrane dans une solution de lait écrémé dilué à 5 % dans du TBS-Tween. La membrane a été ensuite incubée dans 15 mL de solution d'anticorps primaires dilués au 1/3000<sup>e</sup> (anti-FVIII polyclonal issu de sérum de lapin) pendant une nuit à + 4°C, sous agitation.

Le lendemain, après 3 lavages de 5 min sous agitation avec 15 mL TBS-Tween, la membrane a été incubée pendant 30 min dans 15 mL de solution d'anticorps secondaires (1/3000<sup>e</sup>) couplés à la peroxydase de raifort (Horse Radish Peroxidase, HRP). Elle a été ensuite lavée à nouveau par 3 bains de 10 min de TBS-Tween, puis recouverte de 2,5 mL de mélange ImmuneStar.

Le signal a été récupéré par apposition d'un film photographique, révélé puis fixé.

## 5.2 ELISA

Le dosage immuno-enzymatique du FVIII repose sur la technique ELISA sous forme de kit commercialisé par Stago (ASSERACHROM® VIII:Ag, Diagnostica Stago, France) en suivant le protocole fourni avec le kit.

## 5.3 Dosage d'activité coagulométrique

Ce dosage, basé sur le principe du temps de céphaline avec activateur (TCA), a été réalisé avec la collaboration du laboratoire d'hémostase de l'hôpital Édouard Herriot, Hospices Civils de Lyon. L'échantillon a été dilué volume à volume avec un plasma déficient en FVIII dans lequel a été ajouté le Synthasil (Werfen, Le-Pré-Saint-Gervais, France). Le mélange est stabilisé pendant 5 min. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 50 µL calcium (0,02 mol/L). Cette technique a été réalisée sur un automate ACLtop (Werfen).

#### 5.4 Dosage chromogénique de l'activité

Ce dosage a été réalisé à l'aide du kit Biophen FVIII:C (Hyphen Biomed™, Neuville-sur-Oise, France) sur un automate ACLtop (Werfen).

# RÉSULTATS

## 1 Transfection cellulaire et production de FVIII recombinant

### 1.1 Présentation des plasmides utilisés

Ces deux plasmides possèdent l'ADNc correspondant au FVIII humain dépourvu de domaine B décrit par Plantier et al. (284). Le pcDNA FVIII-BDD-WT contient une séquence dont le domaine B a été remplacé par 4 résidus arginine (*Figure 16*) et pour le second, les introns 1 tronqués du FIX (tFIX1) ont été insérés en position 1 et 13 des introns du gène *F8*. Dans ces deux constructions, le gène d'intérêt est placé en 3' d'un promoteur CMV. Ce promoteur puissant est particulièrement adapté à diverses lignées de cellules humaines mais également de mammifères et est aujourd'hui l'un des promoteurs les plus utilisés au sein de vecteurs viraux et non-viraux (288).

Ils ont été utilisés dans le but de comparer les niveaux de sécrétion du FVIII-BDD après transfection transitoire des cellules de lignées CHO, HuH7 et HEK. L'utilisation des lignées cellulaires d'ovaires de hamsters avait pour but d'évaluer la reproductibilité des précédents travaux effectués au laboratoire (284). En effet, l'insertion des copies de l'intron 1 du FIX devait permettre une augmentation importante de la sécrétion de la protéine correspondante.

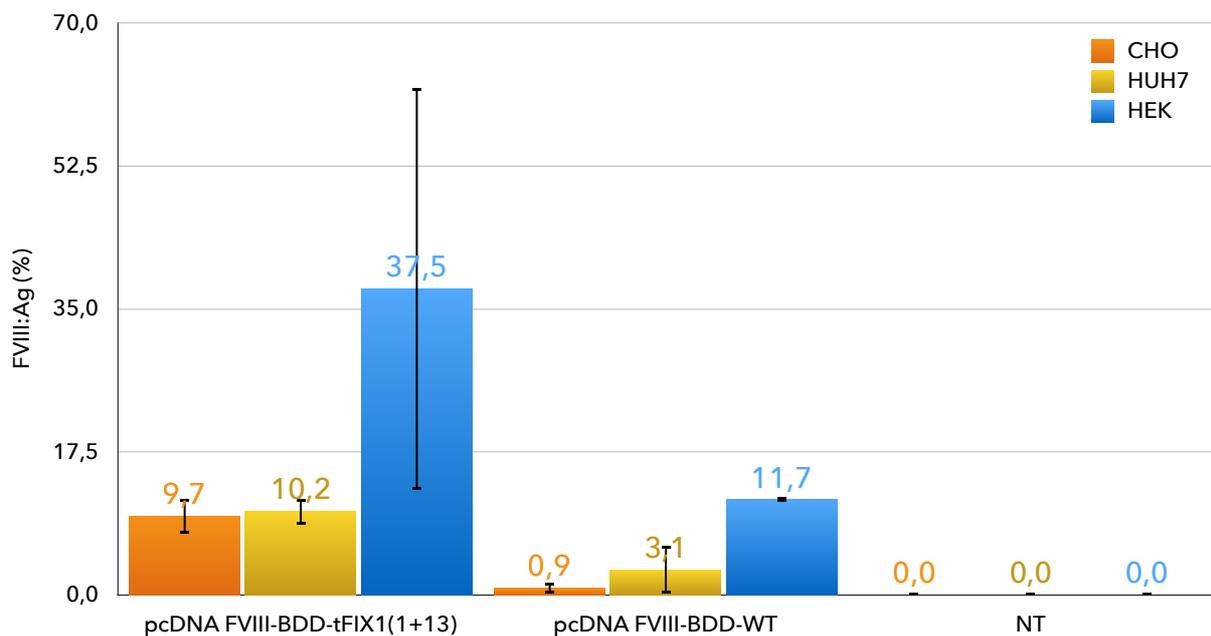
Lors du clonage cellulaire, la vérification d'une bonne intégration de chacun de ces plasmides a été effectuée par le biais des gènes de résistance bactériens (Amp<sup>R</sup>: résistance à l'ampicilline) et eucaryotes (Kan/neo<sup>R</sup>: confère une résistance à la généticine/G418)

L'utilisation d'une lignée humaine rénale (HEK) ou hépatique (HUH7) visait à évaluer l'amélioration de la sécrétion de FVIII chez de nouveaux modèles cellulaires en utilisant la séquence contenant les deux copies de l'intron 1 tronqué du FIX.

## 1.2 Dosage du FVIII antigénique dans les surnageants de cellules transféctées transitoirement

C'est avec cette ambition que plusieurs séries de transfections transitoires ont été réalisées. Les trois types cellulaires,ensemencés en boîte de Pétri et en une plaque 6 puits, ont été ensemencés puis transféctés en utilisant le plasmides pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) ou le pcDNA FVIII-BDD-WT. Les surnageants « SVF+ » ont alors été récoltés à 48 h et un dosage antigénique (figure 4) ainsi que des dosages d'activité, en chromogénique et en chromométrique, ont été réalisés pour chacun des types cellulaires.

Le FVIII a été détecté dans tous les surnageants, indépendamment des lignées cellulaires et de la construction utilisée, à l'exception des surnageants de cellules non-transféctées. Les taux étaient variables selon les constructions et les lignées cellulaires. Les plus forts ont été retrouvés après transfection par le pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) avec des concentrations de 9,7, 10,2 et 37,5 ng/ml pour les cellules CHO, Huh7 et HEK respectivement.



**Figure 17. Dosage antigénique du FVIII produit par des cellules CHO (■), Huh7 (■) et HEK (■) en transfection transitoire.** Les colonnes représentent la moyenne des taux de FVIII produits par  $5 \cdot 10^5$  cellules ensemencées, dosés par ELISA. Les trois transfections indépendantes ont été réalisées pour la construction pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) utilisée sur les lignées CHO et Huh7. Sur la lignée HEK, seules deux transfections transitoires indépendantes ont été réalisées avec le même plasmide.

Les transfections utilisant le plasmide sans intron du FIX (pcDNA-FVIII-BDD-WT) ont permis de retrouver des taux de FVIII-antigène de 0,9, 3,1 et 11,7 % pour les cellules CHO, Huh7 et HEK respectivement. Pour les trois types cellulaires, la concentration de FVIII dans les surnageants est 3 à 10 fois supérieure après transfection avec le pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) que lorsque le pcDNA FVIII sans intron est utilisé. Ces différences sont en accord avec les résultats obtenus lors des précédents travaux menés au sein du laboratoire (284).

Indépendamment de la lignée cellulaire, le test ELISA n'a pas permis d'identifier la moindre trace de FVIII dans les surnageants des cellules non-transfectées.

Par ailleurs, deux transfections transitoires des cellules TRP3 utilisant les constructions pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) et pcDNA FVIII-BDD-WT ont également été réalisées. Au terme de ces deux transfections, le FVIII n'a pas pu être détecté ni par ELISA indépendamment de la construction utilisée, ni par western blot.

### 1.3 Détermination de l'activité pro-coagulante selon le type cellulaire

L'activité coagulante du FVIII a été déterminée par les techniques, chromogénique et chronométrique, sur les surnageants des lignées cellulaires CHO, Huh7 et HEK, ensemencées dans des boîtes de Pétri à raison de  $1.10^6$  cellules et transfectées avec les constructions pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13), pcDNA FVIII-BDD-WT ou non-transfectées. Les surnageants obtenus au terme de 72 h d'incubation ont été concentrés 5 fois puis conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour être décongelés extemporanément au moment de l'analyse (voir *Tableau 7*).

L'activité spécifique a été ensuite calculée par le rapport entre les activités obtenues par la méthode chronométrique et la quantité (FVIII:Ag) de FVIII mesurée par méthode immuno-enzymatique dans ces mêmes échantillons. L'activité normale du FVIII humain est de 10 UI/ $\mu\text{g}$  de FVIII.

	Nom	FVIII:C (%) chronométrique	FVIII:C (%) colorimétrique	FVIII:Ag (%)	AS (UI/mg)
<b>CHO</b>	CHO pcDNA FVIII-BDD-WT	1	2,0	0,3	5000
	CHO pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13)	18,4	9,9	22,0	8364
	CHO NT	0,1	0,9	0,0	1111
<b>HUH7</b>	HUH7 pcDNA FVIII-BDD-WT	0,9	0,7	0,6	12857
	HUH7 pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13)	6,5	0,4	18,3	3552
	HUH7 NT	0	0,5	0,0	0,0
<b>HEK</b>	HEK pcDNA FVIII-BDD-WT	0	0,9	23,3	0,0
	HEK pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13)	0	0,3	109,7	0,0
	HEK NT	0	0,8	0,0	0,0

**Tableau 7. Résultats des dosages d'activités du FVIII dans les différents types cellulaires et en fonction de la construction utilisée lors de la transfection.**

Les cellules HEK sont les seules pour lesquelles l'activité coagulante du FVIII n'a pas pu être détectée. Pourtant, dans ces mêmes échantillons, et par rapport aux surnageants des lignées CHO et Huh7, les taux antigéniques de FVIII avaient été retrouvés 10 et 20 fois supérieurs pour les cellules transfectées en utilisant les plasmides pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) et pcDNA FVIII-BDD-WT, respectivement.

Dans les surnageants des cellules Huh7 et CHO, des activités, respectivement de 20 et 7 fois supérieures ont été retrouvées après utilisation de la construction plasmidique pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) (18,4 et 6,5 %) par rapport à la construction sans intron (1 et 0,9 %).

Pondérée par la concentration en FVIII:Ag mesurée dans ces échantillons, l'activité spécifique est néanmoins retrouvée inférieure pour dans les surnageants après transfection par le plasmide avec les introns 1 tronqués du FIX par rapport à la construction sans intron.

Pour les trois lignées cellulaires, l'activité et la quantité antigénique de FVIII ont été retrouvées nulles dans les surnageants de cellules non-transfectées.

#### 1.4 Mise en évidence du FVIII par Western Blot

La caractérisation du FVIII produit après transfection par les deux différents plasmides devaient passer par l'observation de la protéine sur un gel de migration.

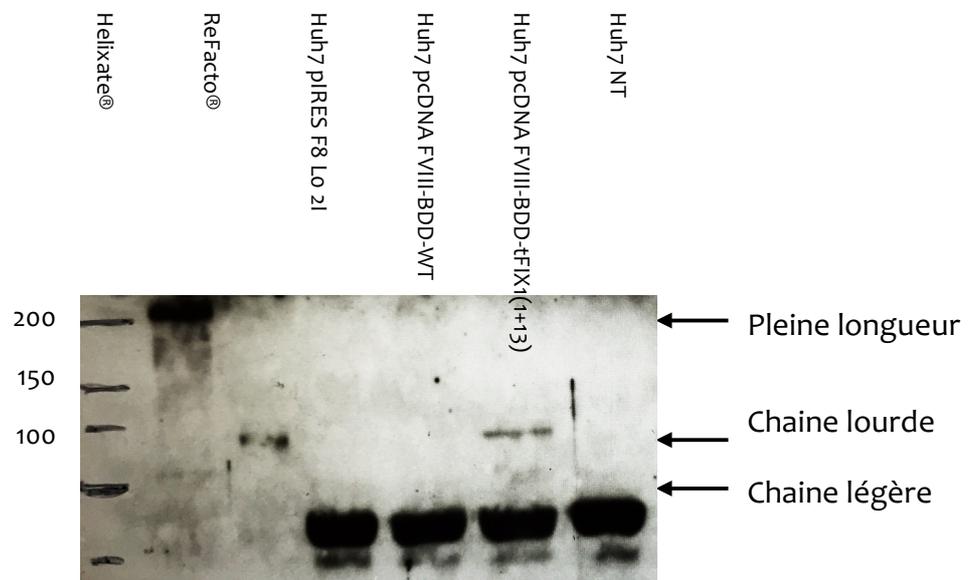
L'utilisation du Western-Blot pouvait, en effet, apporter la confirmation du bon épissage des introns tronqués du FIX, le cas échéant, et de la bonne conformation du FVIII produit.

Deux anticorps, disponibles dans le laboratoire, ont été testés afin d'évaluer leur aptitude à fixer spécifiquement le FVIII :

- Anticorps (Ac) polyclonal (PC) anti-FVIII issu de sérum immunopurifié de lapins sensibilisés ;
- Anticorps monoclonal (MC) anti domaine C2 du FVIII (GMA-012, Green Mountain Antibodies, Burlington, USA).

Les résultats de mise au point se sont révélés en faveur de l'utilisation de l'AcPC anti-FVIII.

Après transfection transitoire, le FVIII a donc été recherché par immunoblot dans les surnageants, notamment celle des cellules Huh7 (Figure 18).



**Figure 18. Western blot.** Après migration sur gel polyacrylamide à 7,5 %, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le FVIII a été visualisé à l'aide de l'anticorps monoclonal détectable après utilisation d'un second anticorps couplé à la HRP.

Les quantités de FVIII dans les surnageants des cellules transfectées par le plasmide sans intron n'ont pas été suffisantes lors des transfections transitoires pour permettre de visualiser la protéine par cette méthode. Seul le surnageant des cellules transfectées par le pcDNA contenant les copies de l'intron 1 du FIX (pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13)) a permis, au contraire, la mise en évidence de la chaîne lourde de la protéine. En effet le poids moléculaire retrouvé de 90 kDa est identique à celui de la chaîne lourde du témoin FVIII utilisé (ReFacto®). La bande non spécifique visible sur le blot correspond à la HSA produite par les hépatocytes de manière intrinsèque et l'importance de cette bande est susceptible de masquer la chaîne légère de 80 kDa à cette concentration du gel en polyacrylamide (7,5%).

## 2 Transfection stable – clonage cellulaire

Le laboratoire disposant d'un clone issu de lignée CHO, transfecté avec le plasmide contenant les insertions de l'intron 1 du FIX, et excellent producteur de FVIII (CHO PD FVIII Lo clone 12/E1), la transfection clonale a été réalisée sur les deux autres lignées : HEK et Huh7.

Afin de permettre des caractérisations biochimiques plus avancées et de comparer efficacement le FVIII produit après transfection par nos deux constructions plasmidiques, des clones, capables de produire des grandes quantités de protéines après transfection par l'une ou par l'autre, étaient nécessaires.

Les deux constructions plasmidiques ont donc été utilisées dans cette étape de transfection puis de clonage cellulaire : le pcDNA sans les introns 1 du FIX (pcDNA-FVIII-BDD-WT) et la séquence avec l'insertion des introns 1 du FIX en position des introns 1 et 13 du FVIII (pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13)).

Après ensemencement des cellules sur des boîtes de Pétri à raison d' $1 \cdot 10^6$  cellules et transfection par le pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) ou le pcDNA FVIII-BDD-WT, l'ajout de la généticine (G418) a permis d'isoler les lignées cellulaires clonales effectivement

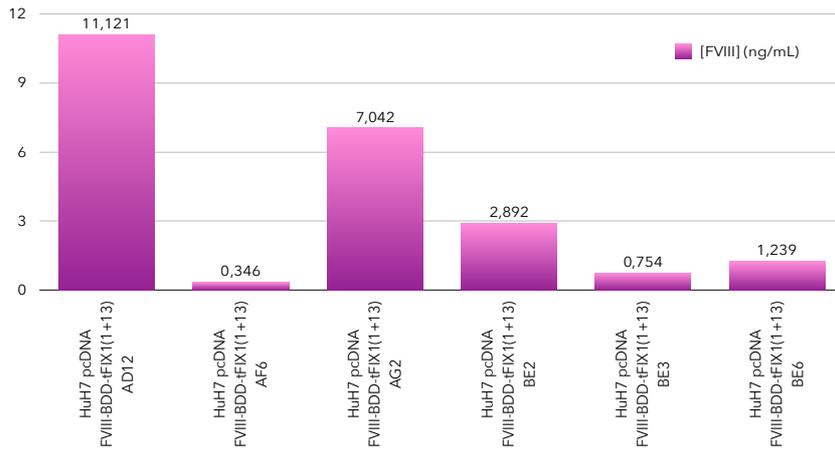
transfectées. Ainsi les clones ont pu être isolés et repiqués, après 3 à 4 semaines de sélection selon la croissance.

Cette fois, les puits de 3 plaques 96 puits ont été utilisés pour recevoir les clones repiqués ayant acquis la résistance à la généticine après transfection par le pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) quand une seule a permis le recueil de cellules transfectées avec le pcDNA FVIII-BDD-WT. Dès leur arrivée à confluence, les lignées clonales ont été comparées entre elles par une série de dosages immunoenzymatiques, mesurant leur capacité à produire le FVIII.

Une vingtaine de clones issus de cellules transfectées par le plasmide pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) s'est révélée capable de produire des taux détectables de FVIII. Parmi eux, les meilleurs producteurs, ainsi que ceux dotés des plus fortes vitesses de croissances, ont été amplifiés en plaque 12 puits. Les taux de FVIII antigéniques ont été confirmés par un deuxième test immunoenzymatique sur ces nouveaux surnageants (*Figure 19*).

Le clone « Huh7 pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) AD12 » (simplifié : Huh7 AD12) s'est révélé être le meilleur candidat à la production et à la sécrétion de FVIII avec une concentration antigénique d'environ 11 ng/ml. Les clones Huh7 AG2 et Huh7 BE2 sécrétaient le FVIII à des concentrations moindres de 7 et 3 ng/ml respectivement. Les trois clones (AF6, BE3 et BE6), dont la croissance s'est avérée plus rapide, n'ont pas montré des capacités de production suffisantes et ont été éliminés. Le clone Huh7 AD12 et les deux autres meilleurs producteurs (AG2, BE2) ont été conditionnés en cryotubes avec 10 % de DMSO afin d'être conservés dans l'azote liquide. Seul AD12 a été utilisé pour la production de FVIII.

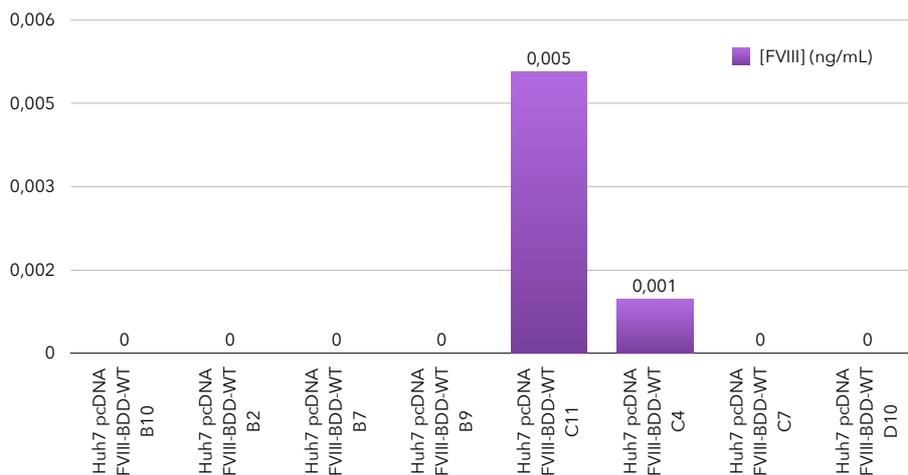
Le protocole a été reproduit afin de créer un clone Huh7 capable de produire le FVIII, après transfection par la construction plasmidique sans intron.



**Figure 19. Taux de FVIII:Ag mesurées par ELISA sur les 6 meilleurs clones.** Les cellules ont été ensemencées en plaque 12 puits. Les clones AD12, AG2 et BE2 ont été conservés et congelés. Le clone AD12, meilleur producteur, a été utilisé pour la production du FVIII. Tous ces clones provenaient de cellules transfectées par la construction plasmidique: pcDNA-FVIII-BDD-tFIX1(1+13)

Après l'épissage de l'ARN, les introns étant éliminés, le FVIII produit est identique quelle que soit la construction plasmidique utilisée. Cependant, l'augmentation des capacités de sécrétion sur des lignées CHO devait être confirmée sur Huh7.

Après ajout de la G418, très peu de clones ont pu être isolés. Les quelques clones repiqués ont été comparés par la concentration de leur surnageant en FVIII. Ces taux ont été beaucoup trop faibles pour envisager une production en quantité suffisante de FVIII (voir Figure 20).



**Figure 20. Mesure FVIII:Ag pour 6 clones Huh7 issus de cellules transfectées par la construction sans intron (pcDNA FVIII-BDD-WT).** Dosage par ELISA sur les surnageants des clones cellulaires en plaque 96 puits.

Le caractère semi-adhérent des cellules HEK n'a pas permis la transfection clonale par la méthode de l'apparition de colonies sur la boîte de Pétri. Après un échec de tri des clones par dilution limite, un deuxième essai utilisant des boîtes de Pétri « coatées » avec de la gélatine à 0,1 % a été réalisé dans le but d'éviter le décollement des cellules avant la formation de la colonie clonale. Ce test n'a pas fonctionné.

### 3 Purification du FVIII BDD issu des clones producteurs, CHO et Huh7, isolés au laboratoire

#### 3.1 Profils de purification

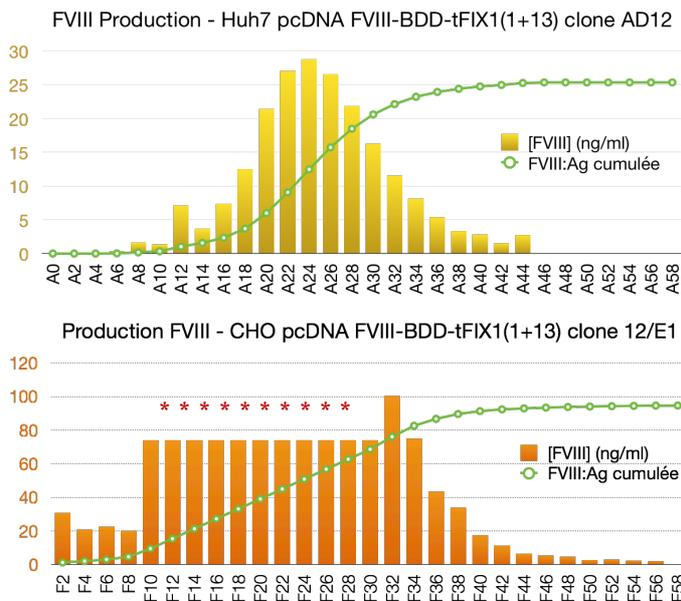
La production de FVIII dans le milieu de culture, par les cellules issues de lignées CHO ou Huh7, a été menée en parallèle. Les clones CHO PD 12/E1 (CHO 12/E1) et Huh7 AD12 ont été utilisés, tous deux issus d'une transfection par le pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13).

Après précipitation des protéines, reprise du précipité dans un tampon adéquat et dialyse, le FVIII BDD a été chargé sur une colonne échangeuse d'anions puis élué à un débit constant d'1ml/min pendant 70 min à l'aide d'un gradient salin (NaCl 0,15 à 1M). Après collection d'un premier éluât de 10 ml, des fractions de 1mL ont été collectées individuellement.

Le taux de FVIII antigénique de chacune des fractions a ensuite été évalué par ELISA afin d'établir un profil de purification (voir *Figure 22*).

L'estimation de la quantité cumulée de FVIII dans l'ensemble des fractions collectées a montré, une nouvelle fois, la supériorité du clone CHO 12/E1 en termes de sécrétion du FVIII. Sur les 60 fractions de 1 mL obtenues, la moitié a été dosée par ELISA. Ainsi, 1,4 µg de FVIII a été mesuré dans ces 30 fractions pour le clone CHO 12/E1 contre un peu plus de 0,2 µg de FVIII pour le clone AD12, soit 7 fois moins pour un même volume d'éluât.

Ces mêmes dosages ont permis d'évaluer la quantité antigénique de FVIII produit dans un litre de surnageant de production. Pour chaque fraction non dosée, la valeur de FVIII :Ag a été estimée égale à la moyenne des taux FVIII antigéniques mesurés dans la fraction précédente et la suivante. Ainsi la quantité de FVIII-antigène totale a été estimée à 2,4 µg/L et 0,4 µg/L pour les clones CHO 12/E1 et HuH7 AD12 respectivement (voir Figure 22).



**Figure 21. Profil d'élution de FVIII à partir solutions reconstituées et dialysées de FVIII Lo pour les clones CHO 12/E1 et Huh7 AD12.** La moitié des fractions, diluée au ¼, a été dosée par ELISA et la valeur cumulée de FVIII:Ag est réalisée avec une estimation des points manquants par la moyenne des points adjacents. Les fractions F12 à F30 ont donné des valeurs d'absorbance saturante et ont donc été sous-estimées égales à la dernière valeur mesurée. Les \* marquent les points à saturation d'absorbance (450nm).

Pour le clone CHO 12/E1, les fractions de purification 12 à 28 ont provoqué une saturation de l'absorbance à la longueur d'onde de 450 nm. Ces valeurs ont été arbitrairement déterminées égales à la dernière valeur précisément évaluée par l'ELISA, sous-estimant ainsi de beaucoup la quantité de FVIII produite par ce clone dans 1 L de surnageant.

### 3.2 Mesures d'activité pro-coagulante

La mesure d'activité pro-coagulante a été réalisée en vue de comparer le FVIII lorsqu'il est produit par les deux clones cellulaires à partir de la même construction. Cette mesure atteste également de la fonctionnalité de la protéine, caractéristique importante lors de la création d'un modèle cellulaire en vue d'une production de la protéine.

Cette étape est d'autant plus importante qu'il nous a été impossible de nous assurer du bon épissage des copies de l'intron 1 du FIX par Western Blot, en comparant le FVIII lorsqu'il est produit après transfection par les deux plasmides.

Pour cette mesure une étape de concentration a été réalisée. En effet, devant les faibles taux antigéniques retrouvés dans les surnageants de production, et afin d'évaluer l'activité de la protéine avec le plus de précision possible, cette étape était indispensable.

Le FVIII étant une protéine de grande fragilité, la concentration des surnageants de culture des cellules CHO 12/E1 et Huh7 AD12 a été réalisée en parallèle de la concentration d'un surnageant de cellules Huh7 non-transfectées, dans lequel a été dilué 100 ng/mL de ReFacto®, concentration correspondante à un 100 % d'activité dans le plasma humain.

Après concentration, un test ELISA a été réalisé sur les trois surnageants ainsi obtenus :

- Surnageant de cellules Huh7 non transfectées + ReFacto ;
- Surnageant de cellules Huh7 AD12 productrice de FVIII-BDD ;
- Surnageant de cellules CHO 12/E1 productrice de la même protéine.

	FVIII:C Dosage chromogénique	FVIII:Ag ELISA
ReFacto	41,83 %	46 %
Huh7 AD12	4,67 %	19,72 %
CHO 12/E1	286,16 %	37 %

**Tableau 8. Dosage de l'activité pro-coagulante du FVIII produit par les clones issus de cellules transfectées par le pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13).** Tous les surnageants ont été concentrés 20 fois permettant l'obtention de 500µL de surnageant concentré.

D'après les dosages antigéniques (*Tableau 8*), un peu plus de la moitié de la quantité antigénique du ReFacto® a été estimée perdue, les taux étant passés de 100 à 46 ng/mL de surnageant. La quantité de FVIII-BDD dans le milieu de culture concentré des cellules CHO 12/E1 et Huh7 AD12 était de 37% et 20%, respectivement.

La structure du FVIII-BDD étant peu différente de celle du ReFacto®, à l'exception du domaine B résiduel remplacé par 4 résidus arginine pour la séquence du FVIII-BDD-tFIX1(1+13) contre 13 pour le ReFacto®, on peut estimer que la moitié de tous les FVIII-BDD de cette étude a été perdue au moment de cette étape de concentration.

Dans un deuxième temps, l'activité pro-coagulante du FVIII a été mesurée pour chaque échantillon de milieu de culture concentré (Tableau 8). Les valeurs des activités étaient de 42%, 5% et 286 % pour le surnageant des cellules non-transfectées additionné de ReFacto, et les surnageants des clones Huh7 AD12 et CHO 12/E1 respectivement.

Pour le ReFacto®, le rapport de l'activité ( $41,83\% = 41,83 \text{ IU/dL}$ ) sur la quantité antigénique ( $46\% = 46 \text{ ng/mL} = 4,6 \cdot 10^{-3} \text{ mg/dL}$ ) permet le calcul d'une activité spécifique égale à 9000 IU/dL approximativement. Ce résultat est en accord avec les RCP du produit ( $AS = 7\ 600$  à  $13\ 800 \text{ UI/dL}$ ) et valide donc la technique pour le ReFacto, utilisé ici comme contrôle.

L'activité spécifique du FVIII-BDD lorsqu'il est synthétisé par le clone Huh7-AD12 a été également calculée et trouvée égale à 2400 UI/mg de protéine.

Le même calcul permet l'obtention d'une activité spécifique pour la même protéine, lorsqu'elle est synthétisée par le clone CHO 12/E1, égale à 77 300 UI/mg de protéine.

## 4 Expérience d'injection hydrodynamique de plasmide chez les souris hémophiles A

La production de FVIII par les cellules HUH7 s'est donc avérée trop faible pour permettre la production d'une quantité de protéines suffisante à sa caractérisation *in vitro* et *in vivo*. Nous avons étudié la possibilité de nous affranchir de ces étapes de culture cellulaire, production et purification protéique, chronophages et coûteuses.

L'injection hydrodynamique permettant de provoquer l'expression transitoire d'un gène au niveau hépatique semblait alors une bonne alternative à l'étude *in vitro* sur Huh7.

Dans cette partie de l'étude, seul le plasmide pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13), contenant les copies de l'intron-1 tronqué du FIX, a été utilisé.

#### 4.1 Injection du plasmide pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) : détails opératoires

Souris	Caractéristiques			Injection						
	Date de naissance	Sexe	Poids (g)	Heure	$\Delta t$ (sec)	Volume (mL)	V/P (%)	Vitesse (mL/sec)	Q ( $\mu\text{g}$ )	Q/P ( $\mu\text{g/g}$ )
USA HA 1A	NC		1 18,20	20/02/2017	15,00	2,50	0,14	0,17	40,12	2,20
USA HA 2A	NC		1 20,30	20/02/2017	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
USA HA 3A	12/12/2016		2 19,90	20/02/2017	13,00	2,00	0,10	0,15	32,10	1,61
USA HA 4A	12/12/2016		2 20,50	20/02/2017	15,00	2,00	0,10	0,13	32,10	1,57
USA HA 5A	12/12/2016		2 20,60	20/02/2017	16,00	1,80	0,09	0,11	28,89	1,40
USA HA 6A	12/12/2016		2 17,32	21/02/2017	12,00	2,00	0,12	0,17	32,10	1,85
USA HA 7A	31/01/2017		1 16,80	21/02/2017	12,00	2,00	0,12	0,17	32,10	1,91
USA HA 8A	31/01/2017		1 18,50	22/02/2017	15,00	2,00	0,11	0,13	32,10	1,73
USA HA 9A	NC		1 18,20	22/02/2017	14,00	2,00	0,11	0,14	32,10	1,76
USA HA 10A	NC		1 15,80	22/02/2017	7,00	1,00	0,06	0,14	16,05	1,02
USA HA 11A	NC		1 16,80	22/02/2017	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Souris	Caractéristiques			Injection						
	Date de naissance	Sexe	Poids (g)	Heure	$\Delta t$ (sec)	Volume (mL)	V/P (%)	Vitesse (mL/sec)	Q ( $\mu\text{g}$ )	Q/P ( $\mu\text{g/g}$ )
USA HA 1B	10/07/2017		1 19,2	18/09/2017 10:22	10	1,8	9,38	0,18	34,29	1,79
USA HA 2B	10/07/2017		1 17,5	18/09/2017 10:54	0	0		0,00	0,00	0,00
USA HA 3B	10/07/2017		1 17,7	18/09/2017 11:15	0	0		0,00	0,00	0,00
USA HA 4B	15/07/2017		2 21,3	18/09/2017 11:27	11	1,4	6,57	0,13	26,67	1,25
USA HA 5B	15/07/2017		2 22	18/09/2017 11:41	10	1,9	8,64	0,19	36,19	1,65
USA HA 6B	31/07/2017		2 20	18/09/2017 12:24	10	1,9	9,50	0,19	36,19	1,81
USA HA 7B	31/07/2017		2 24	18/09/2017 12:12	0	0		0,00	0,00	0,00
USA HA 9B	31/07/2017		2 20	18/09/2017 12:53	10	1,9	9,50	0,19	36,19	1,81
USA HA 8B	31/07/2017		2 20,3	18/09/2017 12:39	11	2	9,85	0,18	38,10	1,88

**Tableau 9. Collection des données sur les souris HA injectées.** La limite des volumes injectés fixée à 10% du poids a été respectée ( $Q/V < 10\%$ ). La quantité Q de plasmide ( $\mu\text{g}$ ) reçue par chaque souris a été calculée sur la base du volume effectivement injecté (V), rapporté à la quantité totale de plasmide dans les 2 à 2,5 ml de solution contenue dans la seringue.

Selon le protocole établi précédemment (*Matériels et Méthodes*), deux séries de souris hémophiles A ont donc été injectées par la construction plasmidique (pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13)) : une série A et une série B.

Cette étape de l'étude a permis de mettre en œuvre un protocole d'injection hydrodynamique de plasmide chez les souris hémophiles A au sein de la structure animalière ALECS. Ainsi les conditions optimales d'injections et de prélèvements ont été déterminées ou confirmées, visant à respecter au maximum le bien-être des animaux.

C'est la raison pour laquelle de nombreux critères d'ordres expérimentaux seront inventoriés et considérés ici.

Pour chacune des souris hémophiles A, 40 µg de plasmide pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) ont été dilués dans 2 à 2,5 mL de PBS 1X stériles et filtrés (0,5µm). En moyenne, 31µg (SD = 6) de plasmide étaient effectivement injectés lors de la première série et 35 µg au cours de la seconde série (SD=4) (voir *Tableau 9*). Cette variation est due au fait que la technique était mieux maîtrisée lors de la seconde série d'injections.

De la même manière, la vitesse d'injection moyenne au moment de la première série était de 150µL/sec pour 180µL/sec pour la deuxième série (voir *Tableau 9*).

En revanche, le volume moyen injecté n'a pas évolué avec des valeurs de 1,9 mL et 1,8 mL pour la première et la deuxième série respectivement. Ceci doit être pondéré par le fait que les seringues préparées pour les injections de la première série contenaient un volume de solution plasmidique supérieure mais de concentration plus faible. Ceci explique donc la discordance entre la diminution des volumes moyens et l'augmentation des quantités moyennes de plasmide injectées.

Sur les 11 souris de la première série, 8 (73%) ont reçu un volume équivalent à 10 % de leur poids corporel et une (HA USA 10A) n'a reçu qu'1mL de solution plasmidique (6% du poids). Les deux dernières souris n'ont pas pu être injectées, les abords veineux n'étant pas atteints.

Lors de la deuxième série réalisée sur 9 souris, 6 (67%) ont été injectées ; l'injection s'est faite correctement et sans résistance. De ces 6 souris, une (HA USA 8B) n'a pas survécu et une (HA USA 4B) n'a pas reçu un volume suffisant (1,4 mL) pour assurer une bonne pression hydrostatique au niveau du réseau hépatique (voir *Tableau 9*).

Au total sur les 20 souris incluses dans les deux séries, 12 (70%) ont été injectées d'un volume correspondant à environ 10 % de leur poids corporel.

#### 4.2 Cinétique et mesure du FVIII antigénique dans le plasma des souris HA après injection hydrodynamique du plasmide pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13)

Suite aux injections, les souris ont été entretenues une semaine dans les conditions habituelles d'hébergement. Des prélèvements de plasma ont été effectués à 24, 48, 72 et

96h après l'injection. Ces prélèvements ont été réalisés au niveau du plexus rétro-orbitaire en utilisant des capillaires héparinés pour la mesure des taux antigéniques et des capillaires dont la face interne a été siliconée pour les prélèvements destinés à la mesure d'activité.

Sur les 8 souris (USA HA 1A et 3A à 10A) injectées lors de la série A, 5 (63%) avaient des taux de FVIII circulant significativement détectables par dosage immuno-enzymatique. Sur ces 5 souris, une seule (USA HA 5A) avait un taux circulant (19%) très inférieur à la moyenne des taux FVIII-antigène de ces 5 souris (170%) (voir *Tableau 10*).

En revanche, dans les plasmas de chacune des 4 souris injectées lors de la série B et ayant reçu un volume de solution plasmidique adéquat, des taux antigéniques de FVIII allant de 300 (souris HA USA1) à 570 % (souris HA USA6) ont été mesurés 24 heures après l'injection.

Souris	1 jour		2 jours		3 jours		4 jours	
	FVIII:Ag	FVIII:Ag/Q	FVIII:Ag	FVIII:Ag/Q	FVIII:Ag	FVIII:Ag/Q	FVIII:Ag	FVIII:Ag/Q
USA HA 1A	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
USA HA 2A	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
USA HA 3A	145,76	4,54	129,35	4,03	110,68	3,45	14,28	0,44
USA HA 4A	210,82	6,57	137,09	4,27	41,17	1,28	4,02	0,13
USA HA 5A	18,59	0,64	1,00	0,03	0,19	0,01	0,10	0,00
USA HA 6A	186,89	5,82	156,72	4,88	27,82	0,87	1,55	0,05
USA HA 7A	289,73	9,03	329,70	10,27	52,17	1,63	10,49	0,33
USA HA 8A	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
USA HA 9A	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
USA HA 10A	0,87	0,05	0,02	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
USA HA 11A	0,46	0,00	0,03	0,00	0,49	0,00	0,00	0,00

**Tableau 10. Résultat des dosages antigéniques pour les souris de la série A.** Ces valeurs ont été obtenues par dosage immunoenzymatique du FVIII contenu dans les plasmas des souris injectées, 24, 48, 72 et 96 h après injection hydrodynamique du plasmide pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13).

<b>J1</b>							
<b>Souris</b>	<b>Date/Heure</b>	<b>Poids (g)</b>	<b>V (mL)</b>	<b>Dont citrate</b>	<b>Citrate</b>	<b>FVIII:Ag</b>	<b>FVIII:Ag (pl)</b>
USA HA 1B	19/09/2017 11h30	18,30	128,00	20,00	15,6 %	250,29	296,64
USA HA 2B	19/09/2017 11h10	17,30	222,00	22,00	9,9 %	0,00	0,00
USA HA 3B	19/09/2017 11h20	17,60	222,00	22,00	9,9 %	0,00	0,00
USA HA 4B	19/09/2017 11h35	21,10	200,00	20,00	10,0 %	0,00	0,00
USA HA 5B	19/09/2017 11h40	21,80	220,00	20,00	9,1 %	424,30	466,72
USA HA 6B	19/09/2017 12h10	19,60	200,00	10,00	5,0 %	544,86	573,54
USA HA 7B	19/09/2017 11h50	20,60	430,00	30,00	7,0 %	0,00	0,00
USA HA 9B	19/09/2017 12h00	19,40	200,00	10,00	5,0 %	431,55	454,27
USA HA 8B	†						

<b>J2</b>							
<b>Souris</b>	<b>Date/Heure</b>	<b>Poids (g)</b>	<b>V (mL)</b>	<b>Dont citrate</b>	<b>Citrate</b>	<b>FVIII:Ag</b>	<b>FVIII:Ag (pl)</b>
USA HA 1B	20/09/2017 10h30	18,20	222,00	22,00	9,9 %	104,05	115,49
USA HA 2B	20/09/2017 10h35	17,10	155,00	15,00	9,7 %	0,00	0,00
USA HA 3B	20/09/2017 10h40	17,90	244,00	24,00	9,8 %	0,00	0,00
USA HA 4B	20/09/2017 10h45	20,60	277,00	27,00	9,7 %	0,00	0,00
USA HA 5B	20/09/2017 10h50	22,00	233,00	23,00	9,9 %	229,69	254,85
USA HA 6B	20/09/2017 11h08	19,40	244,00	24,00	9,8 %	363,19	402,81
USA HA 7B	20/09/2017 11h02	20,00	222,00	22,00	9,9 %	0,00	0,00
USA HA 9B	20/09/2017 10h58	19,60	278,00	28,00	10,1 %	366,10	407,10
USA HA 8B	†						

<b>J3</b>							
<b>Souris</b>	<b>Date/Heure</b>	<b>Poids (g)</b>	<b>V (mL)</b>	<b>Dont citrate</b>	<b>Citrate</b>	<b>FVIII:Ag</b>	<b>FVIII:Ag (pl)</b>
USA HA 1B	21/09/2017 10h25	17,70	333,00	33,00	9,9 %	36,96	41,03
USA HA 2B	21/09/2017 10h27	16,80	222,00	22,00	9,9 %	0,00	0,00
USA HA 3B	21/09/2017 10h30	17,10	244,00	24,00	9,8 %	0,00	0,00
USA HA 4B	21/09/2017 10h34	20,20	278,00	28,00	10,1 %	0,00	0,00
USA HA 5B	21/09/2017 10h38	20,00	244,00	24,00	9,8 %	66,62	73,89
USA HA 6B	21/09/2017 10h50	19,60	278,00	28,00	10,1 %	111,15	123,60
USA HA 7B	21/09/2017 10h43	20,00	211,00	21,00	10,0 %	0,00	0,00
USA HA 9B	21/09/2017 10h53	19,90	278,00	28,00	10,1 %	118,50	131,77
USA HA 8B	†						

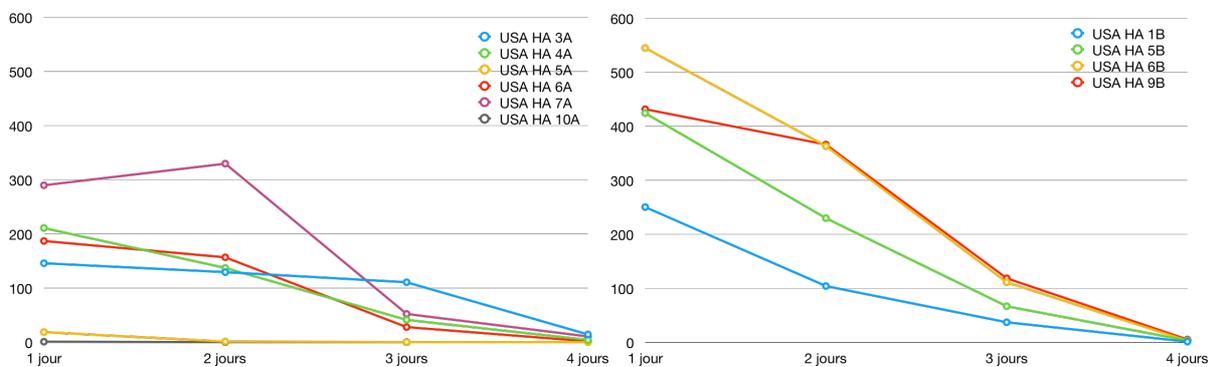
  

<b>J4</b>							
<b>Souris</b>	<b>Date/Heure</b>	<b>Poids (g)</b>	<b>V (mL)</b>	<b>Dont citrate</b>	<b>Citrate</b>	<b>FVIII:Ag</b>	<b>FVIII:Ag (pl)</b>
USA HA 1B	22/09/2017 10h46	18,00	509,00	49,00	9,6 %	1,07	1,18
USA HA 2B	22/09/2017 10h55	16,40	498,00	48,00	9,6 %	0,00	0,00
USA HA 3B	22/09/2017 10h59	17,40	556,00	56,00	10,1 %	0,00	0,00
USA HA 4B	22/09/2017 11h07	20,60	454,00	44,00	9,7 %	0,00	0,00
USA HA 5B	22/09/2017 11h11	21,40	722,00	72,00	10,0 %	3,11	3,45
USA HA 6B	22/09/2017 11h24	19,60	498,00	48,00	9,6 %	2,90	3,21
USA HA 7B	22/09/2017 11h27	20,30	556,00	56,00	10,1 %	0,00	0,00
USA HA 9B	22/09/2017 11h35	19,90	756,00	76,00	10,1 %	4,99	5,55
USA HA 8B	†						

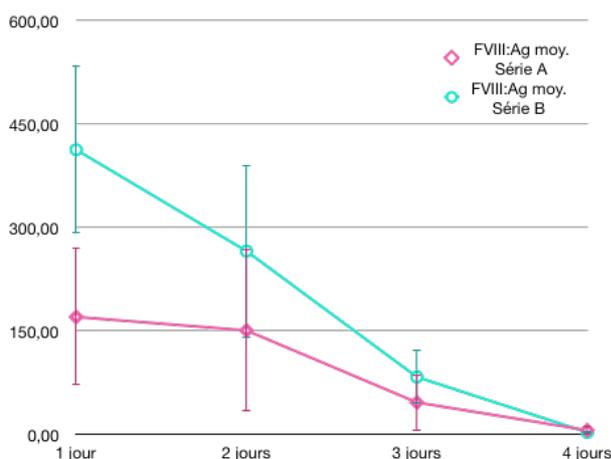
Figure 22. Résultat des dosages de FVIII-antigène réalisés sur les plasmas des souris injectées faisant partie de la série B. FVIII :Ag (pl) est la valeur du FVIII antigénique (FVIII :Ag) corrigée de la quantité de citrate 3,2 % apportée au volume V de plasma.

La moyenne des mesures du FVIII-antigène réalisées sur les plasmas des souris (1) correctement injectées et (2) ayant des taux circulants détectables sur ELISA 24 heures après l'injection, était donc de 170% (SD = 99,8) et 413% (SD = 121,6) pour les séries A et B respectivement.

Sur les 4 souris de la série A, chez lesquels des taux circulants supérieurs à 100 % ont été mesurés 24 h après l'injection, toutes avaient un taux de FVIII antigénique détectable 96 heures après l'injection (moyenne = 7,59% ; SD = 5,84). Ce résultat a été confirmé par la reproduction de l'expérience avec une moyenne de FVIII antigénique néanmoins inférieure chez les souris de la série B (moyenne = 3,02 % ; SD = 1,79) (voir Figure 22).



**Figure 23. Cinétique des concentrations antigéniques de FVIII circulant chez les souris hémophiles A injectées par le plasmide pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) des deux séries.** La mesure immuno-enzymatique du FVIII dans les plasmas a été réalisée pour l'intégralité des souris injectées ou non, correctement ou non. Sont répertoriées ici les souris pour lesquelles le FVIII antigénique a été retrouvé détectable à J1. Ceci exclus les souris USA HA 1A, 8A, 9A et 11A de la série A et la souris USA HA 4B de la série B.



**Figure 24. Cinétique des concentrations antigéniques moyennes de FVIII circulant chez les souris hémophiles A des deux séries.** Seules les souris présentant des taux d'antigènes détectables par dosage immunoenzymatique des plasmas obtenus 24 h après l'injection ont été incluses dans les calculs des moyennes et écarts-types.

Les prélèvements de plasma chez les souris des deux séries, à 24, 48, 72 et 96 heures, a permis d'établir une évaluation de la cinétique des taux antigéniques de FVIII circulant chez chacune des souris (voir *Figure 23*).

Après l'obtention d'un pic à 24h de l'injection, une phase décroissance lente a été observée, suivie d'une diminution beaucoup plus rapide des taux antigéniques de FVIII plasmatique.

Les taux de FVIII:Ag mesurés dans les plasmas des souris hémophiles A 96 heures après l'injections hydrodynamiques ont été de 4,7% en moyenne (SD = 4,7).

### 4.3 Mesure d'activité

Des mesures de l'activité pro-coagulante du FVIII ont été réalisées ensuite sur les plasmas des souris hémophiles A. L'objectif de cette étape consistait à démontrer la sécrétion d'un FVIII fonctionnel, après injection hydrodynamique du plasmide pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13). Cette caractérisation, cruciale pour l'évaluation de notre variant, n'avait pas pu être réalisée *in vitro* à partir du modèle cellulaire Huh7.

J1						
Souris	Date/Heure	Poids (g)	V (mL)	Dont citrate	Citrate	FVIII:C
<b>USA HA 1B</b>	19/09/2017 11h30	18,30	500,00	50,00	10,0 %	107,16
<b>USA HA 2B</b>	19/09/2017 11h10	17,30	110,00	10,00	9,1 %	0,00
<b>USA HA 3B</b>	19/09/2017 11h20	17,60	260,00	10,00	3,8 %	0,00
<b>USA HA 4B</b>	19/09/2017 11h35	21,10	330,00	30,00	9,1 %	0,00
<b>USA HA 5B</b>	19/09/2017 11h40	21,80	480,00	50,00	10,4 %	210,27
<b>USA HA 6B</b>	19/09/2017 12h10	19,60	480,00	60,00	12,5 %	231,48
<b>USA HA 7B</b>	19/09/2017 11h50	20,60	530,00	40,00	7,5 %	0,00
<b>USA HA 9B</b>	19/09/2017 12h00	19,40	255,00	25,00	9,8 %	182,73
<b>USA HA 8B</b>	†					

Tableau 11. Données concernant le prélèvement des plasmas des souris hémophiles A en vue de la mesure de l'activité procoagulante du FVIII-BDD (FVIII:C). Ces plasmas ont été prélevés 24h après injection hydrodynamique du plasmide pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13), à l'aide de capillaires siliconés. La mesure de l'activité pro-coagulante du FVIII a été réalisée par dosage chromogénique.

Ces mesures ont été réalisées sur les souris de la série B uniquement. Les plasmas ont été obtenus après un prélèvement de sang dans le plexus rétro-orbitaire à l'aide de pipettes pasteurs dont la face interne a été siliconée au laboratoire, évitant l'utilisation des capillaires héparinés. Le sang a été citraté (citrate de Na 3,2 %) afin d'inhiber le déclenchement de la coagulation (voir *Tableau 11*).

**J1**

<b>Souris</b>	<b>FVIII:C (%)</b>	<b>FVIII:Ag (%)</b>	<b>FVIII:C/FVIII:Ag</b>	<b>Activité spécifique (UI/dL)</b>
<b>USA HA 1B</b>	107,16	250,29	2,34	4281,46
<b>USA HA 2B</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>USA HA 3B</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>USA HA 4B</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>USA HA 5B</b>	210,27	424,30	2,02	4955,75
<b>USA HA 6B</b>	231,48	544,86	2,35	4248,40
<b>USA HA 7B</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>USA HA 9B</b>	182,73	431,55	2,36	4234,22
<b>USA HA 8B</b>	†			

**Tableau 12. Récapitulatif des valeurs de FVIII-antigène (FVIII :Ag) et d'activité pro-coagulante du FVIII (FVIII :C) dans les plasmas des souris hémophiles A de la série B.** Les plasmas des souris hémophiles A ont été prélevés 24h après l'injection hydrodynamique du plasmide pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13). La mesure de FVIII :C a été réalisée par dosage chromogénique ; la valeur des taux antigéniques, FVIII:Ag, a été obtenue par dosage immuno-enzymatique (ELISA). Le rapport entre valeur antigénique et activité pro-coagulante ainsi que l'activité spécifique du FVIII circulant a été calculé à partir de ces valeurs.

L'activité pro-coagulante du FVIII (FVIII :C) a été mesurée dans les plasmas de l'intégralité des souris de la série B, prélevés 24 heures après l'injection hydrodynamique du plasmide pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) (voir *Tableau 12*).

Dans les plasmas des 3 souris (USA HA 2B, 3B et 7B) n'ayant pas été injectées, aucune activité n'a pu être mesurée. Pour la souris USA HA 4B, dont le volume injecté n'a pas atteint la limite de 10 % du poids corporel (mL/g) (*Tableau 9*), aucune activité n'a été détectée (voir *Tableau 9*) ce qui est en adéquation avec la mesure des taux antigéniques circulants (voir *Tableau 10*).

Pour toutes les souris ayant montré des taux antigéniques de FVIII non-nuls 24 h après injection, le rapport antigène sur activité pro-coagulante a été systématiquement égal à environ 2,3 (moyenne (FVIII :Ag/FVIII :C) = 2,3 ; SD = 0,2). Ce résultat est en adéquation

avec les pratiques de laboratoires dans les dosages antigéniques du FVIII plasmatique et d'activité pro-coagulante du FVIII dans le cadre de l'utilisation de FVIII BDD.

Ce rapport variant peu, atteste de la très bonne corrélation entre mesure d'activité pro-coagulante et le dosage antigénique du FVIII dans les plasmas de ces souris hémophiles A ( $R^2 = 0,924$ ).

A l'exception de la souris USA HA 5B, les activités spécifiques calculées varient très peu entre les différentes souris hémophiles A, 24 heures après l'injection hydrodynamique (moyenne = 4430 UI/dL ; SD = 351).

# DISCUSSION

La première partie de ce projet avait l'ambition d'évaluer de nouveaux matériels cellulaires afin de produire un FVIII recombinant le plus fidèle possible au FVIII plasmatique.

La littérature s'enrichit d'année en année sur l'importance des PTMs du FVIII et sur leur possible lien avec le potentiel immunogène des molécules injectées au cours de la prophylaxie substitutive en FVIII chez les hémophiles (289-292).

A l'exception de quelques-uns, les rFVIII commercialisés sont produits sur des cellules de mammifères, dont les arsenaux enzymatiques diffèrent de ceux des cellules humaines. Ils ont donc subi des PTMs différentes remises en cause par une partie de la communauté scientifique.

Dans ce travail, ont donc été inclus de nouveaux matériels cellulaires, choisis au regard de la littérature. Premièrement, les cellules CHO sont actuellement les plus utilisées pour la production industrielle de rFVIII. Elles produisent de grandes quantités de protéines et sont dotées d'une vitesse de croissance très importante. Les cellules HEK ont été incluses en réponse à la publication puis la commercialisation du Nuwiq® (Octapharma) (voir 4.6.3. *Facteurs VIII recombinants : rFVIII*). Par ailleurs, les cellules Huh7 ont été choisies pour leur origine humaine et hépatique, et leur efficacité démontrée dans l'amélioration des PTMs lors de la production de FIX (281). Enfin, les cellules de la lignée TRP3 ont récemment été immortalisées à Lyon (283), à partir de cellules endothéliales des sinus hépatiques, naturellement productrices de FVIII humain. Elles représentent donc potentiellement le modèle cellulaire le plus fidèle pour une production de FVIII recombinant.

Pour cette lignée TRP3, le critère de faisabilité s'est avéré déterminant. En effet, affublées d'une croissance extrêmement lente, elles sont un modèle difficilement exploitable en vue d'une production de FVIII suffisante pour une caractérisation avancée de la protéine et, *a fortiori*, pour une éventuelle production industrielle, d'autant plus que ces cellules ne produisent pas naturellement du FVIII décelable par le kit ELISA utilisé au laboratoire.

Après transfection transitoire des cellules TRP3 par le pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) comme le pcDNA-FVIII-BDD-WT, les dosages immunoenzymatiques réalisés sur les surnageants n'ont pas permis non plus de mettre en évidence la moindre activité sécrétoire de FVIII.

Ces essais menés dans ce travail de thèse n'ont pas permis d'infirmier ni de confirmer leur capacité à produire le FVIII de manière intrinsèque. Le faible nombre de cellules mises en culture a été un facteur limitant majeur pour la poursuite de cette étude.

L'optimisation des techniques de transfection, de vectorisation et des conditions de cultures pourrait cependant améliorer ces résultats et permettre une exploration aboutie des caractéristiques d'un FVIII produit *in vitro* par les cellules naturellement productrices. Ainsi l'adaptation de la séquence promotrice (Tie2 promoter, promoteur du récepteur au VEGF,...), la transduction par le biais de vecteurs viraux pourraient permettre d'obtenir des cellules de l'endothélium des sinus hépatiques, la production d'un rFVIII en plus grande quantité.

La suite de ce travail s'est donc naturellement orientée vers l'exploration des différences entre le FVIII produit par la lignée Huh7 et la même protéine produite à partir de lignée HEK et CHO, après transfection transitoire, dans un premier temps.

Ces premiers essais ont confirmé les travaux de la littérature, montrant une capacité de sécrétion de FVIII des cellules HEK supérieure à celle des cellules CHO (293) quelle que soit la taille de la séquence insérée. En effet, les taux de FVIII antigénique dans les surnageants des cellules HEK étaient 4 et 11 fois supérieurs (*Figure 17*) à celui du milieu de

culture des cellules CHO, pour les constructions plasmidiques pcDNA FVIII-BDD-WT et pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) respectivement.

Les taux de FVIII:Ag mesurés dans les surnageants des cellules Huh7 se sont révélés peu différents de ceux retrouvés dans les surnageants des cellules CHO, et très inférieurs à celui des cellules HEK.

En résumé pour ces trois lignées, la transfection par le plasmide pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) a permis l'obtention de taux de FVIII antigéniques 3 à 10 fois supérieurs à ceux mesurés après transfection par le plasmide exempt de copies de l'intron 1 tronqué du FIX (*Figure 17*). Si l'augmentation de production induite par l'ajout des introns 1 tronqués du FIX dans la séquence complémentaire du gène *F8*, ne semble pas aussi importante pour les cellules HEK et Huh7, les résultats obtenus par transfection transitoire de la lignée CHO confirment les précédents travaux menés au sein du laboratoire lors de la conception de cette séquence complémentaire (284).

Les mesures d'activité pro-coagulante, (FVIII:C) réalisées afin de comparer la fonctionnalité de la protéine de FVIII lorsqu'elle est produite sur les 3 lignées étudiées, ont montré des résultats aberrants, notamment pour les cellules HEK et les cellules CHO. Ces discordances entre les mesures antigéniques et d'activité procoagulante du FVIII, pourtant réalisées sur les mêmes échantillons de surnageant, pourraient avoir deux origines :

- La présence dans les milieux de cultures de protéines, fonctionnelles ou non, interférant avec les tests réalisés ;
- La coloration des milieux de culture : le milieu de culture DMEM utilisé pour l'entretien des cellules HEK est un milieu très rouge. Les milieux de culture utilisés pour la culture des cellules Huh7 et CHO, orangés, adoptent une couleur rouge sombre également après concentration. Le test chromogénique, basé sur une lecture d'absorbance n'aurait donc pas dû être une option au regard du risque d'interférence. En effet, la p-nitroaniline produite lors de la deuxième étape du test et détectée par l'apparition d'une couleur jaune,

mesurée par absorbance à 405 nm. A cette longueur d'onde, la couleur rouge du milieu pourrait avoir interféré avec les résultats ;

- Enfin, le FVIII étant caractérisé par une extrême fragilité, il est possible qu'il se soit dégradé au cours des étapes de production ou de conditionnement. A nouveau, il est possible que des composants des surnageants de culture soient à l'origine des variations de la quantité de FVIII-antigène mesurée pour les différents types cellulaires.

La mesure de l'activité procoagulante du FVIII sur des surnageants cellulaires pose elle aussi de nombreux problèmes. En effet, après concentration, les milieux de culture cellulaire deviennent visqueux de par l'augmentation d'albumine par exemple, ceci les a probablement rendus impropres à un dosage de coagulation par turbidimétrie. Pour obtenir une mesure d'activité exploitable, la purification est indispensable, le risque étant de multiplier les étapes préopératoires occasionnant une perte de la fonction de la protéine et donc de sous-estimer l'activité du FVIII. En effet, puisque les taux obtenus avec le clone Huh7 AD12 sont faibles, même après purification, la concentration reste nécessaire. L'augmentation des capacités de production et de sécrétion est donc indispensable.

D'une part, les cellules Huh7 sont donc capables de produire un rFVIII après transfection transitoire par le plasmide pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13) de manière stable, et à taux constants, compatibles avec une production à grande échelle. En revanche, la fonctionnalité de la protéine n'a pas pu être déterminée. D'autre part, pour une (292) exploitation industrielle, la sécrétion de HSA (albumine) de manière intrinsèque pourrait s'avérer être un inconvénient de taille, allant à contre-courant de l'élimination des protéines humaines et animales au cours des générations. L'incidence d'apparition de anticorps inhibiteurs du FVIII dans le cadre de la thérapie substitutive semble diminuée par l'utilisation de concentrés de troisième génération (« albumin free ») par rapport à ceux des générations précédentes (292, 294). Lillcrap et collaborateurs ont récemment

proposé un modèle de mécanisme pharmaco-biologique l'immunogénicité des rFVIII, soutenant que l'état des connaissances actuelles ne permettait en aucun cas d'attribuer à l'albumine, ni aux autres protéines utilisées dans la galénique de ces produits un quelconque rôle immunogène. Pourtant, la littérature ne permet pas de l'infirmier, et le rôle de l'albumine contenue dans les rFVIII de 1<sup>re</sup> et 2<sup>e</sup> génération ne peut être pleinement écarté.

Afin de permettre une exploration des caractéristiques biochimiques de la molécule, les capacités de production doivent être encore améliorées.

Dans le cas des cellules Huh7, comme décrit dans la littérature, le milieu de culture peut être optimisé afin d'augmenter significativement la production protéique et donc de FVIII, par l'ajout d'interleukines comme IL6 ou IL-1 $\beta$  (295). De la même manière, Denis et collaborateurs montraient également une augmentation significative de la sécrétion du FVIII mais également celle du VWF sur des cellules après ajout d'interleukine 11 dans le milieu de culture (296).

Des publications récentes montrent également comment la composition du milieu de culture intervient de manière importante dans les processus enzymatiques responsables de PTM. A ce titre, Enjolras et collaborateurs ont montré l'amélioration des taux de récupération du FIX lorsqu'il est produit sur les cellules Huh7, expliquant cette amélioration par l'apport d'une phosphorylation non-retrouvée chez le FIX recombinant produit par des cellules CHO (282). Des études plus avancées permettraient d'évaluer la transposition de ces résultats au FVIII lorsqu'il est produit par des cellules Huh7.

Une étude plus approfondie des PTMs du FVIII produit sur les cellules Huh7 et une comparaison de la même protéine produite par d'autres lignées cellulaires pourraient évaluer l'intérêt de cette lignée, notamment au regard des glycosylations. Des optimisations de la technique de transfection, notamment permettant l'augmentation du nombre de copies plasmidiques intégrées du pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13), pourraient pallier le défaut de sécrétion des cellules Huh7 par rapport aux lignées HEK.

De telles études pourraient, par ailleurs, apporter des informations précieuses sur les caractéristiques biochimiques du FVIII dans le cadre de la thérapie génique, méthode utilisant des vecteurs viraux de type AAV pour transduire les hépatocytes des hémophiles A dont les premiers essais cliniques ont débuté. (297, 298)

La deuxième partie de ce projet s'inscrit dans la continuité du travail de caractérisation du FVIII produit après transfection par le pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13), entamé sur des modèles cellulaires notamment le modèle cellulaire hépatique.

En effet, le FVIII est une protéine fragile, capable de ne supporter qu'un nombre très limité de manipulations (et surtout de congélations/décongelations). Les techniques de production cellulaires, de purification protéique, de concentration, sont autant de facteurs de détérioration de la protéine.

En revanche, l'injection hydrodynamique repose sur l'injection d'une solution plasmidique. L'intérêt premier des injections hydrodynamiques est de diriger préférentiellement le plasmide et donc l'expression de celui-ci dans le foie de l'animal.

Si la technique semble démocratisée à l'étranger, en France, elle reste sujette à controverse. Les Autorités d'Éthique autorisant ou non les protocoles d'expérimentations animales l'estiment sévère, et l'obtention d'une telle autorisation est difficile.

Les plasmides, composés nucléotidiques, sont bien plus résistants que les protéines, dont le FVIII est l'une des plus fragile. D'autre part, leur production est plus aisée et, surtout, beaucoup plus rapide que celle des protéines. Les étapes d'extraction des plasmides ont en effet permis l'obtention de 1,5 mL de solution plasmidique, à 0,7 à  $\geq 1$   $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de plasmide, à partir de 2 à 2,5 L de suspension bactérienne. Puisque seulement 40  $\mu\text{g}$  de plasmide sont nécessaires à l'injection d'une souris hémophile A, une trentaine de souris peuvent être injectées à partir d'une seule de ces solutions.

Chez neuf souris hémophiles A (5 de la série A et 4 de la série B), les taux antigéniques circulants de FVIII ont été très importants, 24 heures après l'injection (moyenne = 250% ;

SD = 163,82). Au cours de la série B, les modifications des protocoles de prélèvement nous ont permis d'évaluer l'activité du FVIII, produit à partir de la séquence complémentaire comportant les deux copies de l'intron 1 du FIX.

La variation de ce taux de succès doit être exploitée avec méfiance. En effet, lors de la première série de souris hémophile A, plusieurs injections n'ont probablement pas été réalisées dans le réseau veineux caudal. En effet, l'injection d'un volume de cette importance, (il correspondrait à l'injection de 7 litres de solution pour un homme de 70 kg), provoque une congestion cardiaque dont les signes sont cliniquement (et aisément) visible : arrêt cardiaque fugace, arythmie puis tachycardie. Ces trois signes sont fugaces mais perceptibles. Ce n'est qu'au terme de quelques minutes que les signes de cette congestion disparaissent.

L'hépatomégalie est le second phénomène évocateur de la réussite de l'injection et ne se résorbe qu'après plusieurs minutes

Les souris correctement injectées ont eu besoin de plusieurs minutes avant de récupérer. Elles sont immobiles et semblent anxieuses et ce n'est que 15 à 30 minutes après l'injection qu'elles recouvrent leur vigueur.

De par notre expérience, plusieurs souris avaient probablement été mal injectées. Ces spécimens ont rapidement récupéré de l'injection et de l'anesthésie. Parfois, une grosseur sur l'arrière train apparaissait ; le liquide n'avait alors probablement pas été injecté dans le réseau veineux et s'était accumulé dans les tissus.

Après l'expérience de la série A, l'évolution de la dextérité à l'injection et la connaissance de ces signes par l'observation nous ont permis de mieux injecter les souris, et de catégoriser immédiatement celles pour lesquelles nous n'aurions pas de FVIII circulant.

Ainsi, sur les 4 souris de la seconde série ayant reçu un volume optimal de solution plasmidique, toutes ont exprimé le FVIIIa des taux très élevés. Pour la cinquième souris, un mouvement de la seringue a provoqué la sortie de l'aiguille de la veine. Le volume

injecté de 1,4 mL n'était alors pas suffisant pour permettre une bonne pression hydrostatique dans le réseau veineux hépatique.

Selon les divers protocoles réunis dans la littérature, tous recommandent une injection de la solution plasmidique en 5 à 8 secondes (286, 287, 299-301). Lors de l'injection des souris hémophiles A de la série A et n'incluant que les souris ayant effectivement reçu un volume total de 10% de leur poids corporel, le temps d'injection moyen était de 14 sec (SD = 1,51). Ce temps moyen, calculé de la même manière pour les souris hémophiles A de la série B, était de 9,4 sec (SD = 0,45). En considérant les résultats de ces injections hydrodynamiques en termes de FVIII circulant (en activité ou en antigène), nous avons confirmé que la vitesse d'injection est un facteur crucial du succès de la technique.

Comme précédemment décrit, chez les souris n'ayant pas reçu un volume suffisant de solution plasmidique de notre pcDNA FVIII-BDD-tFIX1(1+13), les taux de FVIII circulant à 24h étaient très faibles sinon indétectables (en antigène et en activité). Le volume a été, conformément à la littérature, un critère également déterminant.

Ces résultats nous ont permis de caractériser notre variant de FVIII-BDD, dont la séquence complémentaire inclus les copies de l'intron 1 tronqué du FIX, et d'attester de sa fonctionnalité. En effet, l'activité spécifique a été évaluée entre 4300 et 4800 UI/mg de protéine pour une activité maximale théorique de 4 000 à 10 000 UI/mg pour le FVIII humain (302). La visualisation de la chaîne lourde sur Western Blot, de taille équivalente à celle du ReFacto®, avait confirmé le bon épissage des séquences introniques, ces résultats confirment son activité pro-coagulante *in vivo*. Des explorations plus avancées pourraient être menées pour évaluer plus spécifiquement le bon épissage des séquences introniques telles que l'extraction d'ARN et la RT-PCR.

Parallèlement, la synthèse majoritairement hépatocytaire décrite dans la littérature doit être confirmée par une exploration immuno-histochimique du foie afin d'y localiser la protéine. Ces mêmes explorations pourraient permettre d'évaluer précisément la

potentielle atteinte hépatique engendrée par l'injection hydrodynamique. La dégradation des tissus pourrait avoir des répercussions sur les PTMs du FVIII sécrété.

Pourtant, cette technique d'injection hydrodynamique est perfectible. En effet, lors de la conception du plasmide, Plantier et collaborateurs ont fait le choix du promoteur CMV (CytoMégaloVirus Humain), considéré comme l'un des plus adaptés pour des expressions géniques de haute intensité, et ce dans plusieurs modèles cellulaires (284).

Cependant, plusieurs études mettent en évidence des systèmes cellulaires de trans-régulation capable d'inhiber ce promoteur, et ce dans plusieurs tissus, notamment hépatique (301, 303-305). Cette extinction du promoteur est responsable de l'extinction du gène d'intérêt dans le cadre de constructions plasmidiques.

Si l'extinction de l'expression du gène chez les souris hémophiles A injectées (5 jours) a été retrouvée beaucoup plus précoce que dans la littérature (20 à 200 jours), il est possible que la régulation du promoteur soit une des explications de cette rapide décroissance.

D'autre part, diverses techniques de conditionnement peuvent être utilisées (solutions hypertoniques, liposomes à action ciblée) (306) afin d'augmenter la perfusion au niveau du foie ou de permettre une expression plus ciblée. Il semble cependant que ces techniques n'offrent pas de meilleurs rendements et peuvent s'avérer très toxiques pour le foie.

Toutes les études recommandent en revanche une étude, *in vivo* exclusivement, de la cassette d'expression plasmidique afin d'optimiser celle-ci pour obtenir les taux les plus importants et d'expression allongée. Le remplacement du promoteur par un promoteur spécifique de la lignée hépatocytaire murine (LP1 murin, ApoE1...) semble être la plus importante alternative.

Une étude a été réalisée sur les modifications anatomo-histologiques des foies de souris après des injections hydrodynamiques. Comme nous l'avons également observé, la taille

du foie est considérablement accrue à la fin de l'injection hydrodynamique (307). Suda et collaborateurs ont ainsi montré l'effet de l'injection sur les différentes régions anatomiques du foie des souris et sur les différentes modifications cellulaires occasionnées par la pression hydrostatique (307), plus spécifiquement dans les régions péri-centrales. Ces observations ont montré des cellules avec des multiples vésicules, fruits de l'invagination de la membrane sous la pression, des cellules ayant perdu une quantité significative de leur contenu et des cellules incluant des érythrocytes et/ou plaquettes. Selon l'étude, tous ces changements semblent réversibles.

Des études anatomiques et histologiques du foie chez les souris hémophiles A permettraient d'évaluer la reproductibilité de cette étude.

Comme dans la littérature, à l'exception de quelques pertes liées à l'anesthésie, les taux de survie sont très élevés. Sur les 20 souris hémophiles A des deux séries injectées, une seule est décédée des suites d'un problème de positionnement du masque. La littérature recommande de pratiquer l'injection hydrodynamique sur des souris vigiles. En effet, les répercussions de l'anesthésie sur le système cardio-respiratoire semble être critère d'échec de la technique et de mortalité élevée. L'injection sur les souris vigiles nous étant apparu difficile et source d'anxiété pour les souris, nous avons pris le parti de réaliser les injections sur les souris sous anesthésie.

En terme de survie, nos résultats ne confirment pas les résultats de la littérature (285) et il est hautement probable que le bien-être de l'animal exige de pratiquer si possible l'injection sous anesthésie. En termes de résultat cependant, il est possible que la faible durée de l'expression de notre plasmide soit la conséquence de l'anesthésie qui, modifiant les flux sanguin, réduise la pression hydrostatique hépatique et donc, la quantité de plasmide pénétrant les membranes des hépatocytes.

## CONCLUSIONS

MÉMOIRE SOUTENU PAR Mr VLADIMIR JACQUELINE

L'hémophilie A est la plus fréquente des maladies génétiques à l'origine de troubles de la coagulation. Elle est le résultat d'un déficit quantitatif ou qualitatif de l'une des protéines clef de la coagulation : le facteur VIII (FVIII). Très rapidement après la mise en place du traitement, 30 % des hémophiles sévères verront leur pathologie compliquée par l'apparition d'anticorps inhibiteurs, augmentant le risque de saignement et compliquant la prise en charge de la pathologie.

Le FVIII étant caractérisé par un nombre très important de modifications post-traductionnelles, conséquences de nombreuses réactions enzymatiques au cours de sa maturation et très dépendantes du matériel enzymatique de la cellule. La littérature tend à suggérer que la production des FVIII recombinant sur des modèles cellulaires mammifères pourrait accroître le risque d'apparition d'inhibiteurs, alors dirigés contre des épitopes non-humains.

Pour cette étude, nous avons utilisé une séquence d'ADN complémentaire du gène *F8*, réalisée au sein du laboratoire, comportant dans les introns 1 et 13 du gène *F8*, des versions tronquées de l'intron 1 du FIX. Cette modification de la séquence complémentaire du gène a prouvé son intérêt par l'augmentation de la sécrétion du FVIII.

Dans un premier temps, nous avons utilisé cette séquence aux fins de transfecter des cellules de différentes lignées dont les lignées Huh7, décrites pour améliorer les modifications post-traductionnelles du FIX et la lignée TRP3, immortalisée à partir de cellules endothéliales des sinus hépatiques. L'obtention d'un clone cellulaire Huh7 exprimant le FVIII après transfection de notre séquence nous a permis de confirmer l'augmentation de la production du FVIII après insertion des copies tronquées de l'intron 1 du FIX. Les résultats des transfections transitoires ont montré une augmentation du FVIII sécrété d'un facteur 3 à 4. Nous ne sommes pas parvenus à générer des clones de cellules TRP3.

Dans un second temps, nous avons mis au point la technique d'injection hydrodynamique sur des lignées de souris hémophiles A pour évaluer la fonctionnalité de la protéine produite par des hépatocytes *in vivo*. L'injection hydrodynamique consiste en l'injection d'un large volume de solution plasmidique en un temps très court afin de permettre l'expression du gène d'intérêt, ici du gène *F8*, porté par ce plasmide, dans le foie de l'animal.

Le recours à l'injection hydrodynamique nous a permis d'évaluer l'activité pro-coagulante et la cinétique de la protéine *in vivo*. Nous avons ainsi obtenu des taux plasmatiques moyens de FVIII antigénique circulant de 250 % (n = 9), 24 h après l'injection. Parallèlement, les dosages d'activité pro-coagulante du

FVIII atteignaient 180 % (n =4) en moyenne. L'activité spécifique évaluée à 4300 UI/mg de protéine était donc en accord avec l'activité spécifique moyenne du FVIII.

Par suivi des taux FVIII par mesures antigéniques 24, 48, 72 et 96 heures après injection nous avons établi une cinétique de ces taux après injections hydrodynamiques ; l'expression du gène induite par la technique a perduré pendant 4 jours.

Les taux de FVIII produits par le clone Huh7 sont restés trop faibles pour permettre une exploration approfondie des caractéristiques de la protéine produite par la lignée hépatocytaire. Des optimisations restent *a fortiori* nécessaires avant (1) d'envisager une production à grande échelle.

En revanche, la mise en place d'un protocole d'injection hydrodynamique nous a permis de démontrer l'intérêt porté par cette séquence complémentaire améliorée en termes de production protéique et de valider les pleines fonctions du FVIII ainsi produit. A nouveau, l'optimisation pourrait permettre une production plus longue et d'amplitude plus importante de la protéine. Enfin, de plus amples explorations restent nécessaires pour évaluer la fidélité de ce FVIII recombinant, par rapport au FVIII plasmatique, lorsqu'il est produit par des cellules hépatiques, cibles privilégiées des techniques naissantes de thérapie génique. Ainsi seulement, le plein intérêt de l'association de la séquence améliorée et d'un modèle tissulaire hépatique pourra être démontré.

Le Président du Jury,  
(Nom et Signature)

C. Vinciguerra  


VU ET PERMIS D'IMPRIMER  
Lyon, le 15.10.17



Vu, la Directrice de l'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon  
Pour le Président de l'Université Claude Bernard

  
Professeur Christine VINCIGUERRA

# BIBLIOGRAPHIE

1. Myers DD, Jr. Pathophysiology of venous thrombosis. *Phlebology*. 2015;30(1 Suppl):7-13.
2. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch*. 2007;454(3):345-59.
3. Tarbell JM, Weinbaum S, Kamm RD. Cellular fluid mechanics and mechanotransduction. *Ann Biomed Eng*. 2005;33(12):1719-23.
4. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333(6174):664-6.
5. Kazmi RS, Boyce S, Lwaleed BA. Homeostasis of Hemostasis: The Role of Endothelium. *Semin Thromb Hemost*. 2015;41(6):549-55.
6. Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit*. 2001;7(4):801-19.
7. Zhang G, Xiang B, Dong A, Skoda RC, Daugherty A, Smyth SS, et al. Biphasic roles for soluble guanylyl cyclase (sGC) in platelet activation. *Blood*. 2011;118(13):3670-9.
8. Marcus AJ, Weksler BB, Jaffe EA, Broekman MJ. Synthesis of prostacyclin from platelet-derived endoperoxides by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1980;66(5):979-86.
9. Sadler JE. Thrombomodulin structure and function. *Thromb Haemost*. 1997;78(1):392-5.
10. Wood JP, Ellery PE, Maroney SA, Mast AE. Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood*. 2014;123(19):2934-43.
11. Laszik Z, Mitro A, Taylor FB, Jr., Ferrell G, Esmon CT. Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation*. 1997;96(10):3633-40.
12. Mohan Rao LV, Esmon CT, Pendurthi UR. Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor. *Blood*. 2014;124(10):1553-62.
13. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest*. 2003;124(3 Suppl):26S-32S.
14. Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, Rickles FR. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med*. 1996;2(2):209-15.
15. Osterud B, Flaegstad T. Increased tissue thromboplastin activity in monocytes of patients with meningococcal infection: related to an unfavourable prognosis. *Thromb Haemost*. 1983;49(1):5-7.
16. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:217-46.

17. Weibel ER, Palade GE. New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia. *J Cell Biol.* 1964;23:101-12.
18. Giblin JP, Hewlett LJ, Hannah MJ. Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Blood.* 2008;112(4):957-64.
19. Valentijn KM, van Driel LF, Mourik MJ, Hendriks GJ, Arends TJ, Koster AJ, et al. Multigranular exocytosis of Weibel-Palade bodies in vascular endothelial cells. *Blood.* 2010;116(10):1807-16.
20. Babich V, Meli A, Knipe L, Dempster JE, Skehel P, Hannah MJ, et al. Selective release of molecules from Weibel-Palade bodies during a lingering kiss. *Blood.* 2008;111(11):5282-90.
21. Mutch NJ, Moore NR, Wang E, Booth NA. Thrombus lysis by uPA, scuPA and tPA is regulated by plasma TAFI. *J Thromb Haemost.* 2003;1(9):2000-7.
22. Collen D. Fibrin-specific thrombolytic agents. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1988;81 Spec No:19-23.
23. Hajjar KA, Krishnan S. Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc Med.* 1999;9(5):128-38.
24. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 1993;7(1):52-62.
25. Meyers KM, Holmsen H, Seachord CL. Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am J Physiol.* 1982;243(3):R454-61.
26. White JG, Clawson CC. The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system. *Am J Pathol.* 1980;101(2):353-64.
27. Ebbeling L, Robertson C, McNicol A, Gerrard JM. Rapid ultrastructural changes in the dense tubular system following platelet activation. *Blood.* 1992;80(3):718-23.
28. Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, et al. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood.* 2002;100(12):4033-9.
29. Springer TA. Biology and physics of von Willebrand factor concatamers. *J Thromb Haemost.* 2011;9 Suppl 1:130-43.
30. Weitz JI. Overview of Hemostasis and Thrombosis. In: S. HRBEJSLEHHEWJIAJSMEAA, editor. *Hematology : basic principles and practice (Sixth Edition)*: Elsevier; 2013. p. 1774-83.
31. Lhermusier T, Chap H, Payrastre B. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J Thromb Haemost.* 2011;9(10):1883-91.
32. Murugappa S, Kunapuli SP. The role of ADP receptors in platelet function. *Front Biosci.* 2006;11:1977-86.

33. Hechler B, Leon C, Vial C, Vigne P, Frelin C, Cazenave JP, et al. The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood*. 1998;92(1):152-9.
34. Cattaneo M, Zighetti ML, Lombardi R, Martinez C, Lecchi A, Conley PB, et al. Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y12 receptor of a patient with congenital bleeding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(4):1978-83.
35. Thomas DW, Mannon RB, Mannon PJ, Latour A, Oliver JA, Hoffman M, et al. Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A2. *J Clin Invest*. 1998;102(11):1994-2001.
36. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407(6801):258-64.
37. Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature*. 2001;413(6851):74-8.
38. Gruner S, Prostedna M, Schulte V, Krieg T, Eckes B, Brakebusch C, et al. Multiple integrin-ligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo. *Blood*. 2003;102(12):4021-7.
39. Suh TT, Holmback K, Jensen NJ, Daugherty CC, Small K, Simon DI, et al. Resolution of spontaneous bleeding events but failure of pregnancy in fibrinogen-deficient mice. *Genes Dev*. 1995;9(16):2020-33.
40. Ruggeri ZM, Dent JA, Saldivar E. Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood*. 1999;94(1):172-8.
41. Kasirer-Friede A, Ruggeri ZM, Shattil SJ. Role for ADAP in shear flow-induced platelet mechanotransduction. *Blood*. 2010;115(11):2274-82.
42. Shiltagh N, Kirkpatrick J, Cabrita LD, McKinnon TA, Thalassinou K, Tuddenham EG, et al. Solution structure of the major factor VIII binding region on von Willebrand factor. *Blood*. 2014;123(26):4143-51.
43. Katsumi A, Tuley EA, Bodo I, Sadler JE. Localization of disulfide bonds in the cystine knot domain of human von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 2000;275(33):25585-94.
44. Purvis AR, Sadler JE. A covalent oxidoreductase intermediate in propeptide-dependent von Willebrand factor multimerization. *J Biol Chem*. 2004;279(48):49982-8.
45. Huang RH, Wang Y, Roth R, Yu X, Purvis AR, Heuser JE, et al. Assembly of Weibel-Palade body-like tubules from N-terminal domains of von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(2):482-7.
46. Mayadas TN, Wagner DD. In vitro multimerization of von Willebrand factor is triggered by low pH. Importance of the propolypeptide and free sulfhydryls. *J Biol Chem*. 1989;264(23):13497-503.

47. Michaux G, Abbitt KB, Collinson LM, Haberichter SL, Norman KE, Cutler DF. The physiological function of von Willebrand's factor depends on its tubular storage in endothelial Weibel-Palade bodies. *Dev Cell*. 2006;10(2):223-32.
48. Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, Voorberg J, Eikenboom J. Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood*. 2011;117(19):5033-43.
49. Bendetowicz AV, Morris JA, Wise RJ, Gilbert GE, Kaufman RJ. Binding of factor VIII to von willebrand factor is enabled by cleavage of the von Willebrand factor propeptide and enhanced by formation of disulfide-linked multimers. *Blood*. 1998;92(2):529-38.
50. Fibrinogen Studies C, Danesh J, Lewington S, Thompson SG, Lowe GD, Collins R, et al. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA*. 2005;294(14):1799-809.
51. Bridge KI, Philippou H, Ariens R. Clot properties and cardiovascular disease. *Thromb Haemost*. 2014;112(5):901-8.
52. Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin Formation, Structure and Properties. *Subcell Biochem*. 2017;82:405-56.
53. Redman CM, Xia H. Fibrinogen biosynthesis. Assembly, intracellular degradation, and association with lipid synthesis and secretion. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:480-95.
54. Dalmon J, Laurent M, Courtois G. The human beta fibrinogen promoter contains a hepatocyte nuclear factor 1-dependent interleukin-6-responsive element. *Mol Cell Biol*. 1993;13(2):1183-93.
55. Henschen A, Lottspeich F, Kehl M, Southan C. Covalent structure of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci*. 1983;408:28-43.
56. Weisel JW, Medved L. The structure and function of the alpha C domains of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:312-27.
57. Yang Z, Mochalkin I, Doolittle RF. A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(26):14156-61.
58. Tsurupa G, Hantgan RR, Burton RA, Pechik I, Tjandra N, Medved L. Structure, stability, and interaction of the fibrin(ogen) alphaC-domains. *Biochemistry*. 2009;48(51):12191-201.
59. Cilia La Corte AL, Philippou H, Ariens RA. Role of fibrin structure in thrombosis and vascular disease. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2011;83:75-127.
60. Blomback B, Hessel B, Hogg D, Therkildsen L. A two-step fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation. *Nature*. 1978;275(5680):501-5.

61. Weisel JW. Fibrin assembly. Lateral aggregation and the role of the two pairs of fibrinopeptides. *Biophys J*. 1986;50(6):1079-93.
62. Hethershaw EL, Cilia La Corte AL, Duval C, Ali M, Grant PJ, Ariens RA, et al. The effect of blood coagulation factor XIII on fibrin clot structure and fibrinolysis. *J Thromb Haemost*. 2014;12(2):197-205.
63. Duval C, Allan P, Connell SD, Ridger VC, Philippou H, Ariens RA. Roles of fibrin alpha- and gamma-chain specific cross-linking by FXIIIa in fibrin structure and function. *Thromb Haemost*. 2014;111(5):842-50.
64. Gaffney PJ, Whitaker AN. Fibrin crosslinks and lysis rates. *Thromb Res*. 1979;14(1):85-94.
65. Mutch NJ, Koikkalainen JS, Fraser SR, Duthie KM, Griffin M, Mitchell J, et al. Model thrombi formed under flow reveal the role of factor XIII-mediated cross-linking in resistance to fibrinolysis. *J Thromb Haemost*. 2010;8(9):2017-24.
66. Francis CW, Marder VJ, Martin SE. Plasmin degradation of crosslinked fibrin. I. Structural analysis of the particulate clot and identification of new macromolecular-soluble complexes. *Blood*. 1980;56(3):456-64.
67. Lorand L. Factor XIII: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:291-311.
68. Fraser SR, Booth NA, Mutch NJ. The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through alpha(2)-antiplasmin cross-linking. *Blood*. 2011;117(23):6371-4.
69. Valnickova Z, Enghild JJ. Human procarboxypeptidase U, or thrombin-activable fibrinolysis inhibitor, is a substrate for transglutaminases. Evidence for transglutaminase-catalyzed cross-linking to fibrin. *J Biol Chem*. 1998;273(42):27220-4.
70. Ritchie H, Lawrie LC, Mosesson MW, Booth NA. Characterization of crosslinking sites in fibrinogen for plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2). *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:215-8.
71. Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost*. 2009;7(1):4-13.
72. Hanna LS, Scheraga HA, Francis CW, Marder VJ. Comparison of structures of various human fibrinogens and a derivative thereof by a study of the kinetics of release of fibrinopeptides. *Biochemistry*. 1984;23(20):4681-7.
73. Rijken DC, Wijngaards G, Welbergen J. Immunological characterization of plasminogen activator activities in human tissues and body fluids. *J Lab Clin Med*. 1981;97(4):477-86.
74. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Thromb Haemost*. 1980;43(2):77-89.
75. Medcalf RL. What drives "fibrinolysis"? *Hamostaseologie*. 2015;35(4):303-10.

76. Brummel-Ziedins KM, K.G. Molecular Basis of Blood Coagulation. In: S. HRBEJSLEHHEWJIAJSMEAA, editor. Hematology : basic principles and practice (Sixth Edition): Elsevier; 2013. p. 1885-905.
77. Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood*. 1990;76(1):1-16.
78. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science*. 1964;145(3638):1310-2.
79. Stenflo J. Contributions of Gla and EGF-like domains to the function of vitamin K-dependent coagulation factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1999;9(1):59-88.
80. Hemker HC, Muller AD. Kinetic aspects of the interaction of blood-clotting enzymes. VI. Localization of the site of blood-coagulation inhibition by the protein induced by vitamin K absence (PIVKA). *Thromb Diath Haemorrh*. 1968;20(1):78-87.
81. van Dieijen G, Tans G, Rosing J, Hemker HC. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J Biol Chem*. 1981;256(7):3433-42.
82. Nesheim ME, Taswell JB, Mann KG. The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase. *J Biol Chem*. 1979;254(21):10952-62.
83. Komiyama Y, Pedersen AH, Kisiel W. Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor. *Biochemistry*. 1990;29(40):9418-25.
84. Hoffman M, Monroe DM, 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85(6):958-65.
85. Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood*. 1993;81(3):734-44.
86. Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5260-4.
87. Butenas S, DiLorenzo ME, Mann KG. Ultrasensitive fluorogenic substrates for serine proteases. *Thromb Haemost*. 1997;78(4):1193-201.
88. Davie EW, Kulman JD. An overview of the structure and function of thrombin. *Semin Thromb Hemost*. 2006;32 Suppl 1:3-15.
89. Mann KG, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood*. 2003;101(1):20-30.
90. Fay PJ. Subunit structure of thrombin-activated human factor VIIIa. *Biochim Biophys Acta*. 1988;952(2):181-90.

91. Mann KG, Krishnaswamy S, Lawson JH. Surface-dependent hemostasis. *Semin Hematol.* 1992;29(3):213-26.
92. Ahmad SS, Rawala-Sheikh R, Walsh PN. Components and assembly of the factor X activating complex. *Semin Thromb Hemost.* 1992;18(3):311-23.
93. Girard TJ, Warren LA, Novotny WF, Likert KM, Brown SG, Miletich JP, et al. Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature.* 1989;338(6215):518-20.
94. Hockin MF, Jones KC, Everse SJ, Mann KG. A model for the stoichiometric regulation of blood coagulation. *J Biol Chem.* 2002;277(21):18322-33.
95. Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature.* 1984;312(5992):342-7.
96. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature.* 1984;312(5992):326-30.
97. Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds G, Jr., Gitschier J. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics.* 1990;7(1):1-11.
98. Levinson B, Bermingham JR, Jr., Metzenberg A, Kenwrick S, Chapman V, Gitschier J. Sequence of the human factor VIII-associated gene is conserved in mouse. *Genomics.* 1992;13(3):862-5.
99. Peters MF, Ross CA. Isolation of a 40-kDa Huntingtin-associated protein. *J Biol Chem.* 2001;276(5):3188-94.
100. Webster WP, Zukoski CF, Hutchin P, Reddick RL, Mandel SR, Penick GD. Plasma factor VIII synthesis and control as revealed by canine organ transplantation. *Am J Physiol.* 1971;220(5):1147-54.
101. Hollestelle MJ, Thinnis T, Crain K, Stiko A, Kruijt JK, van Berkel TJ, et al. Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo--a closer look. *Thromb Haemost.* 2001;86(3):855-61.
102. Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EG, Lawn RM. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature.* 1985;317(6039):726-9.
103. Shahani T, Covens K, Lavend'homme R, Jazouli N, Sokal E, Peerlinck K, et al. Human liver sinusoidal endothelial cells but not hepatocytes contain factor VIII. *J Thromb Haemost.* 2014;12(1):36-42.
104. Shahani T, Lavend'homme R, Luttun A, Saint-Remy JM, Peerlinck K, Jacquemin M. Activation of human endothelial cells from specific vascular beds induces the release of a FVIII storage pool. *Blood.* 2010;115(23):4902-9.
105. Figueiredo MS, Brownlee GG. cis-acting elements and transcription factors involved in the promoter activity of the human factor VIII gene. *J Biol Chem.* 1995;270(20):11828-38.

106. McGlynn LK, Mueller CR, Begbie M, Notley CR, Lillicrap D. Role of the liver-enriched transcription factor hepatocyte nuclear factor 1 in transcriptional regulation of the factor V111 gene. *Mol Cell Biol.* 1996;16(5):1936-45.
107. Nougier C, Roualdes O, Fretigny M, d'Oiron R, Costa C, Negrier C, et al. Characterization of four novel molecular changes in the promoter region of the factor VIII gene. *Haemophilia.* 2014;20(2):e149-56.
108. Bogdanova N, Markoff A, Eisert R, Wermes C, Pollmann H, Todorova A, et al. Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with mild and moderate hemophilia A. *Hum Mutat.* 2007;28(1):54-60.
109. Green PM, Bagnall RD, Waseem NH, Giannelli F. Haemophilia A mutations in the UK: results of screening one-third of the population. *Br J Haematol.* 2008;143(1):115-28.
110. Zimmermann MA, Meier D, Oldenburg J, Muller CR, Rost S. Identification and characterization of mutations in the promoter region of the factor VIII gene. *J Thromb Haemost.* 2012;10(2):314-7.
111. Dai L, Cutler JA, Savidge GF, Mitchell MJ. Characterization of a causative mutation of hemophilia A identified in the promoter region of the factor VIII gene (F8). *J Thromb Haemost.* 2008;6(1):193-5.
112. Riccardi F, Rivolta GF, Franchini M, Pattacini C, Neri TM, Tagliaferri A. Characterization of a novel mutation in the F8 promoter region associated with mild hemophilia A and resistance to DDAVP therapy. *J Thromb Haemost.* 2009;7(7):1234-5.
113. Foster PA, Zimmerman TS. Factor VIII structure and function. *Blood Rev.* 1989;3(3):180-91.
114. Nordfang O. Coagulation factor VIII. Studies of its subunits. *Eur J Haematol Suppl.* 1989;49:1-28.
115. Dorner AJ, Wasley LC, Kaufman RJ. Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1989;264(34):20602-7.
116. Murphy ME, Lindley PF, Adman ET. Structural comparison of cupredoxin domains: domain recycling to construct proteins with novel functions. *Protein Sci.* 1997;6(4):761-70.
117. Ferris SP, Kodali VK, Kaufman RJ. Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. *Dis Model Mech.* 2014;7(3):331-41.
118. Pipe SW, Morris JA, Shah J, Kaufman RJ. Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin. *J Biol Chem.* 1998;273(14):8537-44.
119. Cao SS, Kaufman RJ. Unfolded protein response. *Curr Biol.* 2012;22(16):R622-6.
120. Orlova NA, Kovnir SV, Vorobiev, II, Gabibov AG, Vorobiev AI. Blood Clotting Factor VIII: From Evolution to Therapy. *Acta Naturae.* 2013;5(2):19-39.

121. Selvaraj SR, Scheller AN, Miao HZ, Kaufman RJ, Pipe SW. Bioengineering of coagulation factor VIII for efficient expression through elimination of a dispensable disulfide loop. *J Thromb Haemost.* 2012;10(1):107-15.
122. Itin C, Roche AC, Monsigny M, Hauri HP. ERGIC-53 is a functional mannose-selective and calcium-dependent human homologue of leguminous lectins. *Mol Biol Cell.* 1996;7(3):483-93.
123. Nichols WC, Seligsohn U, Zivelin A, Terry VH, Arnold ND, Siemieniak DR, et al. Linkage of combined factors V and VIII deficiency to chromosome 18q by homozygosity mapping. *J Clin Invest.* 1997;99(4):596-601.
124. Appenzeller C, Andersson H, Kappeler F, Hauri HP. The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nat Cell Biol.* 1999;1(6):330-4.
125. Nyfeler B, Reiterer V, Wendeler MW, Stefan E, Zhang B, Michnick SW, et al. Identification of ERGIC-53 as an intracellular transport receptor of alpha1-antitrypsin. *J Cell Biol.* 2008;180(4):705-12.
126. Morais VA, Brito C, Pijak DS, Crystal AS, Fortna RR, Li T, et al. N-glycosylation of human nicastrin is required for interaction with the lectins from the secretory pathway calnexin and ERGIC-53. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762(9):802-10.
127. Nyfeler B, Zhang B, Ginsburg D, Kaufman RJ, Hauri HP. Cargo selectivity of the ERGIC-53/MCFD2 transport receptor complex. *Traffic.* 2006;7(11):1473-81.
128. Zheng C, Liu HH, Yuan S, Zhou J, Zhang B. Molecular basis of LMAN1 in coordinating LMAN1-MCFD2 cargo receptor formation and ER-to-Golgi transport of FV/FVIII. *Blood.* 2010;116(25):5698-706.
129. Miller EA, Schekman R. COPII - a flexible vesicle formation system. *Curr Opin Cell Biol.* 2013;25(4):420-7.
130. Zhang B, Cunningham MA, Nichols WC, Bernat JA, Seligsohn U, Pipe SW, et al. Bleeding due to disruption of a cargo-specific ER-to-Golgi transport complex. *Nat Genet.* 2003;34(2):220-5.
131. Khoriaty R, Vasievich MP, Ginsburg D. The COPII pathway and hematologic disease. *Blood.* 2012;120(1):31-8.
132. Nishio M, Kamiya Y, Mizushima T, Wakatsuki S, Sasakawa H, Yamamoto K, et al. Structural basis for the cooperative interplay between the two causative gene products of combined factor V and factor VIII deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(9):4034-9.
133. Callaghan MUKRJ. Cellular processing of factor VIII and factor IX. In: Lee CAB, E.E. ; Hoots, K.W., editor. *Textbook of Hemophilia (Third Edition)*: John Wiley & Sons, Ltd; 2014.
134. Kannicht C, Ramstrom M, Kohla G, Tiemeyer M, Casademunt E, Walter O, et al. Characterisation of the post-translational modifications of a novel, human cell line-derived recombinant human factor VIII. *Thromb Res.* 2013;131(1):78-88.

135. Pittman DD, Wang JH, Kaufman RJ. Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII. *Biochemistry*. 1992;31(13):3315-25.
136. Michnick DA, Pittman DD, Wise RJ, Kaufman RJ. Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage. *J Biol Chem*. 1994;269(31):20095-102.
137. Pipe SW, Montgomery RR, Pratt KP, Lenting PJ, Lillicrap D. Life in the shadow of a dominant partner: the FVIII-VWF association and its clinical implications for hemophilia A. *Blood*. 2016;128(16):2007-16.
138. Yee A, Gildersleeve RD, Gu S, Kretz CA, McGee BM, Carr KM, et al. A von Willebrand factor fragment containing the D'D<sub>3</sub> domains is sufficient to stabilize coagulation factor VIII in mice. *Blood*. 2014;124(3):445-52.
139. Goodeve A, James P. von Willebrand Disease. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mefford HC, et al., editors. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA)1993.
140. Mazurier C, Goudemand J, Hilbert L, Caron C, Fressinaud E, Meyer D. Type 2N von Willebrand disease: clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001;14(2):337-47.
141. Haberichter S, Shi Q, Montgomery R, editors. *The biology of von Willebrand factor and factor VIII-regulated release. Hematology Meeting Reports (formerly Haematologica Reports); 2009.*
142. Leyte A, Verbeet MP, Brodniewicz-Proba T, Van Mourik JA, Mertens K. The interaction between human blood-coagulation factor VIII and von Willebrand factor. Characterization of a high-affinity binding site on factor VIII. *Biochem J*. 1989;257(3):679-83.
143. Jacquemin M. Variable region heavy chain glycosylation determines the anticoagulant activity of a factor VIII antibody. *Haemophilia*. 2010;16(102):16-9.
144. Gilbert GE, Kaufman RJ, Arena AA, Miao H, Pipe SW. Four hydrophobic amino acids of the factor VIII C2 domain are constituents of both the membrane-binding and von Willebrand factor-binding motifs. *J Biol Chem*. 2002;277(8):6374-81.
145. Saenko EL, Scandella D, Yakhyaev AV, Greco NJ. Activation of factor VIII by thrombin increases its affinity for binding to synthetic phospholipid membranes and activated platelets. *J Biol Chem*. 1998;273(43):27918-26.
146. Fay PJ. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Rev*. 2004;18(1):1-15.
147. Terraube V, O'Donnell JS, Jenkins PV. Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia*. 2010;16(1):3-13.
148. Bloem E, Meems H, van den Biggelaar M, Mertens K, Meijer AB. A<sub>3</sub> domain region 1803-1818 contributes to the stability of activated factor VIII and includes a binding site for activated factor IX. *J Biol Chem*. 2013;288(36):26105-11.

149. Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry*. 1986;25(2):505-12.
150. Plantier JL, Rolli V, Ducasse C, Dargaud Y, Enjolras N, Boukerche H, et al. Activated factor X cleaves factor VIII at arginine 562, limiting its cofactor efficiency. *J Thromb Haemost*. 2010;8(2):286-93.
151. Fay PJ, Beattie T, Huggins CF, Regan LM. Factor VIIIa A2 subunit residues 558-565 represent a factor IXa interactive site. *J Biol Chem*. 1994;269(32):20522-7.
152. Bajaj SP, Schmidt AE, Mathur A, Padmanabhan K, Zhong D, Mastri M, et al. Factor IXa:factor VIIIa interaction. helix 330-338 of factor IXa interacts with residues 558-565 and spatially adjacent regions of the a2 subunit of factor VIIIa. *J Biol Chem*. 2001;276(19):16302-9.
153. Venkateswarlu D. Structural insights into the interaction of blood coagulation co-factor VIIIa with factor IXa: a computational protein-protein docking and molecular dynamics refinement study. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452(3):408-14.
154. Fay PJ, Scandella D. Human inhibitor antibodies specific for the factor VIII A2 domain disrupt the interaction between the subunit and factor IXa. *J Biol Chem*. 1999;274(42):29826-30.
155. Fay PJ, Haidaris PJ, Smudzin TM. Human factor VIIIa subunit structure. Reconstruction of factor VIIIa from the isolated A1/A3-C1-C2 dimer and A2 subunit. *J Biol Chem*. 1991;266(14):8957-62.
156. Lollar P, Parker ET. Structural basis for the decreased procoagulant activity of human factor VIII compared to the porcine homolog. *J Biol Chem*. 1991;266(19):12481-6.
157. Lollar P, Knutson GJ, Fass DN. Stabilization of thrombin-activated porcine factor VIII:C by factor IXa phospholipid. *Blood*. 1984;63(6):1303-8.
158. Donath MS, 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. *J Biol Chem*. 1995;270(8):3648-55.
159. Nogami K, Freas J, Manithody C, Wakabayashi H, Rezaie AR, Fay PJ. Mechanisms of interactions of factor X and factor Xa with the acidic region in the factor VIII A1 domain. *J Biol Chem*. 2004;279(32):33104-13.
160. Nogami K, Lapan KA, Zhou Q, Wakabayashi H, Fay PJ. Identification of a factor Xa-interactive site within residues 337-372 of the factor VIII heavy chain. *J Biol Chem*. 2004;279(16):15763-71.
161. Nogami K, Wakabayashi H, Fay PJ. Mechanisms of factor Xa-catalyzed cleavage of the factor VIIIa A1 subunit resulting in cofactor inactivation. *J Biol Chem*. 2003;278(19):16502-9.
162. Dahlback B, Hildebrand B. Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(4):1396-400.

163. Shen L, Dahlback B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem.* 1994;269(29):18735-8.
164. Koedam JA, Meijers JC, Sixma JJ, Bouma BN. Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. *J Clin Invest.* 1988;82(4):1236-43.
165. Gale AJ, Cramer TJ, Rozenshteyn D, Cruz JR. Detailed mechanisms of the inactivation of factor VIIIa by activated protein C in the presence of its cofactors, protein S and factor V. *J Biol Chem.* 2008;283(24):16355-62.
166. Lenting PJ, Neels JG, van den Berg BM, Clijsters PP, Meijerman DW, Pannekoek H, et al. The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 1999;274(34):23734-9.
167. Saenko EL, Yakhyaev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG. Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem.* 1999;274(53):37685-92.
168. Bovenschen N, Herz J, Grimbergen JM, Lenting PJ, Havekes LM, Mertens K, et al. Elevated plasma factor VIII in a mouse model of low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency. *Blood.* 2003;101(10):3933-9.
169. Marchetti G, Lunghi B, Legnani C, Cini M, Pinotti M, Mascoli F, et al. Contribution of low density lipoprotein receptor-related protein genotypes to coagulation factor VIII levels in thrombotic women. *Haematologica.* 2006;91(9):1261-3.
170. Vormittag R, Bencur P, Ay C, Tengler T, Vukovich T, Quehenberger P, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 polymorphism 663 C > T affects clotting factor VIII activity and increases the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2007;5(3):497-502.
171. Cunningham N, Laffan MA, Manning RA, O'Donnell JS. Low-density lipoprotein receptor-related protein polymorphisms in patients with elevated factor VIII coagulant activity and venous thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2005;16(7):465-8.
172. Morange PE, Tregouet DA, Frere C, Saut N, Pellegrina L, Alessi MC, et al. Biological and genetic factors influencing plasma factor VIII levels in a healthy family population: results from the Stanislas cohort. *Br J Haematol.* 2005;128(1):91-9.
173. Bovenschen N, Mertens K, Hu L, Havekes LM, van Vlijmen BJ. LDL receptor cooperates with LDL receptor-related protein in regulating plasma levels of coagulation factor VIII in vivo. *Blood.* 2005;106(3):906-12.
174. Bovenschen N, Boertjes RC, van Stempvoort G, Voorberg J, Lenting PJ, Meijer AB, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein and factor IXa share structural requirements for binding to the A3 domain of coagulation factor VIII. *J Biol Chem.* 2003;278(11):9370-7.

175. Bovenschen N, van Stempvoort G, Voorberg J, Mertens K, Meijer AB. Proteolytic cleavage of factor VIII heavy chain is required to expose the binding-site for low-density lipoprotein receptor-related protein within the A<sub>2</sub> domain. *J Thromb Haemost.* 2006;4(7):1487-93.
176. Keeling DM, Sukhu K, Kemball-Cook G, Waseem N, Bagnall R, Lloyd JV. Diagnostic importance of the two-stage factor VIII:C assay demonstrated by a case of mild haemophilia associated with His1954→Leu substitution in the factor VIII A<sub>3</sub> domain. *Br J Haematol.* 1999;105(4):1123-6.
177. Mumford AD, Laffan M, O'Donnell J, McVey JH, Johnson DJ, Manning RA, et al. A Tyr346→Cys substitution in the interdomain acidic region a<sub>1</sub> of factor VIII in an individual with factor VIII:C assay discrepancy. *Br J Haematol.* 2002;118(2):589-94.
178. Lyall H, Hill M, Westby J, Grimley C, Dolan G. Tyr346→Cys mutation results in factor VIII:C assay discrepancy and a normal bleeding phenotype - is this mild haemophilia A? *Haemophilia.* 2008;14(1):78-80.
179. Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, Seehafer J, Kirchgesser M, Haack A, et al. Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost.* 1995;74(6):1402-6.
180. Lakich D, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet.* 1993;5(3):236-41.
181. Lannoy N, Hermans C. Principles of genetic variations and molecular diseases: applications in hemophilia A. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;104:1-8.
182. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum Mol Genet.* 1993;2(11):1773-8.
183. Naylor JA, Nicholson P, Goodeve A, Hassock S, Peake I, Giannelli F. A novel DNA inversion causing severe hemophilia A. *Blood.* 1996;87(8):3255-61.
184. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood.* 2002;99(1):168-74.
185. Brinke A, Tagliavacca L, Naylor J, Green P, Giangrande P, Giannelli F. Two chimaeric transcription units result from an inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene and a region reportedly affected by reciprocal translocations in T-cell leukaemia. *Hum Mol Genet.* 1996;5(12):1945-51.
186. Kemball-Cook G, Gomez K. Molecular Basis of Hemophilia A. *Textbook of Hemophilia: John Wiley & Sons, Ltd; 2014. p. 21-32.*
187. Kessler L, Adams R, Mighion L, Walther S, Ganguly A. Prenatal diagnosis in haemophilia A: experience of the genetic diagnostic laboratory. *Haemophilia.* 2014;20(6):e384-91.
188. Graham JB, Buckwalter JA, et al. Canine hemophilia; observations on the course, the clotting anomaly, and the effect of blood transfusions. *J Exp Med.* 1949;90(2):97-111.
189. Brinkhous KM, Graham JB. Hemophilia in the female dog. *Science.* 1950;111(2896):723-4.

190. Giles AR, Tinlin S, Greenwood R. A canine model of hemophilic (factor VIII:C deficiency) bleeding. *Blood*. 1982;60(3):727-30.
191. Neuenschwander S, Kissling-Albrecht L, Heiniger J, Backfisch W, Stranzinger G, Pliska V. Inherited defect of blood clotting factor VIII (haemophilia A) in sheep. *Thromb Haemost*. 1992;68(5):618-20.
192. Neuenschwander S, Pliska V. Factor VIII in blood plasma of haemophilic sheep: analysis of clotting time-plasma dilution curves. *Haemostasis*. 1994;24(1):27-35.
193. Porada CD, Sanada C, Long CR, Wood JA, Desai J, Frederick N, et al. Clinical and molecular characterization of a re-established line of sheep exhibiting hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2010;8(2):276-85.
194. Lozier JN, Nichols TC. Animal models of hemophilia and related bleeding disorders. *Semin Hematol*. 2013;50(2):175-84.
195. Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH, Jr. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat Genet*. 1995;10(1):119-21.
196. Bi L, Sarkar R, Naas T, Lawler AM, Pain J, Shumaker SL, et al. Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies. *Blood*. 1996;88(9):3446-50.
197. Booth CJ, Brooks MB, Rockwell S. Spontaneous coagulopathy in inbred WAG/RijYcb rats. *Comp Med*. 2010;60(1):25-30.
198. Goodman C. II. Blood Transfusion in Haemophilia. *Ann Surg*. 1910;52(4):457-61.
199. Van Creveld S, Paulssen MM. [Plasma transfusion in hemophilia]. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1950;94(28):2007-14.
200. Bruster H, Glassner K, Riech PC. [Antihemophilic cryoprecipitate from fresh plasma and its use in hemophilia A]. *Dtsch Med Wochenschr*. 1967;92(41):1859-66.
201. Blatrix C. [The PPSB and CSB fractions and their therapeutic use]. *Maroc Med*. 1962;41:545-9.
202. Richter K. [A human plasma fraction (PPSB) enriched with the coagulation factors II, VII, IX and X]. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch*. 1970;93(3):340-3.
203. Loeliger EA, Mattern MJ, Hensen A, Hemker HC. [Treatment of hemophilia B with PPSB]. *Blut*. 1968;16(5):289-97.
204. Mannucci PM, Ruggeri ZM, Pareti FI, Capitanio A. 1-Deamino-8-d-arginine vasopressin: a new pharmacological approach to the management of haemophilia and von Willebrands' diseases. *Lancet*. 1977;1(8017):869-72.
205. Inwood M, Lusher J. Clinical trials of the recombinant factor VIII product, Kogenate. *Transfus Med Rev*. 1992;6(4):261-2.

206. Bray GL. Current status of clinical studies of recombinant factor VIII (recombinate) in patients with hemophilia A. Recombinate Study Group. *Transfus Med Rev.* 1992;6(4):252-5.
207. Nilsson IM, Berntorp E, Lofqvist T, Pettersson H. Twenty-five years' experience of prophylactic treatment in severe haemophilia A and B. *J Intern Med.* 1992;232(1):25-32.
208. van den Berg HM, Fischer K, Mauser-Bunschoten EP, Beek FJ, Roosendaal G, van der Bom JG, et al. Long-term outcome of individualized prophylactic treatment of children with severe haemophilia. *Br J Haematol.* 2001;112(3):561-5.
209. Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia.* 2013;19(1):e1-47.
210. Blanchette VS, Key NS, Ljung LR, Manco-Johnson MJ, van den Berg HM, Srivastava A, et al. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2014;12(11):1935-9.
211. Fischer K, Steen Carlsson K, Petrini P, Holmstrom M, Ljung R, van den Berg HM, et al. Intermediate-dose versus high-dose prophylaxis for severe hemophilia: comparing outcome and costs since the 1970s. *Blood.* 2013;122(7):1129-36.
212. Fischer K, Collins PW, Ozelo MC, Srivastava A, Young G, Blanchette VS. When and how to start prophylaxis in boys with severe hemophilia without inhibitors: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2016;14(5):1105-9.
213. Voyer A, Roussel B, Machu-Prestaux N, Dieval J, Guillaume N, Lefrère J-J. Le point sur les médicaments d'origine plasmatisque dans le traitement des maladies hémorragiques et des maladies thrombotiques. *Hématologie.* 2005;11(3):189-200.
214. Fischer K, Ljung R. Primary prophylaxis in haemophilia care: Guideline update 2016. *Blood Cells Mol Dis.* 2017.
215. Rouzioux C, Chamaret S, Montagnier L, Carnelli V, Rolland G, Mannucci PM. Absence of antibodies to AIDS virus in haemophiliacs treated with heat-treated Factor VIII concentrate. *Lancet.* 1985;1(8423):271-2.
216. Colombo M, Mannucci PM, Carnelli V, Savidge GF, Gazengel C, Schimpf K. Transmission of non-A, non-B hepatitis by heat-treated factor VIII concentrate. *Lancet.* 1985;2(8445):1-4.
217. Horowitz MS, Rooks C, Horowitz B, Hilgartner MW. Virus safety of solvent/detergent-treated antihemophilic factor concentrate. *Lancet.* 1988;2(8604):186-9.
218. Josic D, Schwinn H, Stadler M, Strancar A. Purification of factor VIII and von Willebrand factor from human plasma by anion-exchange chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1994;662(2):181-90.
219. Schwartz RS, Abildgaard CF, Aledort LM, Arkin S, Bloom AL, Brackmann HH, et al. Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of hemophilia A. recombinant Factor VIII Study Group. *N Engl J Med.* 1990;323(26):1800-5.

220. Fukui H, Yoshioka A, Shima M, Tanaka I, Koshihara K, Fukutake K, et al. Clinical evaluation of recombinant human factor VIII (BAY w 6240) in the treatment of hemophilia A. *Int J Hematol.* 1991;54(5):419-27.
221. Pittman DD, Marquette KA, Kaufman RJ. Role of the B domain for factor VIII and factor V expression and function. *Blood.* 1994;84(12):4214-25.
222. Pittman DD, Alderman EM, Tomkinson KN, Wang JH, Giles AR, Kaufman RJ. Biochemical, immunological, and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII. *Blood.* 1993;81(11):2925-35.
223. Meulien P, Faure T, Mischler F, Harrer H, Ulrich P, Bouderbala B, et al. A new recombinant procoagulant protein derived from the cDNA encoding human factor VIII. *Protein Eng.* 1988;2(4):301-6.
224. Leyte A, van Schijndel HB, Niehrs C, Huttner WB, Verbeet MP, Mertens K, et al. Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 1991;266(2):740-6.
225. Eaton DL, Wood WI, Eaton D, Hass PE, Hollingshead P, Wion K, et al. Construction and characterization of an active factor VIII variant lacking the central one-third of the molecule. *Biochemistry.* 1986;25(26):8343-7.
226. Esmon PC, Kuo HS, Fournel MA. Characterization of recombinant factor VIII and a recombinant factor VIII deletion mutant using a rabbit immunogenicity model system. *Blood.* 1990;76(8):1593-600.
227. Eriksson RK, Fenge C, Lindner-Olsson E, Ljungqvist C, Rosenquist J, Smeds AL, et al. The manufacturing process for B-domain deleted recombinant factor VIII. *Semin Hematol.* 2001;38(2 Suppl 4):24-31.
228. Courter SG, Bedrosian CL. Clinical evaluation of B-domain deleted recombinant factor VIII in previously untreated patients. *Semin Hematol.* 2001;38(2 Suppl 4):52-9.
229. Courter SG, Bedrosian CL. Clinical evaluation of B-domain deleted recombinant factor VIII in previously treated patients. *Semin Hematol.* 2001;38(2 Suppl 4):44-51.
230. Sandberg H, Almstedt A, Brandt J, Gray E, Holmquist L, Oswaldsson U, et al. Structural and functional characteristics of the B-domain-deleted recombinant factor VIII protein, r-VIII SQ. *Thromb Haemost.* 2001;85(1):93-100.
231. Kelley B, Jankowski M, Booth J. An improved manufacturing process for Xyntha/ReFacto AF. *Haemophilia.* 2010;16(5):717-25.
232. Christiansen ML, Balling KW, Persson E, Hilden I, Bagger-Sorensen A, Sorensen BB, et al. Functional characteristics of N8, a new recombinant FVIII. *Haemophilia.* 2010;16(6):878-87.
233. Viuff D, Barrowcliffe T, Saugstrup T, Ezban M, Lillicrap D. International comparative field study of N8 evaluating factor VIII assay performance. *Haemophilia.* 2011;17(4):695-702.

234. Lissitchkov T, Hampton K, von Depka M, Hay C, Rangarajan S, Tuddenham E, et al. Novel, human cell line-derived recombinant factor VIII (human-cl rhFVIII; Nuwiq(R) ) in adults with severe haemophilia A: efficacy and safety. *Haemophilia*. 2015.
235. Garger S, Severs J, Regan L, Hesslein A, Ignowski J, Wu P, et al. BAY 81-8973, a full-length recombinant factor VIII: manufacturing processes and product characteristics. *Haemophilia*. 2017;23(2):e67-e78.
236. Shapiro AD. Long-lasting recombinant factor VIII proteins for hemophilia A. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:37-43.
237. Chowdary P, Fosbury E, Riddell A, Mathias M. Therapeutic and routine prophylactic properties of rFactor VIII Fc (efraloctocog alfa, Eloctate(R)) in hemophilia A. *J Blood Med*. 2016;7:187-98.
238. Mahlangu J, Kuliczowski K, Karim FA, Stasyshyn O, Kosinova MV, Lepatan LM, et al. Efficacy and safety of rVIII-SingleChain: results of a phase 1/3 multicenter clinical trial in severe hemophilia A. *Blood*. 2016;128(5):630-7.
239. Bensen-Kennedy D. Bringing new therapy options to the hemophilia community. *Thromb Res*. 2013;131 Suppl 2:S15-8.
240. Schmidbauer S, Witzel R, Robbel L, Sebastian P, Grammel N, Metzner HJ, et al. Physicochemical characterisation of rVIII-SingleChain, a novel recombinant single-chain factor VIII. *Thromb Res*. 2015;136(2):388-95.
241. Delignat S, Repesse Y, Navarrete AM, Meslier Y, Gupta N, Christophe OD, et al. Immunoprotective effect of von Willebrand factor towards therapeutic factor VIII in experimental haemophilia A. *Haemophilia*. 2012;18(2):248-54.
242. Sorvillo N, Hartholt RB, Bloem E, Sedek M, ten Brinke A, van der Zwaan C, et al. von Willebrand factor binds to the surface of dendritic cells and modulates peptide presentation of factor VIII. *Haematologica*. 2016;101(3):309-18.
243. Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(3):214-21.
244. Drager D, Patarroyo-White S, Chao H, Ismail A, Liu J, Holthaus AM, et al. Recombinant FVIII-Fc-VWF-XTEN Demonstrates Significant Bioavailability Following Subcutaneous Administration in Hemophilia A Mice. *Am Soc Hematology*; 2015.
245. Podust VN, Sim BC, Kothari D, Henthorn L, Gu C, Wang CW, et al. Extension of in vivo half-life of biologically active peptides via chemical conjugation to XTEN protein polymer. *Protein Eng Des Sel*. 2013;26(11):743-53.
246. Gringeri A, Mantovani LG, Scalone L, Mannucci PM, Group CS. Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. *Blood*. 2003;102(7):2358-63.

247. Nogami K. A bispecific antibody mimicking factor VIII in hemophilia A therapy. *Rinsho Ketsueki*. 2016;57(6):709-14.
248. Shima M, Hanabusa H, Taki M, Matsushita T, Sato T, Fukutake K, et al. Factor VIII-Mimetic Function of Humanized Bispecific Antibody in Hemophilia A. *N Engl J Med*. 2016;374(21):2044-53.
249. Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B, Schmitt C, Callaghan MU, Young G, et al. Efficacy of Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors. *N Engl J Med*. 2017;377(9):809-18.
250. Lillicrap D. Bispecific Antibody Therapy in Hemophilia. *N Engl J Med*. 2017.
251. Ehrenkranz N, Rubini J, Gunn R, Horsburgh C, Collins T, Hasiba U, et al. Pneumocystis carinii pneumonia among persons with hemophilia A. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 1982;31(2):365-7.
252. Montagnier L, Chermann JC, Barre-Sinoussi F, Klatzmann D, Wain-Hobson S, Alizon M, et al. Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS. *Princess Takamatsu Symp*. 1984;15:319-31.
253. White GC. Hemophilia: an amazing 35-year journey from the depths of HIV to the threshold of cure. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2010;121:61-73; discussion 4-5.
254. Makris M, Preston FE, Rosendaal FR, Underwood JC, Rice KM, Triger DR. The natural history of chronic hepatitis C in haemophiliacs. *Br J Haematol*. 1996;94(4):746-52.
255. Gordon FH, Mistry PK, Sabin CA, Lee CA. Outcome of orthotopic liver transplantation in patients with haemophilia. *Gut*. 1998;42(5):744-9.
256. Eyster ME, Kong L, Li M, Schreiber IR. Long term survival in persons with hemophilia and chronic hepatitis C: 40 year outcomes of a large single center cohort. *Am J Hematol*. 2016;91(9):E335-40.
257. Tabor E. The epidemiology of virus transmission by plasma derivatives: clinical studies verifying the lack of transmission of hepatitis B and C viruses and HIV type 1. *Transfusion*. 1999;39(11-12):1160-8.
258. Zaman SM, Hill FG, Palmer B, Millar CM, Bone A, Molesworth AM, et al. The risk of variant Creutzfeldt-Jakob disease among UK patients with bleeding disorders, known to have received potentially contaminated plasma products. *Haemophilia*. 2011;17(6):931-7.
259. Caballero S, Diez JM, Belda FJ, Otegui M, Herring S, Roth NJ, et al. Robustness of nanofiltration for increasing the viral safety margin of biological products. *Biologicals*. 2014;42(2):79-85.
260. Menconi MC, Maggi F, Zakrzewska K, Salotti V, Giovacchini P, Farina C, et al. Effectiveness of nanofiltration in removing small non-enveloped viruses from three different plasma-derived products. *Transfus Med*. 2009;19(4):213-7.
261. Soucie JM, Cianfrini C, Janco RL, Kulkarni R, Hambleton J, Evatt B, et al. Joint range-of-motion limitations among young males with hemophilia: prevalence and risk factors. *Blood*. 2004;103(7):2467-73.

262. Chai-Adisaksopha C, Nevitt SJ, Simpson ML, Janbain M, Konkle BA. Bypassing agent prophylaxis in people with hemophilia A or B with inhibitors. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;9:CD011441.
263. van den Berg HM, Hashemi SM, Fischer K, Petrini P, Ljung R, Rafowicz A, et al. Increased inhibitor incidence in severe haemophilia A since 1990 attributable to more low titre inhibitors. *Thromb Haemost.* 2016;115(4):729-37.
264. Gouw SC, van der Bom JG, Auerswald G, Ettinghausen CE, Tedgard U, van den Berg HM. Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood.* 2007;109(11):4693-7.
265. Gouw SC, van der Bom JG, Marijke van den Berg H. Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood.* 2007;109(11):4648-54.
266. Santagostino E, Mancuso ME, Rocino A, Mancuso G, Mazzucconi MG, Tagliaferri A, et al. Environmental risk factors for inhibitor development in children with haemophilia A: a case-control study. *Br J Haematol.* 2005;130(3):422-7.
267. Gill JC. The role of genetics in inhibitor formation. *Thromb Haemost.* 1999;82(2):500-4.
268. Aledort LM, Dimichele DM. Inhibitors occur more frequently in African-American and Latino haemophiliacs. *Haemophilia.* 1998;4(1):68.
269. Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J, Astermark J, de Groot PG, Margaglione M, et al. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood.* 2012;119(12):2922-34.
270. d'Oiron R, Pipe SW, Jacquemin M. Mild/moderate haemophilia A: new insights into molecular mechanisms and inhibitor development. *Haemophilia.* 2008;14 Suppl 3:138-46.
271. Boekhorst J, Lari GR, D'Oiron R, Costa JM, Novakova IR, Ala FA, et al. Factor VIII genotype and inhibitor development in patients with haemophilia A: highest risk in patients with splice site mutations. *Haemophilia.* 2008;14(4):729-35.
272. Astermark J, Donfield SM, Gomperts ED, Schwarz J, Menius ED, Pavlova A, et al. The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. *Blood.* 2013;121(8):1446-54.
273. Gouw SC, van den Berg HM, Fischer K, Auerswald G, Carcao M, Chalmers E, et al. Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. *Blood.* 2013;121(20):4046-55.
274. Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V, Vinciguerrat C, Lambert T, Chambost H, et al. Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood.* 2006;107(1):46-51.

275. Iorio A, Halimeh S, Holzhauer S, Goldenberg N, Marchesini E, Marcucci M, et al. Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review. *J Thromb Haemost.* 2010;8(6):1256-65.
276. Aledort LM, Navickis RJ, Wilkes MM. Best evidence on B-domain deletion and the immunogenicity of recombinant factor VIII. *J Thromb Haemost.* 2011;9(11):2325-7.
277. Aledort LM, Navickis RJ, Wilkes MM. Can B-domain deletion alter the immunogenicity of recombinant factor VIII? A meta-analysis of prospective clinical studies. *J Thromb Haemost.* 2011;9(11):2180-92.
278. Gouw SC, van der Bom JG, Ljung R, Escuriola C, Cid AR, Claeysens-Donadel S, et al. Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *N Engl J Med.* 2013;368(3):231-9.
279. Calvez T, Chambost H, Claeysens-Donadel S, d'Oiron R, Goulet V, Guillet B, et al. Recombinant factor VIII products and inhibitor development in previously untreated boys with severe hemophilia A. *Blood.* 2014;124(23):3398-408.
280. Collins PW, Palmer BP, Chalmers EA, Hart DP, Liesner R, Rangarajan S, et al. Factor VIII brand and the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated UK children with severe hemophilia A, 2000-2011. *Blood.* 2014;124(23):3389-97.
281. Enjolras N, Dargaud Y, Perot E, Guillaume F, Becchi M, Negrier C. Human hepatoma cell line HuH-7 is an effective cellular system to produce recombinant factor IX with improved post-translational modifications. *Thromb Res.* 2012;130(5):e266-73.
282. Enjolras N, Perot E, Le Quellec S, Indalecio A, Girard J, Negrier C, et al. In vivo efficacy of human recombinant factor IX produced by the human hepatoma cell line HuH-7. *Haemophilia.* 2015;21(4):e317-21.
283. Parent R, Durantel D, Lahlali T, Salle A, Plissonnier ML, DaCosta D, et al. An immortalized human liver endothelial sinusoidal cell line for the study of the pathobiology of the liver endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;450(1):7-12.
284. Plantier JL, Rodriguez MH, Enjolras N, Attali O, Negrier C. A factor VIII minigene comprising the truncated intron I of factor IX highly improves the in vitro production of factor VIII. *Thromb Haemost.* 2001;86(2):596-603.
285. Kovacsics D, Raper J. Transient expression of proteins by hydrodynamic gene delivery in mice. *J Vis Exp.* 2014(87).
286. Miao CH, Ye X, Thompson AR. High-level factor VIII gene expression in vivo achieved by nonviral liver-specific gene therapy vectors. *Hum Gene Ther.* 2003;14(14):1297-305.
287. Bonamassa B, Hai L, Liu D. Hydrodynamic gene delivery and its applications in pharmaceutical research. *Pharm Res.* 2011;28(4):694-701.
288. Barrow KM, Perez-Campo FM, Ward CM. Use of the cytomegalovirus promoter for transient and stable transgene expression in mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 2006;329:283-94.

289. Mannucci PM. Plasma-derived versus recombinant factor VIII concentrates for the treatment of haemophilia A: plasma-derived is better. *Blood Transfus.* 2010;8(4):288-91.
290. Gringeri A. Factor VIII safety: plasma-derived versus recombinant products. *Blood Transfus.* 2011;9(4):366-70.
291. Grushin K, Miller J, Dalm D, Parker ET, Healey JF, Lollar P, et al. Lack of recombinant factor VIII B-domain induces phospholipid vesicle aggregation: implications for the immunogenicity of factor VIII. *Haemophilia.* 2014;20(5):723-31.
292. Lai J, Hough C, Tarrant J, Lillicrap D. Biological considerations of plasma-derived and recombinant factor VIII immunogenicity. *Blood.* 2017;129(24):3147-54.
293. Haack A, Schmitt C, Poller W, Oldenburg J, Hanfland P, Brackmann HH, et al. Analysis of expression kinetics and activity of a new B-domain truncated and full-length FVIII protein in three different cell lines. *Ann Hematol.* 1999;78(3):111-6.
294. Bacon CL, Singleton E, Brady B, White B, Nolan B, Gilmore RM, et al. Low risk of inhibitor formation in haemophilia A patients following en masse switch in treatment to a third generation full length plasma and albumin-free recombinant factor VIII product (ADVATE(R)). *Haemophilia.* 2011;17(3):407-11.
295. Azuma Y, Murata M, Matsumoto K. Alteration of sugar chains on alpha(1)-acid glycoprotein secreted following cytokine stimulation of HuH-7 cells in vitro. *Clin Chim Acta.* 2000;294(1-2):93-103.
296. Denis CV, Kwack K, Saffaripour S, Maganti S, Andre P, Schaub RG, et al. Interleukin 11 significantly increases plasma von Willebrand factor and factor VIII in wild type and von Willebrand disease mouse models. *Blood.* 2001;97(2):465-72.
297. Nathwani AC, Davidoff AM, Tuddenham EGD. Gene Therapy for Hemophilia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2017;31(5):853-68.
298. Lheriteau E, Davidoff AM, Nathwani AC. Haemophilia gene therapy: Progress and challenges. *Blood Rev.* 2015;29(5):321-8.
299. Miao CH, Thompson AR, Loeb K, Ye X. Long-term and therapeutic-level hepatic gene expression of human factor IX after naked plasmid transfer in vivo. *Mol Ther.* 2001;3(6):947-57.
300. Miao CH. A novel gene expression system: non-viral gene transfer for hemophilia as model systems. *Adv Genet.* 2005;54:143-77.
301. Nguyen AT, Dow AC, Kupiec-Weglinski J, Busuttill RW, Lipshutz GS. Evaluation of gene promoters for liver expression by hydrodynamic gene transfer. *J Surg Res.* 2008;148(1):60-6.
302. Crommelin DJ, Sindelar RD, Meibohm B. *Pharmaceutical biotechnology: fundamentals and applications*: Springer Science & Business Media; 2013.

303. Zhang J, Hu YZ, Xueli L, Li S, Wang M, Kong X, et al. The inhibition of CMV promoter by heat shock factor 4b is regulated by Daxx. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(10):1698-707.
304. Argyros O, Wong SP, Niceta M, Waddington SN, Howe SJ, Coutelle C, et al. Persistent episomal transgene expression in liver following delivery of a scaffold/matrix attachment region containing non-viral vector. *Gene Ther.* 2008;15(24):1593-605.
305. Kay MA, Baley P, Rothenberg S, Leland F, Fleming L, Ponder KP, et al. Expression of human alpha 1-antitrypsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(1):89-93.
306. Kim SI, Shin D, Lee H, Ahn BY, Yoon Y, Kim M. Targeted delivery of siRNA against hepatitis C virus by apolipoprotein A-I-bound cationic liposomes. *J Hepatol.* 2009;50(3):479-88.
307. Suda T, Gao X, Stolz DB, Liu D. Structural impact of hydrodynamic injection on mouse liver. *Gene Ther.* 2007;14(2):129-37.

L'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon et L'Université Claude Bernard Lyon I n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses : ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

**JACQUELINE Vladimir**

**Utilisation d'une séquence d'ADN complémentaire améliorée, codant pour un Facteur VIII recombinant, sur des modèles hépatiques *in vitro* et *in vivo*.**

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2017

## **RESUME**

L'hémophilie A est la pathologie hémorragique d'origine génétique la plus fréquente. Le traitement repose sur l'injection de concentrés de Facteur VIII (FVIII) et comporte un risque important de développement d'anticorps inhibiteurs compliquant la prise en charge.

Le FVIII est soumis à de nombreuses modifications post-traductionnelles garantant sa structure et sa fonction, étroitement liées à l'arsenal enzymatique de la cellule productrice, donc liée à l'origine cellulaire. Ces modifications pourraient également être liées au risque d'apparition d'anticorps inhibiteurs contre des épitopes post-traductionnels non humains.

L'objectif de ce travail était de créer un nouveau modèle cellulaire, d'origine humaine et hépatique (Huh7), dédié à la production de FVIII recombinant, visant à minimiser les différences entre ce nouveau FVIII recombinant et le FVIII humain plasmatique.

Dans un premier temps, nous avons établi une lignée cellulaire clonale, hépatique et humaine, capable de produire le FVIII après transfection par une séquence complémentaire optimisée. Cette séquence a été brevetée par le laboratoire et permet, par l'insertion d'introns spécifiques, d'augmenter les taux de sécrétion du FVIII.

Dans un second temps, nous avons caractérisé le FVIII codé par cette séquence complémentaire après injection hydrodynamique de souris hémophiles A. Nous avons ainsi pu entamer les étapes de caractérisation de la protéine produite par les hépatocytes murins. L'activité de la protéine a ainsi été démontrée *in vivo* validant l'intérêt de cette séquence dans la production de FVIII recombinant. La capacité de sécrétion augmentée a également été démontrée sur le nouveau modèle cellulaire hépatique.

De plus amples explorations des modifications post-traductionnelles du FVIII ainsi produit pourraient permettre la caractérisation d'un FVIII recombinant plus fidèle au FVIII humain, que ne le sont les FVIII recombinants commerciaux, produits sur des cellules mammaliennes.

## **MOTS CLES**

Hémophilie A  
Facteur VIII  
Facteur VIII recombinant  
Injection hydrodynamique

## **JURY**

Mme Christine VINCIGUERRA, Professeur

Mr Claude NEGRIER, Professeur

Mme Pascale GAUSSEM, Professeur

Mr Christophe NOUGIER, Docteur en Pharmacie

Mme Nathalie ENJOLRAS, Docteur en Biologie

## **DATE DE SOUTENANCE**

Lundi 23 octobre 2017

## **ADRESSE DE L'AUTEUR**

13, rue Mercière, 69002 LYON