

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : « Biologie cellulaire »

Par

Marie CADÉ

« Rôles extra-coagulants du FVIII sur les cellules endothéliales et les monocytes dans un contexte d'hémophilie A »

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 25/02/2021

Unité de recherche : INSERM UMR 1232

Rapporteurs avant soutenance :

Annabelle Dupont PU-PH, CHRU Lille
Olivier Christophe DR2, Le Kremlin Bicêtre

Composition du Jury :

Président : Fabrice Fleury
Examineurs : Catherine Boisson-Vidal
 Annabelle Dupont
 Olivier Christophe

PU, Université de Nantes
DR, Faculté de Pharmacie Paris-Descartes
PU-PH, CHRU Lille
DR2, Le Kremlin Bicêtre

Dir. de thèse : Dominique Heymann

PU-PH, Université de Nantes

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord aux membres de mon jury de soutenance pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci aux Docteurs Annabelle DUPONT et Catherine BOISSON-VIDAL, et au Docteurs Olivier CHRISTOPHE et Fabrice FLEURY.

Je remercie également Marc GREGOIRE pour m'avoir accueilli au sein du Centre de Cancérologie et d'Immunologie Nantes Angers, Mario CAMPONE pour m'avoir accueillie au sein de l'Institut de Cancérologie de l'Ouest, et François VALETTE de m'avoir accueillie au sein de l'équipe 9.

Je remercie Frederic LEZOT et Catherine BOISSON-VIDAL pour avoir fait partie de mon comité de suivi, et pour avoir été autant à l'écoute. Un merci particulier à Catherine et Anna LOKAJCZYK, et le laboratoire Inserm UMR_S 1140 pour m'avoir accueillie, formée et aidée pour les expérimentations de flux. C'était une expérience très enrichissante entourée de personne bienveillante.

Un merci tout particulier à Dominique HEYMANN de m'avoir soutenue durant ces trois années intenses. Merci d'avoir supporté et atténué mon stress quand cela était nécessaire (c'est-à-dire très souvent !). Merci pour ta disponibilité et ta patience, pour tes réponses tard le soir et même les week-ends ! J'ai eu la chance d'avoir un mentor avec de super qualités managériales.

Durant toutes ces années, j'ai eu l'immense honneur et chance d'avoir été entourée de personnes incroyables et formidables, que je tiens à tous remercier infiniment.

Je voudrais remercier du fond du cœur Camille, ma petite Jubjub, mon Dobby préféré !! Merci pour tous ces bons moments, pour ton aide, ton soutien sans faille et ton humour ravageur. Merci d'avoir chanté et dansé avec moi en culture, d'avoir claqué d'encouragement mon doux fessier et de m'avoir fait tant rire. Merci pour les soirées jeux, les escapes game, et ces petites balades à vélo avec cette chute mémorable ! (Quoi ? Quelle chute ?) Merci de me répondre même à 23h : « Camille au secours le cytomètre fait des trucs bizarre !!! ». Sans toi ça n'aurait pas été drôle, je suis heureuse de t'avoir rencontrée. Désolée, tu ne te débarrasseras pas de moi comme ça !!

Merci également à Josy et Manon D pour tout le soutien, les fous rires, les chansons, les conneries (je ne vois pas de quoi vous voulez parler). Merci également à Adrien, merci d'aimer les Simpson autant que moi et de connaître Nigloland, tu as été mon seul soutien face à tous ces ignorants ! Aurélie, merci pour ton écoute et ton soutien, et je me souviendrai longtemps de la super soirée d'Halloween et de l'escape game qu'on a gagné ensemble haut la main ! Et Florestan bien sur, élu meilleur pâtissier du LabCT, merci à vous pour tous les bons moments que je ne pourrais pas citer tellement ils sont nombreux. Merci également à Delphine C., Julien (mon premier Pioupiou !!), et Raphaël pour les soirées aux bars (on espère pouvoir y retourner bientôt tous ensemble). Merci aussi à Marion, ma super Noufnouf, sans qui je n'aurais pas réussi à courir 5km pour l'Odyssée ! Merci pour ces soirées karaokés métal de fou, à chanter avec des brosse à cheveux ! Merci aussi à Manon P., Nolwenn et à Nina pour votre bienveillance et les franches rigolades. Merci à vous tous, sans tout le soutien qu'on s'apporte les uns les autres, la thèse serait bien moins fun et bien plus difficile. Ne changez rien. Vous êtes tous géniaux, et je suis très heureuse d'avoir passé ces 3 années en votre super compagnie.

Je remercie bien évidemment Denis, qui a dû me supporter tout seul pendant une bien longue période ! Merci d'avoir géré toutes les commandes et d'avoir eu la patience de répondre à la plupart des « Deniiiiiiiiis, j'ai une questiooooooon ». Merci aussi à Ahlem, mon soutien technique spécial Western Blot super puissante, et spécial aliquotage, tu as été au top ! Merci aussi à Javier, pour ton aide avec les souris, pour ton humour à toute épreuve et ta bienveillance. Merci également à Emilie, et à Antoine B. l'hémostasien qui m'a bien aidée pour les questions cliniques ! Merci aussi à toi pour GraphPad Prism et surtout Telegram (Chuuuut...) !

Cette expérience de thèse m'a permis de faire la rencontre d'une folle dingue extraordinaire, j'ai nommé la douce Judith L. ! Mon rayon de soleil et également un soutien hors pair. Merci pour tous ces bons moments autour de la machine xCELLigence, pour les après-midi et soirée ensemble, et les repas. Merci d'être une amie aussi fun, aimante et à l'écoute. Merci d'avoir été là pendant les hauts et les bas de cette expérience folle qu'est la thèse, merci d'avoir répondu à mes questions, mes inquiétudes et d'avoir toujours cru en moi.

Je remercie également tous mes amis, mes Jambons préférés qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager depuis maintenant plus de 8ans. Vous êtes les meilleurs du monde, tout simplement. Merci à ma Céciloute, pour ta douceur et ton écoute, pour les soirées

grimpes et pour les superbes chansons de « un jour, une chanson » qui m'ont redonné le sourire dans les moments les plus difficiles. Un merci magistral et tonitruant à ma super Leïla, mon pilulier d'amour infailible, qui a été un énorme soutien encore plus important à la fin de l'aventure. Merci d'avoir toujours su trouver les mots justes, d'avoir réussi à me booster quand j'étais au plus bas, d'avoir su me faire rire, d'avoir teint mes cheveux et d'avoir joué du ukulélé avec moi. Merci d'être la meilleure voisine du monde, et d'être une amie aussi dévouée. Merci également à Nadia et Mourad, pour le délicieux couscous, pour tous vos conseils et votre bienveillance infini. Vous m'avez été d'une grande aide.

Merci aussi à Guillaume, ma besta, mon gros Guigui. Merci pour ces week-ends Limogiens et Nantais, pour ton soutien et évidemment pour tes encouragements à l'escalade (évidemment je préfère les fois où tu pestes, sinon ce n'est pas drôle). Merci de m'avoir supportée et soutenue ces 10 dernières années (déjà 10 ans... Damn...), de m'avoir nourrie avec de délicieux gâteaux et repas. Merci pour ta générosité et ton foutage de gueule.

Je remercie ma maman, qui a toujours cru en moi quand je lui disais « un jour j'aurai une blouse et ce sera marqué Dr. Cadé ». Ca y est, c'est fait. Merci pour ton soutien, ton amour et ta confiance depuis toujours. Merci à ma sœur Lauren, pour tes supers massages, ton soutien et ta confiance également. Tu es ma sœur préférée (lol j'en ai qu'une, quelle bonne blague). Merci également à mon papa pour sa confiance, et pour m'avoir donné des conseils de « comment gérer son stress ? », merci à mes frères Théo et Valentin, et l'ensemble de ma famille (ainsi que Christophe mon parrain) de m'avoir soutenue et encouragée dans cette épreuve et depuis toujours.

Et pour finir, le meilleur pour la fin, je remercie Matthieu, mon compagnon et mon ami, sans qui je n'aurais probablement pas réussi tout ça. Merci d'avoir été là pour moi, d'avoir été mon pilier, de m'avoir lu One Piece, de m'avoir massé de noooooombreuse fois les épaules. Merci d'avoir cru en moi, et de m'accompagner dans la vie depuis 5 ans. Merci pour ton aide au quotidien, pour ton soutien et ton amour.

TABLE DES MATIERES

Introduction

CHAPITRE 1 : L'HEMOSTASE	14
I. ETAPES INITIALES DE L'HEMOSTASE.....	14
II. L'HEMOSTASE SECONDAIRE : COAGULATION.....	22
III. LE CONTROLE DE L'HEMOSTASE ET LA FIBRINOLYSE	28
CHAPITRE 2 : LES FACTEURS DE COAGULATION : FVIII ET VWF	31
I. LE FACTEUR DE COAGULATION VIII.....	31
II. LE FACTEUR DE VON WILLEBRAND.....	64
III. LES DIFFERENTS ROLES HEMOSTATIQUES DU FVIII ET DU VWF	76
CHAPITRE 3 : LES DIFFERENTS TROUBLES DE LA COAGULATION.....	82
I. DEFICITS RARES DE LA COAGULATION	82
II. LA MALADIE DE VON WILLEBRAND	89
III. LES HEMOPHILIES A ET B.....	96
CHAPITRE 4 : L'HEMOPHILIE A	99
I. HEMOPHILIE A : MALADIE GENETIQUE	99
II. MANIFESTATIONS CLINIQUES	105
III. PRISE EN CHARGE DE L'HEMOPHILIE A.....	108
IV. CAS PARTICULIER : L'HEMOPHILIE A ACQUISE	119
OBJECTIFS DE LA THESE.....	120

Matériels et Méthodes

I. CULTURE CELLULAIRE	123
II. TEST D'ADHERENCE VIA LE SYSTEME XCELLIGENCE	124
III. FORMATION DE TUBES VASCULAIRE <i>IN VITRO</i>	126
IV. RNA-SEQUENCING ET MIRNA MICROARRAY	126
V. TRANSMIGRATION MONOCYTAIRE A TRAVERS UN ENDOTHELIUM DE CELLULES HUVEC.....	127

VI.	ADHERENCE DE MONOCYTES SUR UN ENDOTHELIUM DE CELLULES HUVEC EN CONDITION DE FLUX.....	128
VII.	PROFIL PROTEIQUE DES CELLULES HUVEC.....	131
VIII.	TEST DE PERMEABILITE D'UN ENDOTHELIUM DE CELLULES HUVEC.....	132
IX.	ANALYSES DU CYTOSQUELETTE A L'AIDE D'UNE PUCE CYTOO™ CROSSBOW.....	132
X.	EXPRESSION DE ZO-1 A L'AIDE D'UNE PUCE CYTOO™ ARENA.....	134
XI.	WESTERN BLOT.....	135
XII.	CYTOMETRIE EN FLUX : MESURE DE L'EXPRESSION D'ICAM-1.....	135
XIII.	TEST DE MIGRATION.....	135
XIV.	METHODES D'ANALYSES ET TESTS STATISTIQUES.....	136
	TEST D'ADHERENCE VIA LE SYSTEME XCELLIGENCE.....	136
	FORMATION DE TUBES VASCULAIRE <i>IN VITRO</i>	137
	RNA-SEQUENCING ET MIRNA MICROARRAY.....	137
	TRANSMIGRATION MONOCYTAIRE.....	137
	ADHERENCE DE MONOCYTES SUR UN ENDOTHELIUM DE CELLULES HUVEC EN CONDITION DE FLUX.....	137
	ANALYSE DU PROFIL PROTEIQUE.....	139
	PERMEABILITE ENDOTHELIUM.....	139
	ANALYSE DU CYTOSQUELETTE (PUCE CYTOO™ CROSSBOW).....	140
	EXPRESSION DE LA PROTEINE ZO-1 (PUCE CYTOO™ ARENA).....	141
	WESTERN BLOT.....	141
	EXPRESSION ICAM1 PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	141
	TEST DE MIGRATION.....	142

Résultats

CHAPITRE 1 : EFFETS DU FVIII R SUR LES CELLULES ENDOTHELIALES.....	144
I. EFFET DU FVIII SUR L'ADHERENCE DES CELLULES ENDOTHELIALES.....	144
II. LE FVIII R MODIFIE LE TRANSCRIPTOME DES CELLULES HUVEC, MAIS PAS LE MIROME.....	146
III. LE FVIII R MODIFIE PROFIL PROTEIQUE DES CELLULES HUVEC.....	159
CHAPITRE 2 : IMPACT FONCTIONNEL DU FVIII R SUR LES CELLULES ENDOTHELIALES.....	166
IV. LE FVIII R INDUIT LA TUBULOGENESE DES ECFC.....	166
V. EFFET DU FVIII R SUR LA MIGRATION DES CELLULES ENDOTHELIALES.....	167
VI. EFFETS DU FVIII R SUR LE CYTOSQUELETTE.....	169

CHAPITRE 3 : EFFETS DU FVIIIr SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE (VIA L'ENDOTHELIUM) 174

I. LE FVIIIr AUGMENTE LE « ROULEMENT » ET L'ADHERENCE DES MONOCYTES SUR UN ENDOTHELIUM DE CELLULES HUVEC EN CONDITION DE FLUX..... 174

II. LE FVIIIr SEMBLE AUGMENTER LA PERMEABILITE VASCULAIRE 179

III. LE FVIIIr AUGMENTE LA TRANSMIGRATION DES MONOCYTES A TRAVERS UN ENDOTHELIUM D'HUVEC 183

Discussion

ANGIOGENESE, MIGRATION ET ADHERENCE CELLULAIRE 186

ANGIOGENESE ET MIGRATION 186

ADHERENCE CELLULAIRE 187

ADHERENCE FOCALE ET CYTOSQUELETTE D'ACTINE 188

LE SYSTEME IMMUNITAIRE : RECRUTEMENT LEUCOCYTAIRE 194

PERMEABILITE DE L'ENDOTHELIUM..... 194

ADHERENCE ET TRANSMIGRATION LEUCOCYTAIRE 194

RECEPTEURS POTENTIELS INDUISANT UNE SIGNALISATION 197

PERSPECTIVES 201

DANS LE CONTEXTE DE L'HEMOPHILIE A 204

SYSTEME OSSEUX 204

SYSTEME IMMUNITAIRE 206

SYSTEME VASCULAIRE..... 207

CONCLUSION 208

Annexes

ANNEXE 1 : REVUE SOUMISE A PUBLICATION 211

ANNEXE 2 : LISTE DES PUBLICATIONS..... 240

ANNEXE 3 : LISTE DES COMMUNICATIONS..... 241

Références

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : IMAGE DE MEGACARYOCYTE HUMAIN OBSERVE PAR MICROSCOPIE A FLUORESCENCE.....	16
FIGURE 2 : SCHEMATISATION DE L'ACTIVATION PLAQUETTAIRE.....	21
FIGURE 3 : SCHEMATISATION DE LA CASCADE DE COAGULATION.....	26
FIGURE 4 : STRUCTURE DU GENE F8 ET TRANSCRIPTION.....	32
FIGURE 5 : STRUCTURE ET DEVENIR DU FVIII.....	41
FIGURE 6 : SCHEMATISATION DE L'ACTIVATION ET DE L'ACTIVITE DU FVIII.....	53
FIGURE 7 : STRUCTURE DE LA PROTEINE VWF.....	70
FIGURE 8 : FREQUENCE DES TYPES DE MUTATION DU GENE F8.....	101
FIGURE 9 : CONSEQUENCE DES MUTATIONS PONCTUELLES DANS L'HEMOPHILIE A.....	102
FIGURE 10 : INVERSION INTRA-CHROMOSOMIQUE DE F8 RESPONSABLE DE FORME SEVERE D'HEMOPHILIE A.....	104
FIGURE 11 : LE SYSTEME XCELLIGENCE RTCA.....	125
FIGURE 12 : MONTAGE DE LA CHAMBRE SOUS FLUX ET CHAMPS MICROSCOPIQUE.....	130
FIGURE 13 : ANALYSES EFFECTUEES SUR LA PUCE CYTOO™ CROSSBOW.....	133
FIGURE 14 : PUCES CYTOO™ ARENA.....	134
FIGURE 15 : EFFET DU FVIIIr OU NATIF SUR L'ADHERENCE DES CELLULES HUVEC VIA LE SYSTEME XCELLIGENCE.....	145
FIGURE 16 : LE FVIIIr, MAIS PAS L'OPGR ET LE VWFR, MODIFIE LE TRANSCRIPTOME DES CELLULES HUVEC.....	147
FIGURE 17 : LE FVIIIr MODIFIE L'EXPRESSION DE 563 GENES DES CELLULES HUVEC.....	149
FIGURE 18 : ANALYSE FONCTIONNELLE DE L'IMPACT DU FVIIIr SUR LES CELLULES HUVEC.....	152
FIGURE 19 : ANALYSE FONCTIONNELLE DU CLUSTER 1.....	153
FIGURE 20 : ANALYSE FONCTIONNELLE DU CLUSTER 2.....	154
FIGURE 21 : ANALYSE FONCTIONNELLE DU CLUSTER 3.....	155
FIGURE 22 : ANALYSE FONCTIONNELLE DU CLUSTER 4.....	156
FIGURE 23 : ANALYSE FONCTIONNELLE DU CLUSTER 5.....	157
FIGURE 24 : LE FVIII NE MODIFIE PAS LE MIROME SUR LES CELLULES HUVEC.....	158
FIGURE 25 : LE FVIIIr AUGMENTE L'EXPRESSION D'ICAM1 A LA SURFACE DES CELLULES HUVECS.....	159
FIGURE 26 : SCHEMA EXPLIQUANT LA LECTURE DES RESULTATS OBTENUS LORS DE L'ANALYSE DU PROFIL PROTEIQUE.....	160
FIGURE 27 : LE FVIII A 20 UI/ML MODIFIE LE PROFIL PROTEIQUE DES CELLULES HUVEC.....	161
FIGURE 28 : LE FVIII A 10 UI/ML MODIFIE LE PROFIL PROTEIQUE DES CELLULES HUVEC.....	162
FIGURE 29 : LE FVIII A 5 UI/ML MODIFIE LE PROFIL PROTEIQUE DES CELLULES HUVEC.....	163
FIGURE 30 : LE FVIII A 2,5 UI/ML MODIFIE LE PROFIL PROTEIQUE DES CELLULES HUVEC.....	164
FIGURE 31 : LE FVIIIr INDUIT LA TUBULOGENESE DES ECFC IN VITRO.....	166
FIGURE 32 : EFFET DU FVIIIr SUR LA MIGRATION DES CELLULES HUVEC.....	168
FIGURE 33 : LE FVIIIr INDUIT LA PHOSPHORYLATION DE FAK DES CELLULES HUVEC.....	169
FIGURE 34 : LE FVIIIr MODIFIE L'ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE.....	171

FIGURE 35 : LE FVIIIr MODIFIE LA PHOSPHORYLATION DE LA PAXILLINE	173
FIGURE 36 : LE FVIIIr AUGMENTE LE « ROULEMENT » DES MONOCYTES SUR UN ENDOTHELIUM DE CELLULES HUVEC	175
FIGURE 37 : LE FVIIIr AUGMENTE L'ADHERENCE ET LA VITESSE D'ADHERENCE DES MONOCYTES SUR UN ENDOTHELIUM DE CELLULES HUVEC.....	176
FIGURE 38 : LE FVIIIr AUGMENTE L'ADHERENCE DES MONOCYTES SUR UN ENDOTHELIUM DE CELLULES HUVEC	177
FIGURE 39 : LE FVIIIr NE MODIFIE PAS LA FORCE D'ADHERENCE DES MONOCYTES SUR UN ENDOTHELIUM DE CELLULES HUVEC	178
FIGURE 40 : LE FVIIIr AUGMENTE LA PERMEABILITE D'UN ENDOTHELIUM D'HUVEC	180
FIGURE 41 : LE FVIIIr DIMINUE L'EXPRESSION DE ZO-1 A LA SURFACE D'HUVEC FORMANT UN ENDOTHELIUM.	182
FIGURE 42 : LE FVIIIr AUGMENTE LA TRANSMIGRATION MONOCYTAIRE A TRAVERS UN ENDOTHELIUM D'HUVEC	184
FIGURE 43 : ÉLÉMENTS STRUCTURAUX DE LA CELLULE EN MIGRATION.	190
FIGURE 44 : SCHEMA REPRESENTANT LE CYCLE MIGRATOIRE	192
FIGURE 45 : LES RECEPTEURS DE CLAIRANCES DU FVIII	199
FIGURE 46 : SCHEMA RECAPITULANT L'ENSEMBLE DES EFFETS DU FVIIIr RESULTANT DES TRAVAUX IN VITRO REALISES	203

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : PRINCIPAUX MEDIATEURS DE LA VASOCONSTRICTION ASSOCIES A L'HEMOSTASE	15
TABLEAU II : PRINCIPAUX COMPOSANTS DES A-GRANULES ET GRANULES DENSES DES PLAQUETTES	17
TABLEAU III : PRINCIPAUX RECEPTEURS PLAQUETTAIRES IMPLIQUES DANS L'HEMOSTASE	17
TABLEAU IV : LES FACTEURS DE COAGULATION.....	23
TABLEAU V: TAILLE DES EXONS (PAIRE DE BASE) ET DES INTRONS (KILO PAIRE DE BASE) COMPOSANT LE GENE F8.....	33
TABLEAU VI : FACTEURS DE TRANSCRIPTION POTENTIELS DU GENE F8.....	37
TABLEAU VII: TAILLE DES EXONS ET DES INTRONS (EN PAIRES DE BASES) COMPOSANT LE GENE VWF	66
TABLEAU VIII: CLASSIFICATION DE LA MALADIE DE VON WILLEBRAND	89
TABLEAU IX : LES DIFFERENTES FORMES DE L'HEMOPHILIE A.....	100
TABLEAU X : SCHEMA THERAPEUTIQUE DE LA PROPHYLAXIE PRECOCE ET PROGRESSIVEMENT INTENSIFIE	112
TABLEAU XI : RECAPITULATIF DES TRAITEMENTS DE L'HEMOPHILIE A	118
TABLEAU XII : DIFFERENCE ENTRE LE MILIEU EGM2 ET LE MILIEU EBM2.....	124
TABLEAU XIII : LISTES DES CIBLES ANALYSEES POUR ETUDIER LE PROFIL PROTEIQUE DES CELLULES HUVEC	131
TABLEAU XIV : LISTE DES GENES SUR-EXPRIMES ET SOUS-EXPRIMES APRES TRAITEMENT AU FVIIIr AVEC UN TAUX DE MODIFICATION D'AU MOINS 2.....	150
TABLEAU XV : LES RECEPTEURS INTERAGISSANT AVEC LE FVIII	200

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide Aminé	EGM2 : Endothelial Growth Medium 2
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire	EPCR : Endothelial Protein C Receptor
ADP : Adénosine Diphosphate	F5F8D : Déficit combiné en facteurs V et VIII
AF : Adhérences Focales	FLT1 : Fms-Like Tyrosine Kinase 1
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché	FT : Facteur Tissulaire
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique	FV : Facteur V
aPC : activated Protein C	FVIII : Facteur VIII
ARNm : Acide Ribonucléique messenger	FVIII:C : Facteur VIII Coagulant
ASGPR : Asialoglycoprotein Receptor	FVIIIr : FVIII recombinant
ASOR : ASGPR-antagonist asialo-orosomucoid	GITRL : Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor-Ligand
α SMA : α -Smooth Muscle Actin	GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
ATP : Adénosine Triphosphate	GMPc : Guanosine Monophosphate cyclique
AvWS : Acquired von Willebrand Syndrome	HAP40 : Huntingtin-Associated Protein 40
BHK : Baby Hamster Kidney	HDLEC : Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells
BiP : Binding-immunoglobulin Protein	HEK : Human Embryonic Kidney
CD109 : Cluster of Differentiation 109	HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2
CD137L : Cluster of Differentiation 137 Ligand	HEV : High Endothelial Veinules
CD141 : Cluster of Differentiation 141	HGF : Hepatocyte Growth Factor
CD144 : Cluster of Differentiation 144	HLA-1 : Histocompatibility Antigen, alpha chain 1
CD146 : Cluster of Differentiation 146	HLA-2 : Histocompatibility Antigen, alpha chain 2
CD29 : Cluster of Differentiation 29	HLA-E : Histocompatibility Antigen, alpha chain E
CD31 : Cluster of Differentiation 31	HNF : Hepatocyte Nuclear Factor
CD36 : Cluster of Differentiation 36	HSPG : Heparan-Sulfate Proteoglycan
CD39 : Cluster of Differentiation 39	HVEM : Herpesvirus Entry Mediator
CD55 : Cluster of Differentiation 55	ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1
CD58 : Cluster of Differentiation 58	IFN- γ : Interféron γ
CD59 : Cluster of Differentiation 59	IFNGR1 : Interferon Gamma Receptor 1
CEBP : CCAAT Enhancer-Binding Protein	IL : Interleukine
CHO : Chinese Hamster Ovary	IL1R1 : Interleukin 1 Receptor, type I
CLEC4M : C-type Lectin domain family 4 member M	IP3 : Inositol 1,4,5-triphosphate
CTHRC1 : Collagen Triple-Helix Repeat-Containing 1	Inv1 : Inversion de l'intron 1
CalDAG-GEFI : Calcium and Diacylglycerol regulated Guanine nucleotide Exchange Factor I	Inv22 : Inversion de l'intron 22
DAG : 1,2-Diacylglycérol	IP : prostacyclin receptor
DDAVP : 1-Désamino-8-D-Arginine Vasopressine	ITI : Immune Tolerance Induction
DRC : Déficits Rares de la Coagulation	JAM-1 : Junctional Adhesion Molecule 1
E-Sel : E-Sélectine	KDR : Kinase Insert Domain Receptor
EBM2 : Endothelial Basal Medium 2	

Kcat : Constante catalytique
 Kd : Constante de dissociation
 Km : Constante de Mickaelis
 LDL : Lipoprotéine de faible densité
 LDLR : Low Density Lipoprotein-Receptor
 LEC : Lymphatic Endothelial Cell
 LMAN1 : Lectin, Mannose-Binding 1
 LOX1 : Lectin-like Oxidized low-density lipoprotein receptor-1
 LPS : Lipopolysaccharide
 LRP1 : Low density lipoprotein - Receptor-related Protein 1
 LSEC : Cellules Endothéliales Sinusoïdales hépatiques
 M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor
 MCFD2 : Multiple Coagulation Factor Deficiency 2
 MEC : Matrice Extracellulaire
 miARN : micro ARN
 MICA : MHC class I polypeptide-related sequence A
 MICB : MHC class I polypeptide-related sequence B
 MMP-9 : Matrix Metallopeptidase 9
 MMP14 : Matrix Metalloproteinase-14
 MSC : Cellules Souches Mésoenchymateuses
 NFkB : Nuclear Factor kappa B
 NK : Natural Killer
 NO : Monoxyde d'azote
 OPG : Ostéoprotégérine
 P-PAX : Phospho-Paxilline
 PAR1 : Protease-Activated Receptor-1
 PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
 PCA : Analyse par Composante Principale
 PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1
 PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
 PDGFRb : Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta
 PF4 : Platelet Factor IV
 PGE2 : Prostaglandine E2
 PGI1 : Prostacycline I1
 PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
 pKi : point isoélectrique
 PLA2 : Phospholipase A2
 PLCβ : Phospholipase C β
 PLCβ2 : Phospholipase C β2
 PLCγ2 : Phospholipase C γ2
 PLD : Phospholipase D
 Pb : Paire de bases
 PZ : Protein Z
 RANK : Receptor Activator of Nuclear Kappa B
 RANKL : Receptor Activator of Nuclear Kappa B Ligand
 RAP : Receptor-Associated Protein
 RCPG : Récepteurs Couplés à une Protéine G
 RNAseq : Séquençage de l'ARN
 ROS : Reactive Oxygen Species
 S1RP1 : Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1
 SCARA5 : Scavenger Receptor class A member 5
 siRNA : small interfering RNA
 SR-AI : Scavenger Receptor class A member I
 STAB-2 : Stabiline-2
 SVF : Sérum de Veau Fœtal
 Siglecs : Sialic-acid-binding-immunoglobulin-like-lectines
 t-PA : tissue – Plasminogen Activator
 TCA : Temps de Céphaline avec Activateur
 TGF-α : Tumor Growth Factor α
 TGFBR2 : Transforming Growth Factor Beta Receptor 2
 TLR4 : Toll-Like Receptor 4
 TNF-α : Tumor Necrosis Factor α
 TNFR1 : Tumor Necrosis Factor Receptor 1
 TxA2 : Thromboxane A2
 ULBPs : UL16 Binding proteins
 VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
 VE-cadhérine : Vascular Endothelium cadherin
 VEGF : Vascular Endothelium Growth Factor
 VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
 VKORC1 : Vitamin K epoxide reductase enzyme Complex
 vWD : Maladie de von Willebrand
 VWF : von Willebrand Factor
 ZO-1 : Zonula Occludens-1
 ZOs : Zonula Occludens
 ZPI : Protein Z-dependant protease inhibitor

INTRODUCTION

Chapitre 1 : L'hémostase

Dans des conditions physiologiques, le sang circule librement contre l'endothélium intact des vaisseaux sanguins. Lorsqu'une brèche vasculaire se forme, un processus cellulaire/moléculaire appelé « hémostase » (*hemo* = sang, *stasis* = arrêt), visant à l'arrêt du saignement et participant au maintien de l'intégrité des vaisseaux s'active. L'hémostase est un processus finement régulé qui se met en place rapidement et fait intervenir de nombreux acteurs comme les facteurs de coagulation, les plaquettes et les cellules du tissu endommagé.

L'hémostase est caractérisée par 3 étapes, qui peuvent être intriquées d'un point de vue temporel : la vasoconstriction, l'hémostase primaire et l'hémostase secondaire. La vasoconstriction a pour objectif de concentrer tous les acteurs de la coagulation, et de limiter la perte sanguine. L'hémostase primaire implique l'activation et l'agrégation plaquettaire dans le but de former le clou plaquettaire (ou thrombus blanc), grâce à l'exposition du tissu sous-endothélial. L'hémostase secondaire correspond au processus de coagulation. Suite à cela, d'autres étapes sont nécessaires à la réparation du vaisseau : la rétraction du caillot, la fibrinolyse et la cicatrisation (Marieb and Hoehn, 2010, *Hémostase, Anatomie et physiologie humaines*; Rodrigues *et al.*, 2019).

I. Etapes initiales de l'hémostase

1) La vasoconstriction

Dans les 30 secondes suivant une lésion, la première réaction du vaisseau sanguin est la vasoconstriction. C'est une réaction brève due à une stimulation réflexe des léiomyocytes (cellules musculaires lisses) de la paroi vasculaire ayant pour but de limiter la perte sanguine, de favoriser la stagnation et l'accumulation de différents acteurs de l'hémostase au site lésionnel. Ce spasme vasculaire est régulé par le système nerveux sympathique, dont les fibres nerveuses vasomotrices innervent les vaisseaux sanguins et régulent le tonus vasculaire. Les terminaisons nerveuses libres des neurones sensitifs (fibres C amyélinisées), situées au niveau de la paroi des vaisseaux, vont recevoir un signal de douleur et d'étirement, qui déclenche un réflexe nerveux sympathique. Ce réflexe provoque la libération de noradrénaline par les fibres post-ganglionnaires, qui va se lier aux récepteurs adrénergiques α_1 couplés à la protéine Gq

des léiomyocytes. Cette fixation induit l'activation de la protéine Gq, activant à son tour la phospholipase C β (PLC β) et la phospholipase D (PLD). La PLC β catalyse la conversion du PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) de la membrane plasmique en IP3 (inositol 1,4,5-triphosphate) et en 1,2-diacylglycérol (DAG) ; tandis que la PLD hydrolyse la phosphatidylcholine en choline et DAG. Ces voies de signalisation vont engendrer une augmentation de la concentration calcique intracytoplasmique, et activer la protéine kinase C (PKC), conduisant à la contraction musculaire et donc la vasoconstriction (Liu and Khalil, 2018; Marieb and Hoehn, 2010, *Hémostase, Anatomie et physiologie humaines*). Néanmoins, cette vasoconstriction est temporaire, et nécessite d'être maintenue tout au long du processus hémostatique. Certains agents libérés notamment par l'endothélium lésé (comme l'endothéline-1), ou par les plaquettes activées (comme la sérotonine et le thromboxane A2) sont de puissants vasoconstricteurs (Tableau I) (Marieb and Hoehn, 2010, *Hémostase, Anatomie et physiologie humaines*; Rodrigues *et al.*, 2019).

Tableau I : Principaux médiateurs de la vasoconstriction associés à l'hémostase

Agents vasoconstricteurs	Origine	Référence
Endothéline-1	Cellules endothéliales	(Van Renterghem <i>et al.</i> , 1988)
Norépinéphrine	Cellules endothéliales	(Furchgott and Zawadzki, 1980)
Sérotonine	Plaquettes activées	(Houston <i>et al.</i> , 1986)
Thromboxane A2	Plaquettes activées	(Houston <i>et al.</i> , 1986)
Vasopressin	Plaquettes activées	(Hofbauer <i>et al.</i> , 1984)

2) L'hémostase primaire : formation du clou plaquettaire

Le rôle de l'hémostase primaire est de former rapidement le clou plaquettaire pour obstruer la brèche vasculaire. Dans cette étape d'environ 1 minute, le rôle des plaquettes est capital (Marieb and Hoehn, 2010, *Hémostase, Anatomie et physiologie humaines*).

a. Les plaquettes

Les plaquettes (ou thrombocytes) sont connues pour être impliquées dans l'hémostase depuis les années 1880, par les travaux de Bizzozero (Coller, 2011). Ces éléments figurés du sang sont de petits fragments cytoplasmiques anucléés de forme circulaire (2 à 5 μm) provenant de cellules géantes localisées dans la moelle osseuse hématopoïétique : les mégacaryocytes (Figure 1) (Marieb and Hoehn, 2010, Hémostase, *Anatomie et physiologie humaines*; Pluthero and Kahr, 2018).

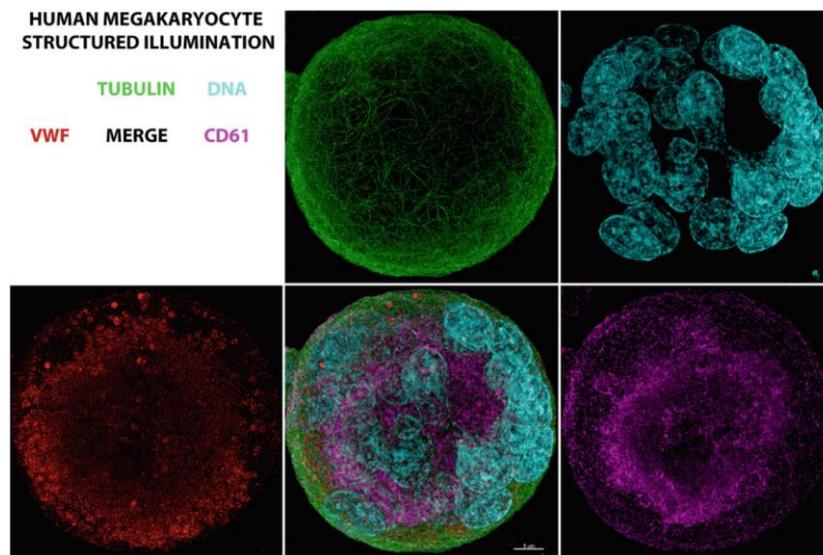


Figure 1 : Image de mégacaryocyte humain observé par microscopie à fluorescence. Image 3D d'une cellule mature perméabilisée, 4 marqueurs ainsi que la combinaison des 4 images (en bas au centre). Les structures cellulaires marquées sont les microtubules du cytosquelette (vert, en haut au centre), l'ADN nucléaire (bleu, en haut à droite), les α -granules et les granules naissantes (rouge, en bas à gauche) et la membrane plasmique et la membrane d'organites (magenta, en bas à droite) (Pluthero and Kahr, 2018).

Elles sont composées de 2 types de granules : les granules denses contenant de nombreuses molécules comme la sérotonine, de l'ATP, de l'ADP et du calcium ; et les α -granules contenant diverses chimiokines, du fibrinogène, du facteur von Willebrand (VWF), des facteurs de coagulation et de croissance (Tableau II) (Golebiewska and Poole, 2015; Palta *et al.*, 2014; Winter *et al.*, 2017). A leur surface, les plaquettes présentent de nombreux récepteurs d'adhérence et des récepteurs couplés à une protéine G (RCPG), impliqués dans l'activation et l'agrégation plaquettaire (Tableau III) (Broos *et al.*, 2011; Manon-Jensen *et al.*, 2016; Winter *et al.*, 2017).

Tableau II : Principaux composants des α -granules et granules denses des plaquettes

α -granules	Granules denses
vWF	ATP (adénosine triphosphate)
P-sélectine	ADP (adénosine diphosphate)
Fibrinogène	Calcium
Fibronectine	Sérotonine
Facteur V, Facteur XI, Facteur XIII	Histamine
PF4 (platelet factor IV)	Epinéphrine
PDGF (platelet-derived growth factor)	
TGF- α (tumor growth factor α)	

D'après Golebiewska and Poole, 2015; Palta *et al.*, 2014; Winter *et al.*, 2017

Tableau III : Principaux récepteurs plaquettaire impliqués dans l'hémostase.

Récepteurs	Rôle	Détails
GPIb	Adhérence + agrégation + activation	Récepteur du vWF adhésion plaquettaire, activation via la voie PLC γ 2
α2β1 (GPIa/GPIIa)	Adhérence + activation	Récepteur des collagènes de types I et IV, activation via la voie PLC γ 2
GPVI	Adhérence + activation	Récepteur des collagènes types I et III, activation via la voie PLC γ 2
α5β1	Adhérence	Récepteur de la fibronectine
α6β1	Adhérence	Récepteur de la laminine
αIIbβ3 (GPIIb/GPIIIa)	Agrégation	Récepteur du fibrinogène, interaction plaquettes-plaquettes
P2Y1	Activation	Récepteur de l'ADP, activation via la voie PLC β 2
TP	Activation	Récepteur du thromboxane A ₂ , activation via la voie PLC β 2
PAR1 / PAR4	Activation	Récepteur de la thrombine, activation via la voie PLC β 2

(Broos *et al.*, 2011; Manon-Jensen *et al.*, 2016; Winter *et al.*, 2017)

Dans un contexte « physiologique », dans la circulation sanguine, les plaquettes n'ont aucune interaction entre elles ni avec l'endothélium intact afin d'éviter la formation de thrombus pouvant perturber le flux sanguin. Le contrôle de l'adhérence et de l'activation plaquettaire s'effectue grâce à l'endothélium sain, par l'expression de différentes substances anti-thrombotiques, comme l'exposition d'héparane sulfate à la surface membranaire, ou bien l'expression d'ectonucléosidases catalysant l'ADP (agrégant plaquettaire exprimé par les érythrocytes et les plaquettes) en adénosine. L'endothélium libère également du monoxyde d'azote (NO) agissant à la fois sur les léiomyocytes en favorisant la vasodilatation, et sur les plaquettes en stabilisant la concentration en calcium intracytosolique via la voie GMPc (guanosine monophosphate cyclique), ce qui inhibe leur activation. La prostacycline I1 (PGI1) sécrétée par l'endothélium stabilise également la concentration calcique par l'activation de son récepteur IP via la voie AMPc (adénosine monophosphate cyclique), tandis que le NO diffuse à travers la membrane. Dès lors que l'endothélium est endommagé, plusieurs étapes vont se mettre en place afin de former le clou plaquettaire (Bochenek and Schäfer, 2019; Broos *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2019).

b. Le rôle des plaquettes dans l'hémostase primaire

Dans un premier temps, les plaquettes vont adhérer à la région lésée. Les dommages de l'endothélium permettent l'exposition de la matrice extracellulaire sous-endothéliale thrombogénique. Cette matrice est composée de molécules « adhérentes » incluant différents types de collagène, la laminine et la fibronectine, ou encore le facteur von Willebrand (VWF) servant tous de ligands pour différents récepteurs plaquettaires, et permettant leur adhérence au site lésionnel (Tableau III). Le VWF est une glycoprotéine multimérique, synthétisée par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes ; stockée dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, dans les α -granules des plaquettes ; et est sécrétée de manière constitutive dans le sang et le tissu sous-endothélial (Broos *et al.*, 2011; Rosenberg *et al.*, 1998). Les conditions rhéologiques influencent largement les interactions adhérentes entre les plaquettes et les molécules du sous-endothélium. En présence de faibles forces de cisaillement (dans les veines et les artères de diamètres larges), l'adhérence des plaquettes au sous-endothélium implique majoritairement les fibres de collagènes, la fibronectine et la laminine ; tandis qu'en présence de forces de cisaillement élevées (dans la microcirculation), l'adhérence

des plaquettes est majoritairement dépendante du VWF (Rivera *et al.*, 2009). Différents types de collagène sont présents au niveau du sous-endothélium, dont les types I et III qui sont considérés comme les plus importants pour l'adhérence plaquettaire. Au niveau de la lésion, le VWF va rapidement se fixer aux fibres de collagène de type I et III par son domaine A3, ainsi qu'aux collagènes de type IV et VI par son domaine A1 et interagir avec le récepteur GPIb des plaquettes afin de stabiliser leur adhérence (Figure 2). Alors que le VWF ne se fixe pas aux plaquettes circulantes dans la circulation normale, son immobilisation au niveau des fibres de collagène ainsi que les forces de cisaillement modifient sa conformation, le rendant adhérent (Broos *et al.*, 2011; Manon-Jensen *et al.*, 2016; Marieb and Hoehn, 2010, *Eléments figurés, Anatomie et physiologie humaines*; Rivera *et al.*, 2009; Tsai, 1996).

L'adhérence des premières plaquettes au tissu sous-endothélial entraîne une activation pré-coagulante de celles-ci. Les récepteurs impliqués dans leur adhérence vont activer la PLC γ 2 (phospholipase C γ 2), et entraîner l'hydrolyse de PIP2 en IP3 et DAG (Broos *et al.*, 2011). IP3 va alors se fixer à son récepteur IP3R présent à la surface du système tubulaire dense des plaquettes (organelle dérivant du réticulum endoplasmique). IP3R est un récepteur canal calcique, entraînant la sortie du calcium de ce compartiment vers le cytosol. Cette fuite de calcium provoque la translocation de la protéine STIM1 (stromal interaction molecule 1) vers la membrane plasmique, où elle va s'associer à la protéine Orai1 et agir comme un canal permettant l'entrée de calcium extracellulaire vers le cytosol plaquettaire (Varga-Szabo *et al.*, 2009). Ces phénomènes résultent en une augmentation de la concentration en calcium et en DAG intracellulaire, permettant l'activation plaquettaire. En parallèle, l'augmentation de la concentration calcique résulte en l'activation de la phospholipase A2 (PLA2), conduisant à la formation de thromboxane A2 par la thromboxane synthase (Kramer *et al.*, 1996). Le thromboxane A2 est un puissant agrégant plaquettaire, qui va alors être sécrété et agir à la fois sur les léiomyocytes pour maintenir la vasoconstriction, et sur les plaquettes elles-mêmes pour augmenter leur activation et leur agrégation, en agissant de manière autocrine et paracrine. Sa fixation sur son récepteur TP entraîne l'activation de la PLC β 2 qui génère de l'IP3 et du DAG, conduisant à une augmentation de la concentration calcique (Figure 2) (Brass *et al.*, 1997; Broos *et al.*, 2011).

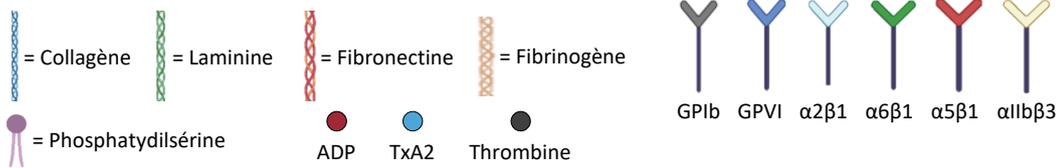
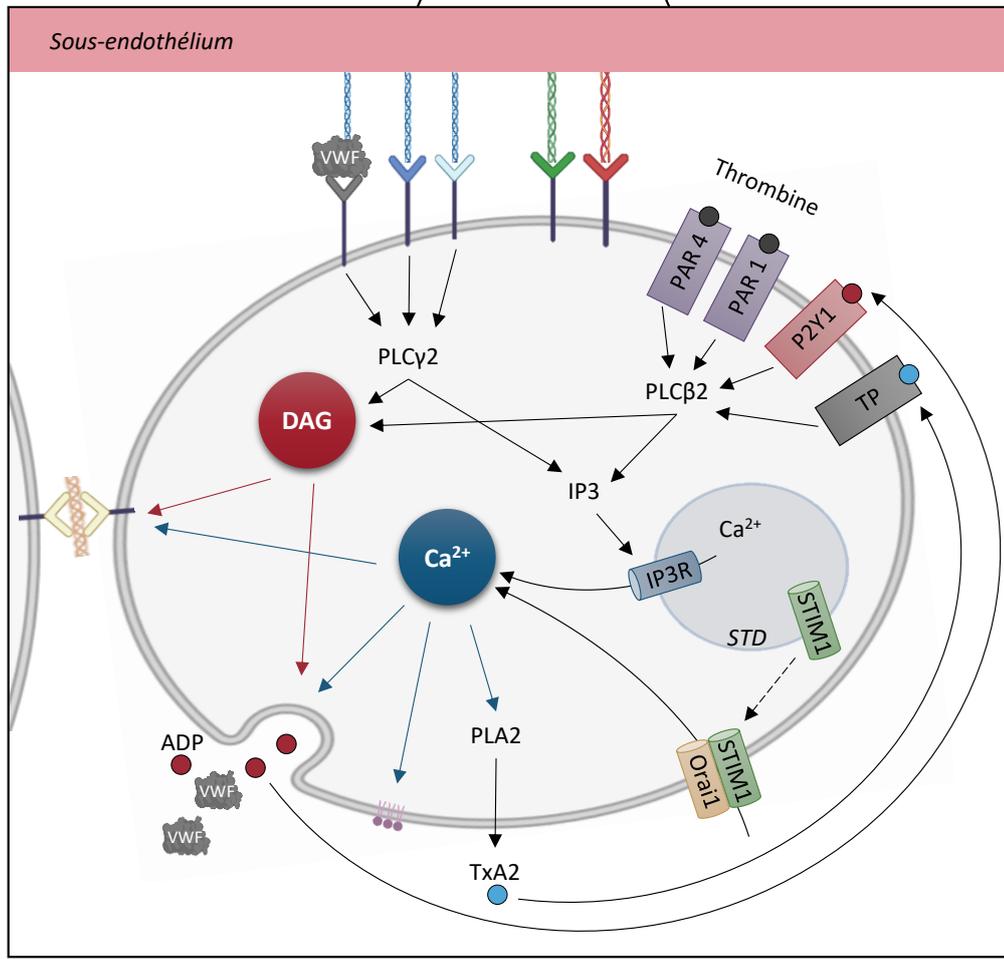
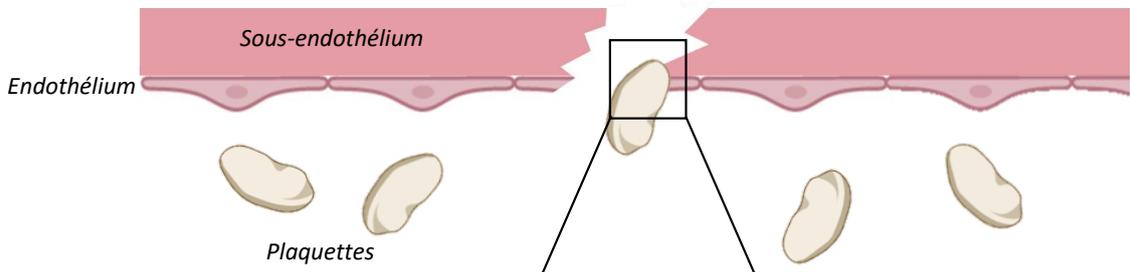


Figure 2 : Schématisation de l'activation plaquettaire. Lors d'une lésion de l'endothélium, les plaquettes au repos adhèrent au tissu sous-endothélial, composé de différentes molécules adhérentes comme des collagènes, la laminine ou la fibronectine. Les plaquettes vont alors adhérer à ces molécules, par l'intermédiaire d'intégrines : GPIb se fixe au facteur de von Willebrand (VWF) lui-même fixé aux fibres de collagène, GPVI et $\alpha 2\beta 1$ se fixent directement au collagène, $\alpha 6\beta 1$ se fixe aux laminines, et $\alpha 6\beta 1$ aux fibronectines. Les récepteurs GPIb, GPVI et $\alpha 2\beta 1$ vont transduire un signal d'activation, via le messenger phospholipase C $\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$) qui provoque la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et de 1,2-diacylglycérol (DAG). IP3 va agir sur le système tubulaire dense (STD) par l'intermédiaire de son récepteur IP3R, entraînant une fuite de calcium vers le cytosol. Cette fuite entraîne la translocation de la protéine STIM1 (Stromal Interaction Molecule-1) sur la membrane plasmique, permettant l'entrée de calcium extracellulaire grâce à une interaction avec son partenaire Orai1. L'augmentation de la concentration de calcium (Ca^{2+}) et de DAG permet d'activer le récepteur $\alpha IIb\beta 3$, qui va assurer la fixation à d'autres plaquettes par l'intermédiaire du fibrinogène ou du VWF. C'est le début de l'agrégation plaquettaire. Par ailleurs, le DAG et le calcium provoquent la dégranulation des granules denses et des α -granules, libérant différentes molécules dont l'ADP, qui va activer les plaquettes de manière autocrine et paracrine. Le calcium entraîne également le passage de phosphatidylsérine à la surface membranaire, et active la phospholipase A2 (PLA2) permettant la production et la libération de thromboxane A2 (TxA2). L'ADP et le thromboxane A2 vont activer les récepteurs TP et P2Y1 sur les plaquettes, de manière paracrine et autocrine respectivement. Ces récepteurs transduisent le signal d'activation par l'intermédiaire du messenger phospholipase C $\beta 2$ (PLC $\beta 2$). De même, la thrombine produite par la cascade de coagulation se fixe à ses récepteurs « protease activated receptor »-1 et -4 (PAR1 et PAR4) et active les plaquettes via de PLC $\beta 2$ (Broos et al., 2011; Golebiewska and Poole, 2015)

L'activation plaquettaire se traduit par 3 phénomènes importants : 1) la formation de pseudopodes, 2) le passage de phosphatidylsérine à la surface membranaire (la rendant chargée négativement), et 3) la dégranulation des α -granules et des granules denses (Figure 2) (Broos *et al.*, 2011; Golebiewska and Poole, 2015). Alors que les plaquettes au repos sont discoïdes, les plaquettes activées forment des allongements de la membrane nommés pseudopodes, ayant des propriétés adhésives importantes et permettant le recrutement d'autres plaquettes au niveau de la lésion. Ces propriétés adhésives sont principalement dues à l'activation des intégrines $\alpha IIb\beta 3$ (également nommé GPIIb/IIIa), médiée par la protéine CalDAG-GEFI (Calcium and diacylglycerol regulated guanine nucleotide exchange factor I). Cette activation conduit à un changement de la conformation de l'intégrine, permettant alors son interaction avec le fibrinogène, et donc la liaison plaquette-plaquette par l'intermédiaire de ce dernier (Figure 2) (Broos *et al.*, 2011; Crittenden *et al.*, 2004). Le VWF est également capable de fixer le récepteur $\alpha IIb\beta 3$ et entraîner l'agrégation plaquettaire (Beacham *et al.*, 1992). Le passage de phosphatidylsérine à la surface membranaire s'effectue grâce à l'augmentation de la concentration calcique, par un phénomène mal connu, impliquant potentiellement la

protéine transmembranaire 16F (TMEM16F). Les phosphatidylsérines sont chargées négativement, et permettent la fixation des facteurs de coagulation, phénomène important pour leur activité coagulante (Suzuki *et al.*, 2010). La dégranulation se traduit par une libération de nombreux messagers (Tableau II). La sérotonine et l'épinéphrine vont agir sur les léiomyocytes comme des vasoconstricteurs (Houston *et al.*, 1986; Larrabee *et al.*, 1987). Le VWF et le fibrinogène vont agir comme agrégants plaquettaires, via les récepteurs GPIb et $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ respectivement. L'ATP, l'ADP et le calcium vont agir de manière paracrine et autocrine, permettant l'activation des plaquettes circulantes. L'ADP est un puissant agrégant plaquettaire qui active la PLC β2 en se fixant à son récepteur P2Y1 (Figure 2) (Broos *et al.*, 2011; Golebiewska and Poole, 2015; Palta *et al.*, 2014).

Suite à l'adhérence et l'activation des premières plaquettes, une réaction en chaîne va se mettre en place. Les plaquettes qui ont adhéré et ont été activées vont à leur tour conduire à l'activation des plaquettes circulantes grâce aux interactions permises par leurs pseudopodes et les messagers libérés par la dégranulation. Ces plaquettes vont alors adhérer, dégranuler et activer d'autres plaquettes. Cette réaction en chaîne va entraîner l'agrégation plaquettaire jusqu'à la formation du clou plaquettaire, également nommé thrombus blanc, qui endigue momentanément le saignement (Broos *et al.*, 2011; Marieb and Hoehn, 2010, *Hémostase, Anatomie et physiologie humaines*).

II. L'hémostase secondaire : coagulation

La coagulation correspond à l'étape de renforcement du thrombus blanc par la conversion du fibrinogène en fibrine, résultant en la formation d'un caillot solide, ou thrombus rouge. Cette conversion est la conséquence de la cascade de coagulation, faisant appel aux facteurs de coagulation. Tous les facteurs de coagulation (sauf le facteur tissulaire) sont des protéines plasmatiques, produites majoritairement par le foie. Ils sont numérotés de I à XIII suivant l'ordre dans lequel ils ont été découverts, et circulent majoritairement sous forme de précurseurs inactifs (Tableau IV). Les facteurs activés, et principalement les sérines protéases, vont se fixer aux membranes plasmiques des plaquettes activées à l'aide du calcium. La coagulation comporte 2 voies : une voie qui initie le processus avec le complexe tenase FVIIa / facteur tissulaire, et une voie qui l'amplifie avec le complexe tenase FVIIIa / FIXa. Ces voies interagissent entre-elles, se déroulent de façon concomitante et convergent vers une voie commune,

généralant une importante quantité de thrombine nécessaire à la formation de fibrine, la finalité étant la polymérisation de celle-ci (Marieb and Hoehn, 2010, *Hémostase, Anatomie et physiologie humaines*; Prydzial *et al.*, 2018).

Tableau IV : Les facteurs de coagulation

Numéro du facteur de coagulation	Nom du facteur de coagulation	Fonction
I	Fibrinogène	Est converti en fibrine. Formation du caillot.
II	Prothombine	Est converti en thrombine. Active les FI, FV, FVII, FVIII, FXI, FXIII, protéine C, plaquettes, cellules endothéliales.
III	Facteur tissulaire	Cofacteur du FVIIa (complexe tenase de la voie extrinsèque). Active le FVII.
IV	Calcium	Facilite la fixation des facteurs de coagulation sur les phospholipides.
V	Proaccélérine	Cofacteur du FXa (prothrombinase).
VI	<i>Ce numéro n'est plus utilisé. Il serait identique au FV</i>	
VII	Proconvertine	Forme le complexe tenase de la voie extrinsèque avec FIII. Grâce à son cofacteur, il active les FVIII, FIX et FX
VIII	Facteur (globuline) anti-hémophilique A ou thromboplasminogène	Cofacteur du FIXa (complexe tenase de la voie intrinsèque).
IX	Facteur (globuline) anti-hémophilique B ou « Christmas factor »	Forme le complexe tenase de la voie intrinsèque avec FVIIIa. Grâce à son cofacteur, il active les FVIII, FX et FXI
X	Facteur Stuart-Prower	Forme la prothrombinase avec FVa. Grâce à son cofacteur, il active la prothrombine.
XI	Facteur prothromboplastique plasmatique C	Active le FIX
XII	Facteur Hageman	Active les FXI et FVII
XIII	Facteur de stabilisation de la fibrine	Favorise la polymérisation et la stabilisation de la fibrine

D'après (Marieb and Hoehn, 2010, *Hémostase, Anatomie et physiologie humaines*; Palta *et al.*, 2014)

1) L'initiation de la coagulation

La protéine clé initiant la coagulation est le facteur tissulaire (FT), une protéine transmembranaire exprimée par le tissu sous-endothélial, exposée en cas de brèche vasculaire. Le FT est également exprimé par les cellules endothéliales activées par la thrombine (produite par la cascade de coagulation), ainsi que par le PF4 (Platelet Factor 4) libéré par les plaquettes activées (Pryzdial *et al.*, 2018; Todoroki *et al.*, 1991). Le FT se fixe à la surface des plaquettes activées (au niveau des phosphatidylsérines) afin de faciliter l'auto-activation du facteur VII (FVII → FVIIa) également fixé à la membrane plaquettaire, en présence de calcium (Rao and Rapaport, 1988). Le FVII peut également être activé par des sérines protéases comme la thrombine, le FIXa ou FXIIa (Yau *et al.*, 2015). Le FT et FVIIa vont alors former un complexe tenase, et permettre l'activation par protéolyse du facteur X (FX → FXa), du facteur IX (FIX → FIXa) et du facteur VIII (FVIII → FVIIIa) en présence de calcium et des phospholipides (Figure 3A). Seul, la capacité du FVIIa à cliver ces facteurs est faible, mais est augmentée de 10 000 fois en présence du FT (Kamikubo *et al.*, 2017; Komiyama *et al.*, 1990; Pryzdial *et al.*, 2018).

L'initiation de la coagulation est rapide car elle comporte peu d'étapes, contrairement à l'amplification. En cas de grave traumatisme, elle favorise la formation d'un caillot en 15 secondes. Cette voie génère une quantité pico-molaire de thrombine grâce à l'activation du facteur X, et est immédiatement suivie d'une étape d'amplification (Brummel *et al.*, 2002; Hoffman, 2018; Marieb and Hoehn, 2010, Hémostase, *Anatomie et physiologie humaines*).

2) L'amplification de la coagulation

La faible quantité de thrombine générée pendant l'initiation de la coagulation va aider à l'activation de l'amplification. Elle est activée par des surfaces chargées négativement, comme les phosphatidylsérines de la membrane des plaquettes activées, ou le collagène (Marieb and Hoehn, 2010). Le facteur XII se lie à ces surfaces, entraînant son auto-activation (FXII → FXIIa). Le FXIIa va ensuite activer le facteur XI (FXI → FXIa), étant également activé par la thrombine. Le FXIa va activer le facteur IX (FIX → FIXa) en présence de calcium et à la surface des plaquettes activées. Le FIXa est également activé par le complexe tenase FVIIa/FT. En parallèle, le facteur VIII va être activé par la thrombine, le FXa et par le complexe tenase FVIIa/FT. Une fois activé, le FIXa va se lier au FVIIIa sur les phosphatidylsérines des plaquettes activées, pour former le

complexe tenase. Le FVIIIa agit comme cofacteur de la protéase FIXa, qui va alors activer le facteur X ($FX \rightarrow FXa$) (Figure 3B) (Marieb and Hoehn, 2010; Pryzdial et al., 2018).

L'activation des acteurs de l'amplification se met en place peu après ceux de l'initiation. L'amplification de la coagulation permet de générer une quantité plus importante de thrombine, également grâce à l'activation du facteur X. Une fois les facteurs activés, les deux voies fonctionnent simultanément (Marieb and Hoehn, 2010, *Hémostase, Anatomie et physiologie humaines*; Pryzdial et al., 2018).

3) La fibrinoformation : la voie commune

Le FXa est capable d'activer une petite quantité de facteur V ($FV \rightarrow FVa$), puis forme un complexe avec celui-ci. Le facteur V est également activé par la thrombine. Le complexe FXa/FVa, en présence de calcium et de phosphatidylsérine forme le complexe « prothrombinase », dans lequel le FVa est cofacteur de la protéase FXa. Le rôle de la prothrombinase est de transformer la prothrombine en thrombine. Le FXa seul est capable de produire une petite quantité de thrombine, mais son effet est 300 000 fois plus important en présence de son cofacteur FVa (Lam and Moosavi, 2020; Pryzdial et al., 2018). La thrombine va alors convertir le fibrinogène soluble en monomère de fibrine, puis va ensuite activer le facteur XIII ($FXIII \rightarrow FXIIIa$) en présence de calcium, afin que celui-ci catalyse la formation des polymères insolubles de fibrine. La fibrine va alors former une matrice compacte stabilisant et renforçant le clou plaquettaire. Cette matrice va capter des érythrocytes, qui augmentent la masse du caillot, qu'on appelle alors thrombus rouge (Lam and Moosavi, 2020; Pryzdial et al., 2018; Winter et al., 2017).

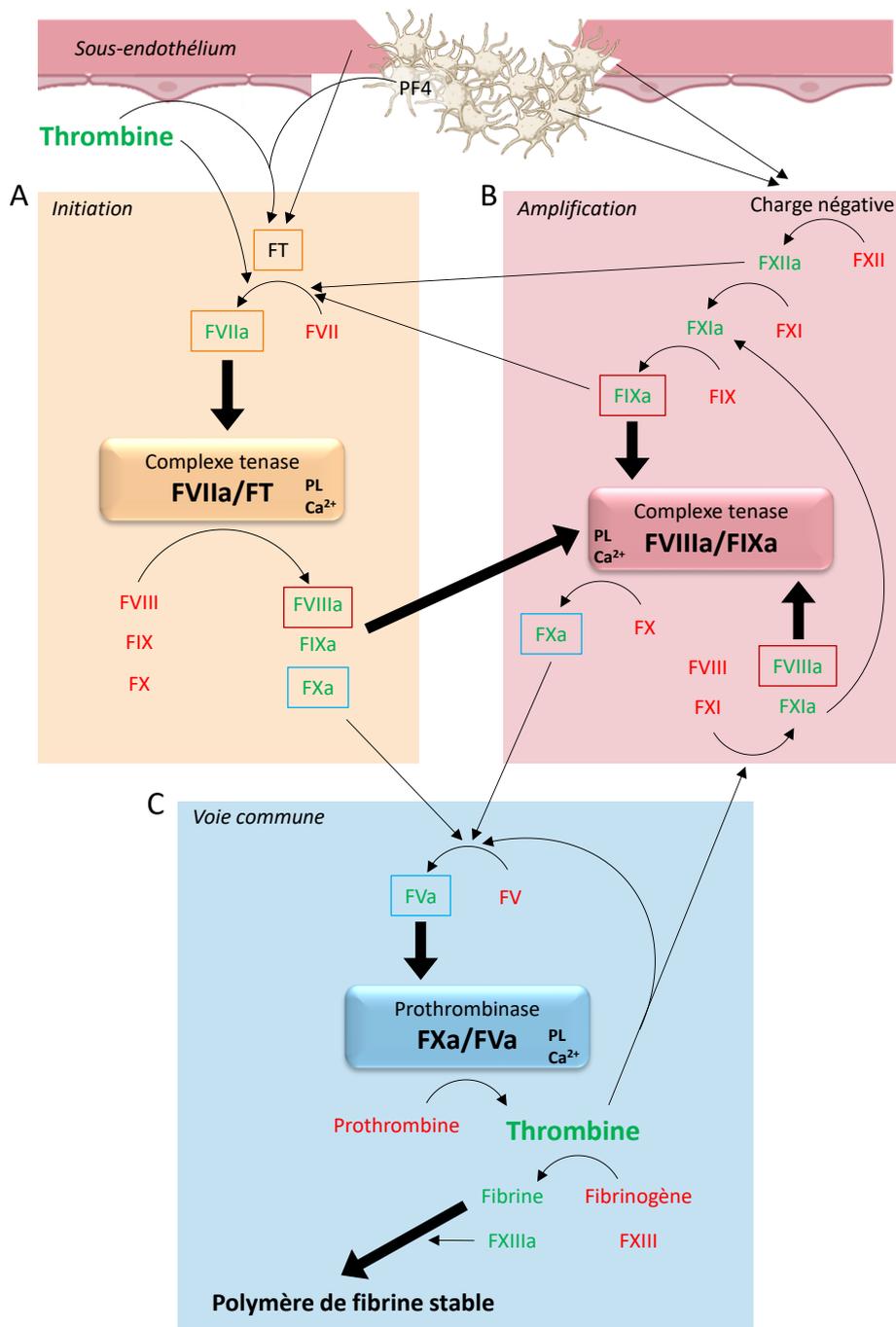


Figure 3: Schématisation de la cascade de coagulation. En rouge sont représentés les facteurs de coagulation inactifs, et en vert, les facteurs actifs. Les facteurs encadrés en orange ou rouge sont impliqués dans les complexes tenases. Ceux encadrés en bleu sont impliqués dans le complexe formant la prothrombinase. **A)** Le facteur tissulaire (FT), exprimé par le tissu sous-endothélial et l'endothélium activé par la thrombine et PF4 (sécrété par les plaquettes activées), permet l'auto-activation du facteur VII. Le FVII est également activé par la thrombine, le FIXa ou FXIIa. Formation du complexe tenase FVIIa/TF qui active : le facteur X, le facteur IX et le facteur VIII. **B)** Des surfaces chargées négativement permettent l'auto-activation du FXII, qui va activer le facteur XI, également activé par la thrombine. Le FXIa va activer le facteur IX, également activé par le complexe tenase FVIIa/FT. En parallèle, le facteur VIII va être activé par la thrombine, le FXa et par le complexe tenase FVIIa/FT. Formation du complexe tenase FVIIIa/FIXa qui active le facteur X. **C)** Le FXa active le facteur V, également activé par la thrombine. Formation du complexe prothrombinase qui active la thrombine. La thrombine active le fibrinogène et le facteur XIII, ainsi que les différents facteurs susmentionnés. Le FXIIIa active la polymérisation et stabilise la fibrine (Marieb and Hoehn, 2010 *Hémostase, Anatomie et physiologie humaines*; Pryzdial et al., 2018; Cadé et al., en révision).

4) Le rôle majeur de la thrombine dans la coagulation

La thrombine est une enzyme clé dans le processus hémostatique, dont les actions sont multiples. Etant la seule sérine protéase de la coagulation n'ayant pas de domaine de fixation à la phosphatidylsérine, car celui-ci est clivé lors de son activation, elle peut agir facilement à différentes étapes du processus. Lorsqu'elle est libérée du complexe FXa/FVa, la thrombine va dans un premier temps amplifier le processus de coagulation, en augmentant sa propre activation. Premièrement, elle va activer le facteur V (FV → FVa) par protéolyse, ce qui amplifie directement sa production en favorisant l'activité de la prothrombinase (Pryzdial *et al.*, 2018). Puis, elle va également permettre d'amplifier la coagulation, en activant les facteurs VIII (Fay, 2004) et XI (Emsley *et al.*, 2010), ce qui va favoriser la formation du complexe tenase FVIIIa/FIXa et augmenter le taux de FXa. Elle va également stimuler les cellules endothéliales pour qu'elles expriment du facteur tissulaire (Figure 3), ainsi que les plaquettes en se fixant aux récepteurs PAR1 et PAR4 (Figure 2) (Broos *et al.*, 2011; Pryzdial *et al.*, 2018). Tous ces phénomènes conduisent à une augmentation de la quantité de thrombine, qui va alors convertir le fibrinogène en fibrine et activer le facteur XIII afin de former le thrombus rouge. La thrombine est la seule enzyme capable d'effectuer la conversion fibrinogène soluble en monomère de fibrine (Rose and Di Cera, 2002).

III. Le contrôle de l'hémostase et la fibrinolyse

1) Contrôle de l'hémostase

Une fois déclenchée, la coagulation suit son cours jusqu'à la formation du thrombus rouge. Afin de limiter sa taille, des mécanismes régulateurs viennent rétro-contrôler négativement les processus « pro-coagulants » mis en jeu. Il existe différents systèmes inhibiteurs physiologiques de la coagulation capables de neutraliser les différentes sérine-protéases, dont les plus importants sont : le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), l'antithrombine, le système protéine C et ZPI (Protein Z-dependant protease inhibitor) (Marieb and Hoehn, 2010, Hémostase, *Anatomie et physiologie humaines*; Pryzdial *et al.*, 2018; Winter *et al.*, 2017).

a. TFPI

Le TFPI est l'inhibiteur physiologique du complexe tenase FVIIa/FT (Price *et al.*, 2004; Pryzdial *et al.*, 2018). Cette protéase est majoritairement produite par l'endothélium micro-vasculaire, et est relargué par l'action de l'héparine (Sandset *et al.*, 1988) et des plaquettes activées sur les cellules endothéliales (Novotny *et al.*, 1988). Il existe 3 localisations du TFPI *in vivo* : la majorité est fixée à l'endothélium vasculaire, 10% circulent associés aux lipoprotéines de faible densité (LDL) dans le sang, et une faible portion est retrouvée dans les α -granules des plaquettes, associée au facteur V (Novotny *et al.*, 1991; Price *et al.*, 2004). TFPI forme un complexe de haute affinité avec le complexe TF/FVIIa/FXa et inhibe l'activité du complexe tenase en se présentant lui-même comme substrat, et occupe le site actif du FXa. Le complexe TF/FVIIa/FXa/TFPI est ensuite métabolisé par le foie (Price *et al.*, 2004). TFPI entraîne également la dégradation et l'internalisation du complexe FVIIa-TF par les monocytes (Hamik *et al.*, 1999). TFPI peut également inhiber le FXa indépendamment du complexe tenase TF/FVIIa, en présence de la protéine S (Ndonwi *et al.*, 2010).

b. Antithrombine

L'antithrombine est l'inhibiteur majeur de la thrombine. Elle a un rôle crucial dans le contrôle de la coagulation, en raison de l'impact important de la thrombine. C'est une protéine de la famille des serpins produite par le foie, inhibitrice de sérine protéase, fixant et inactivant la

thrombine, ainsi que les facteurs de coagulation FIXa, le FXa, le FXIa, et le FXIIa (Palta *et al.*, 2014). L'antithrombine, ainsi que la plupart des serpins, agit comme un substrat suicide : les différentes sérines-protéases vont s'y fixer par leur site actif et entraîner son clivage. Le clivage de l'antithrombine entraîne un changement de conformation du complexe antithrombine/sérine-protéase alors plus stable, ce qui piège les sérines-protéases (Stratikos and Gettins, 1999). L'activation de l'antithrombine est contrôlée par sa fixation aux héparanes sulfates des cellules endothéliales, ou par l'héparine libérée par les mastocytes, entraînant un changement de la conformation de l'antithrombine (Mertens *et al.*, 1992; Opal *et al.*, 2002).

c. Protéine C

Alors que la thrombine est un très puissant facteur pro-coagulant au moment du processus de formation du thrombus, la thrombine a un rôle anti-coagulant plus tardif. Une partie de la thrombine générée au cours de la coagulation se lie à la thrombomoduline, un co-facteur présent de façon constitutive à la surface des cellules endothéliales (Winter *et al.*, 2017). La thrombomoduline est un récepteur transmembranaire prévenant la formation du thrombus sur l'endothélium intact par la fixation de la thrombine (Palta *et al.*, 2014). Le complexe thrombine/thrombomoduline active la protéine C, qui est fixée sur son récepteur endothélial EPCR (Endothelial Protein C Receptor). Une fois activée, la protéine C clive et inactive les facteurs V/Va et VIII/VIIIa en présence de son cofacteur la protéine S (Kalafatis *et al.*, 1994). Ce système bloque donc l'amplification de la coagulation.

d. ZPI

ZPI est une protéine plasmatique de la famille des serpins, inhibant 2 facteurs de coagulation : FXa et FXIa. Tandis que le FXIa est inhibé par du ZPI circulant libre, l'inhibition du FXa requiert la présence du cofacteur de ZPI, la protéine Z (PZ), de phospholipides et de calcium (Bianchini *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2011). PZ est une protéine vitamine-K dépendante, pouvant se fixer aux membranes plasmiques pro-coagulantes *via* son domaine Gla. ZPI possède une haute affinité pour PZ, et circule majoritairement en complexe avec cette protéine. Durant la coagulation, le complexe PZ/ZPI se fixe au FXa à la surface des membranes plasmiques par le domaine Gla, et ZPI agit comme un substrat suicide, de la même manière que l'antithrombine.

La fixation du FXa ou de FXIa à ZPI entraîne un changement de conformation de ZPI, piégeant alors ces facteurs (Vasse, 2011). ZPI peut également être activée par l'héparine présente à la surface des cellules endothéliales (Huang *et al.*, 2011).

2) La fibrinolyse

Le thrombus est une solution temporaire pour pallier aux saignements dus aux lésions de l'endothélium. La fibrinolyse consiste en la dégradation progressive du caillot, qui est activé en parallèle de la coagulation. C'est un processus enzymatique qui dissout le thrombus par la dégradation de la fibrine. Cette dégradation est provoquée par la plasmine, enzyme dérivée du plasminogène activée par le tPA (tissue plasminogen activator), une sérine-protéase étant l'activateur principal.

Le tPA est sécrété par les cellules endothéliales activées par la thrombine, l'épinéphrine, la vasopressine et les forces de frottement. L'activation du plasminogène par le tPA requiert leur fixation sur les molécules de fibrine (Palta *et al.*, 2014; Pryzdial *et al.*, 2018). La fibrinolyse est un processus plus lent que la mise en place de la coagulation, afin de permettre la cicatrisation (Marieb and Hoehn, 2010, Hémotase, *Anatomie et physiologie humaines*).

Chapitre 2 : Les facteurs de coagulation : FVIII et VWF

I. Le facteur de coagulation VIII

Le facteur de coagulation VIII (FVIII) est une glycoprotéine plasmatique ayant un rôle crucial dans l'amplification de la cascade de coagulation (Lenting *et al.*, 2010). Elle a été découverte en 1946 par Taylor et son équipe, qui l'identifie comme la protéine responsable de l'hémophilie (Schramm, 2014). En effet, une altération fonctionnelle et/ou quantitative de l'expression du FVIII est responsable de l'hémophilie A, un des plus sévère trouble de la coagulation héréditaire (Bhopale and Nanda, 2003).

1) Structure du gène *F8*

L'équipe de Gitschier et l'équipe de Wood clonent pour la première fois le gène *F8* de manière indépendante aux débuts des années 1980 (Gitschier *et al.*, 1984; Wood *et al.*, 1984). Le gène *F8* est situé sur l'extrémité du bras long du chromosome X en position Xq28, et s'étend sur 186 kb (soit environ 0.1% du chromosome). Il est composé de 26 exons et de 25 introns de tailles variables, dont le promoteur se situe 1175 pb en amont du site d'initiation de la transcription (Figure 4). La taille des exons varie de 69 pb (exon 5) à 3106 pb (exon 14). La taille des introns varie de 200 pb (intron 17) à 32 kb (intron 22), avec 6 qui sont particulièrement longs (> 14 kb, dont l'intron 1 et 22) (Tableau V) (Gitschier *et al.*, 1984). L'épissage génère un ARN messager de 9kb, soit 5% de la taille initiale du gène. L'intron 22 du gène *F8* comporte une région riche en CpG agissant comme un promoteur bidirectionnel, localisé dans une région de 9.5kb nommée *int22h-1* (région homologue de l'intron 22-1) et est le promoteur de 2 gènes : *F8A* et *F8B*, co-exprimés avec le *F8* de manière ubiquitaire (Figure 4) (Bowen, 2002; De Brasi and Bowen, 2008; Graw *et al.*, 2005).

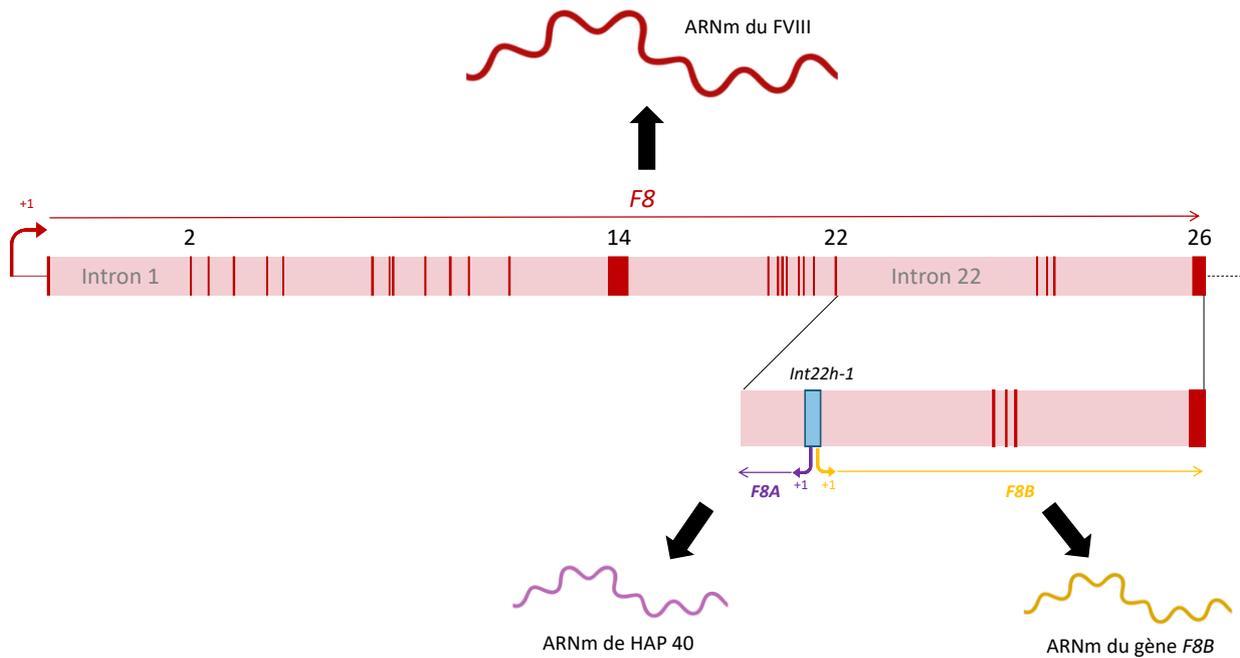


Figure 4 : Structure du gène F8 et transcription. En rouge sont représentés les 26 exons, en rose les 25 introns, d'une taille totale de 186kb. La flèche « +1 » rouge représente le promoteur du gène F8 et le sens de transcription. Les flèches « +1 » jaune et violette correspondent au promoteur bidirectionnel pour les gènes F8A et F8B co-exprimés avec le F8. Ce promoteur est situé au niveau de l'int22h-1, dans une région riche en CpG. Le F8A est transcrit dans le sens opposé au F8, tandis que le gène F8B est transcrit dans le même sens. Les ARNm des F8A et F8B sont de taille inférieure à celui du F8. L'ARNm du gène F8 code pour la protéine FVIII, l'ARNm du gène F8A code pour la protéine HAP40 (huntingtin-associated protein 40) et l'ARNm du gène F8B code pour une protéine méconnue à ce jour qui contiendrait le domaine C2 du FVIII. (Bowen, 2002; De Brasi and Bowen, 2008; Graw et al., 2005; Valleix et al., 1999).

Le *F8A* ne contient pas d'intron, s'étend sur 2kb dans l'intron 22 et est transcrit dans la direction opposée au FVIII. Il code pour une protéine de 40 kDa, nommée huntingtin-associated protein 40 (HAP 40). HAP 40 est impliquée dans la régulation du trafic endosomal médiée par la protéine Huntingtine, via l'intermédiaire de la protéine Rab5. En l'absence de la protéine Huntingtine, la localisation de HAP 40 est nucléaire. Il est possible que HAP 40 soit impliquée dans la localisation nucléaire aberrante de la protéine Huntingtine, responsable de la maladie de Huntington (Bowen, 2002; De Brasi and Bowen, 2008; Graw *et al.*, 2005; Pal *et al.*, 2006; Saudou and Humbert, 2016).

Le *F8B* est transcrit dans la même direction que le *F8*. Son premier exon (codant pour 8 acides aminés) est localisé dans l'intron 22, et ses autres exons correspondent aux exons 23 à 26 du gène *F8*. La protéine correspondante et son rôle ne sont pas connus à ce jour, toutefois elle contiendrait le domaine C2 du FVIII. Contrairement au *F8A*, le gène *F8B* n'a pas d'équivalent

dans le génome murin. Il a été montré que des souris transgéniques exprimant *F8B* (sous le contrôle d'un promoteur CMV), présentent un retard de croissance, une microcéphalie et un déficit oculaire sévère. Ces phénotypes ne sont pas expliqués à ce jour (Bowen, 2002; De Brasi and Bowen, 2008; Graw *et al.*, 2005; Valleix *et al.*, 1999).

Tableau V: Taille des exons (paire de base) et des introns (kilo paire de base) composant le gène F8.
(Gitschier *et al.*, 1984)

Exons	Taille (pb)	Introns	Taille (kb)
1	313	1	22,9
2	122	2	2,6
3	123	3	3,9
4	213	4	5,4
5	69	5	2,4
6	117	6	14,2
7	222	7	2,6
8	62	8	0,3
9	172	9	4,8
10	94	10	3,8
11	215	11	2,8
12	151	12	6,3
13	210	13	16
14	3106	14	22,7
15	154	15	1,3
16	213	16	0,3
17	229	17	0,2
18	183	18	1,8
19	117	19	0,6
20	72	20	1,6
21	86	21	3,4
22	156	22	32,4
23	145	23	1,4
24	49	24	1
25	177	25	22,4
26	1958		

2) L'origine du FVIII

a. Origine hépatique

Le site de synthèse du FVIII fait l'objet de nombreux débats depuis plusieurs décennies. Différentes études montrent que le foie constitue le site majeur de production du FVIII circulant. En 1969, Marchioro *et al.* montrent que la transplantation d'un foie sain sur un chien hémophile entraîne un retour à la normale de la concentration en FVIII circulant (Marchioro *et al.*, 1969). Par la suite, ces résultats seront confirmés chez l'homme, quand l'équipe de Bontempo transplante des foies sains chez 4 patients hémophiles, qui présentent des taux de FVIII circulant comparables à la valeur physiologique après la greffe (Bontempo *et al.*, 1987). En 1995, Figueiredo et Brownlee identifient et confirment la liaison de 4 facteurs de transcription spécifiques des hépatocytes sur le promoteur du gène *F8* : HNF (hepatocyte nuclear factor) 1 et 4, et CEBP (CCAAT enhancer-binding protein) α et β (Figueiredo and Brownlee, 1995) ; ainsi qu'un facteur de transcription ubiquitaire : NF κ B (nuclear factor kappa B) (Figueiredo and Brownlee, 1995). Ceci corrobore l'hypothèse d'une origine hépatique du F8, sachant que la présence d'ARNm et de la protéine FVIII est détectée au niveau du foie (Becker *et al.*, 2004; Figueiredo and Brownlee, 1995; Wion *et al.*, 1985; Zelechowska *et al.*, 1985). Toutefois, la nature des cellules à l'origine du FVIII circulant reste controversée. Différents travaux montrent l'expression à un niveau transcriptionnel et protéique du FVIII dans les hépatocytes identifiant ces cellules comme source du facteur de coagulation (Becker *et al.*, 2004; Wion *et al.*, 1985). En plus des hépatocytes, des études complémentaires démontrent l'expression du FVIII (ARNm et protéine) dans les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (LSEC) tant chez la souris que chez l'homme (Do *et al.*, 1999; Zelechowska *et al.*, 1985). Toutefois, divers travaux complémentaires ont confirmé la production d'un taux de FVIII coagulant mesurable par les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques, et non les hépatocytes, suggérant qu'elles représenteraient le site de production hépatique principal du FVIII circulant (Everett *et al.*, 2014; Hellman *et al.*, 1989; Shahani *et al.*, 2014). A ce jour, il est acquis que la source majeure (mais non exclusive) de production de FVIII sont les LSEC (Famà *et al.*, 2020).

b. Origine extra-hépatique

En plus d'une origine hépatique, le FVIII semble avoir des origines cellulaires extra-hépatiques. En effet, il est montré chez l'homme que la transplantation d'un foie d'un donneur hémophile vers un donneur sain (cas rare) n'entraîne pas le développement de l'hémophilie chez le receveur (Kurian *et al.*, 2020). De plus, la transplantation de nœuds lymphatiques, de rates ou encore de poumons sains sur des chiens hémophiles permettent de corriger la maladie (Groth *et al.*, 1974; Veltkamp *et al.*, 1974; Webster *et al.*, 1971). Ces études permettent d'émettre deux hypothèses : 1) une expression de FVIII par de nombreux types cellulaires ; 2) une expression de FVIII par un type cellulaire largement présent dans les différents tissus, comme les cellules endothéliales.

Plusieurs équipes sont en faveur de l'hypothèse d'une origine endothéliale du FVIII. En 2006, Jacquemin *et al.* montrent que les cellules endothéliales micro-vasculaires pulmonaires humaines sont capables de produire du FVIII coagulant (Jacquemin *et al.*, 2006). Quelques années plus tard, Fahs *et al.* développent des modèles murins d'inactivation du gène codant pour le FVIII par le système Cre/LoxP, permettant une inactivation spécifique dans un tissu ou un type cellulaire. Ainsi, le contrôle de l'enzyme Cre recombinase par le promoteur de l'Albumine permet de cibler l'inactivation génique dans les hépatocytes, tandis qu'un contrôle par récepteur Tie-2 (récepteur de l'angiopoïétine-1) ou de la VE-cadhérine (vascular endothelium cadherin) permet de cibler les cellules endothéliales. Grâce à ce système, ces auteurs ont démontré que les souris dont les hépatocytes n'exprimaient pas le *F8*, ne présentaient pas de troubles de la coagulation et n'étaient pas hémophiles (phénotype comparable aux souris contrôles). A l'inverse, l'inactivation du gène *F8* dans les cellules endothéliales micro-vasculaires était associée à une hémophilie sévère (Fahs *et al.*, 2014). En 2016, Pan *et al.* s'intéressent aux sous-types de cellules endothéliales pouvant exprimer le FVIII, chez la souris. Dans un premier temps, ils montrent par analyses transcriptomiques que l'ARNm *F8* est exprimé par : les LSEC ; les LEC (lymphatic endothelial cells) de nœuds lymphatiques mésentériques et sous-cutanés ; les cellules endothéliales glomérulaires rénales ; et les HEV (high endothelial venules, impliquées dans le recrutement des lymphocytes du sang circulant) de nœuds lymphatiques mésentériques et périphériques. A l'inverse, l'ARNm du *F8* n'est pas détecté dans les cellules endothéliales de l'endothélium vasculaire, ni dans les cellules endothéliales des capillaires de la moelle osseuse, du cerveau, du cœur, des intestins, des

nœuds lymphatiques, des poumons, des muscles, des plaques de Peyer, de la rétine et des testicules. Par la suite, ils ont analysé l'activité du FVIII à partir de lysats cellulaires et de surnageants de cellules en culture. Les résultats montrent une activité du FVIII exprimé par les LEC pulmonaires et de nœuds lymphatiques, ainsi que les LSEC et les HDLEC (human dermal lymphatic endothelial cells). Pour conclure, parmi les sous-types de cellules endothéliales analysés, les LEC, les cellules endothéliales de capillaires fenêtrés et sinusoides ainsi que des veinules synthétisent du FVIII, mais pas les cellules endothéliales de capillaires continus (Pan *et al.*, 2016).

Toutefois, la production de FVIII ne serait pas restreinte aux cellules endothéliales. En effet, Follenzi *et al.*, se questionnent sur la production de FVIII par les cellules dérivées de la moelle osseuse. Pour répondre à cette question, ils ont transplanté chez des souris hémophiles de la moelle osseuse de donneur sain. Afin d'étudier spécifiquement la moelle osseuse des donneurs sains, ils ont irradié les souris avant la greffe et ont utilisé un traqueur génétique (moelle osseuse saine marqué GFP⁺ et LacZ⁺). L'équipe a observé que les cellules dérivées de la moelle osseuse du donneur sont majoritairement des cellules mononucléées (analyses effectuées sur l'ensemble des cellules mononucléées) et des cellules souches mésenchymateuses (MSC), rarement des hépatocytes et des cellules endothéliales. Ils constatent que ce sont les MSC et les cellules mononucléées qui expriment l'ARNm codant pour le FVIII, et non les rares hépatocytes et cellules endothéliales. De plus, en injectant des cellules de Kupffer ou des MSC saines chez des souris hémophiles, ils ont constaté que du FVIII circulant était détecté chez ces souris, et qu'elles survivaient aux saignements induits (Follenzi *et al.*, 2012).

Aujourd'hui, bien qu'il semble acquis que le foie, et plus particulièrement les LSEC, joue un rôle majeur dans la production du FVIII coagulant, il est montré que d'autres tissus sont capables d'en produire, rendant son origine cellulaire toujours incertaine et controversée.

c. Régulation de l'expression du gène F8

La séquence promotrice du gène *F8* et les éléments modulant son expression sont mal caractérisés et biaisés en raison de son origine cellulaire controversée. En 2019, des analyses *in silico* ont été réalisées afin de prédire les facteurs de transcription susceptibles d'être impliqués dans la régulation de l'expression du gène *F8*. Pour chaque facteur de transcription,

2 paramètres ont été considérés : le nombre de nucléotides reconnus par le facteur de transcription et le nombre de séquences consensus dans la séquence promotrice du gène *F8* (Merlin *et al.*, 2019). Ces analyses confirment la présence de sites de fixation aux facteurs de transcription HNF1, HNF3, CEBP α et CEBP β , observés par Figueiredo et Brownlee en 1995 (Figueiredo and Brownlee, 1995). Toutefois, elles prédisent aussi la présence d'autres sites de fixation pour des facteurs de transcriptions endothéliaux et hématopoïétiques (Tableau VI).

Tableau VI : Facteurs de transcription potentiels du gène *F8*

Facteurs de transcription	Nombre de séquences reconnues	Expressions et fonctions	
TFII-D (7 nucléotides)	5	ARN polymérase II	
TBP (10 nucléotides)	3	TATA binding protein	
HNF3-α (8 nucléotides)	2	Hépatocytes	} Hépatocytes
HNF1-α (8 nucléotides)	3	Hépatocytes	
C/EBP-α (7 nucléotides)	5	Hépatocytes, différenciation myéloïde	
c-Ets-1 (7 nucléotides)	7	Cellules endothéliales	
c-Ets-2 (9 nucléotides)	4	Cellules endothéliales	
PEA 3 (9 nucléotides)	2	Famille c-Ets	
STAT4 (6 nucléotides)	16	Lignée myéloïde	} Cellules hématopoïétiques
GATA-1 (6 nucléotides)	8	Lignée myéloïde	
NF-γ (8 nucléotides)	2	Augmenté pendant la différenciation monocytes/macrophages	
IRF-2 (6 nucléotides)	3	Monocytes	
STAT1 (10 nucléotides)	1	Cellules hématopoïétiques	
TCF-4E (10 nucléotides)	1	Lymphocytes B	
Pax5 (7 nucléotides)	3	Lymphocytes B	
NF-AT1 (10 nucléotides)	2	Lymphocytes T	
Fox P3 (7 nucléotides)	3	Lymphocytes T régulateurs	

Facteurs de transcription dont le site de fixation sur le promoteur du gène *F8* est prédit par analyses *in silico*, associés au nombre de nucléotides reconnus et le nombre de séquences consensus dans la séquence promotrice d'après Merlin *et al.*, 2019.

Plus récemment, une équipe italienne s'est intéressée aux rôles des facteurs de transcription Ets-1 et Ets-2 dans la régulation de la transcription du gène *F8*, en s'appuyant sur les prédictions apportées par l'étude de Merlin *et al.* (Famà *et al.*, 2020). L'équipe a analysé l'activité du promoteur du gène *F8* en utilisant un gène rapporteur (le gène luciférase sous le contrôle du promoteur *F8*). Ils ont mis en évidence une augmentation de l'activité du promoteur *F8* en présence d'Ets-1 seul, et une activité encore plus forte en présence d'Ets-1/Ets-2. Ets-2 seul n'a pas d'effet sur l'activité du promoteur *F8*. Ets-1 et Ets-2 sont des facteurs de transcription de la famille Ets, connus pour avoir un rôle essentiel dans la survie des cellules endothéliales embryonnaires, ainsi que dans l'angiogenèse adulte. Ils sont connus pour cibler de nombreux gènes, notamment *KDR* (récepteur du vascular endothelial growth factor 2), *FLT1* (récepteur du vascular endothelial growth factor 1), *VWF*, ou encore *CDH5* (VE-cadhérine). Chez l'adulte, l'expression d'Ets-1 est maintenue à un très faible niveau dans l'endothélium au repos. Son expression est induite en réponse à des stimuli pro-angiogènes ou pro-inflammatoires, comme le TNF- α (tumor necrosis factor α), l'HGF (hepatocyte growth factor) et le PDGF (platelet-derived growth factor) (Famà *et al.*, 2020). Bien que ces résultats éclaircissent les mécanismes régulant la transcription du gène *F8*, ils restent peu connus à ce jour.

3) Structure de la protéine FVIII

L'ARNm du FVIII code pour une chaîne polypeptidique de 2351 acides aminés, incluant un peptide signal de 19 acides aminés (permettant sa translocation dans la lumière du réticulum endoplasmique), et la séquence du FVIII de 2332 acides aminés. Le FVIII est synthétisé sous la forme d'un précurseur de 300 kDa. C'est une glycoprotéine multi-domaines composée d'un triple domaine A, d'un domaine B et d'un double domaine C arrangés ainsi : a1-A1-a2-A2-B-a3-A3-C1-C2 (Figure 5A). Les parties a1, a2 et a3 des domaines A sont des régions charnières flexibles, riches en acides aminés acides et présentant des sites d'activation (Pipe, 2009; Venkateswarlu, 2010). Selon différentes espèces comme la souris, le porc ou le chien, la séquence d'acides aminés est hautement homologue, à l'exception du domaine B. En effet, pour les domaines A et C, les séquences présentent entre 77 et 92% d'homologie entre elles, contre 44 à 62% seulement pour le domaine B. De plus, le domaine B ne présente aucune homologie de séquence avec d'autres protéines connues, contrairement aux domaines A et C (Cameron *et al.*, 1998; Elder *et al.*, 1993; Healey *et al.*, 1996; Thompson, 2003). Au cours de son

activation, le FVIII perd son domaine B suite à un clivage protéolytique. Dans la structure tridimensionnelle du FVIII sans domaine B, les 3 domaines A forment un triangle dont les domaines A1 et A3 servent de base et interagissent avec les domaines C1 et C2 (Figure 5C) (Ngo *et al.*, 2008).

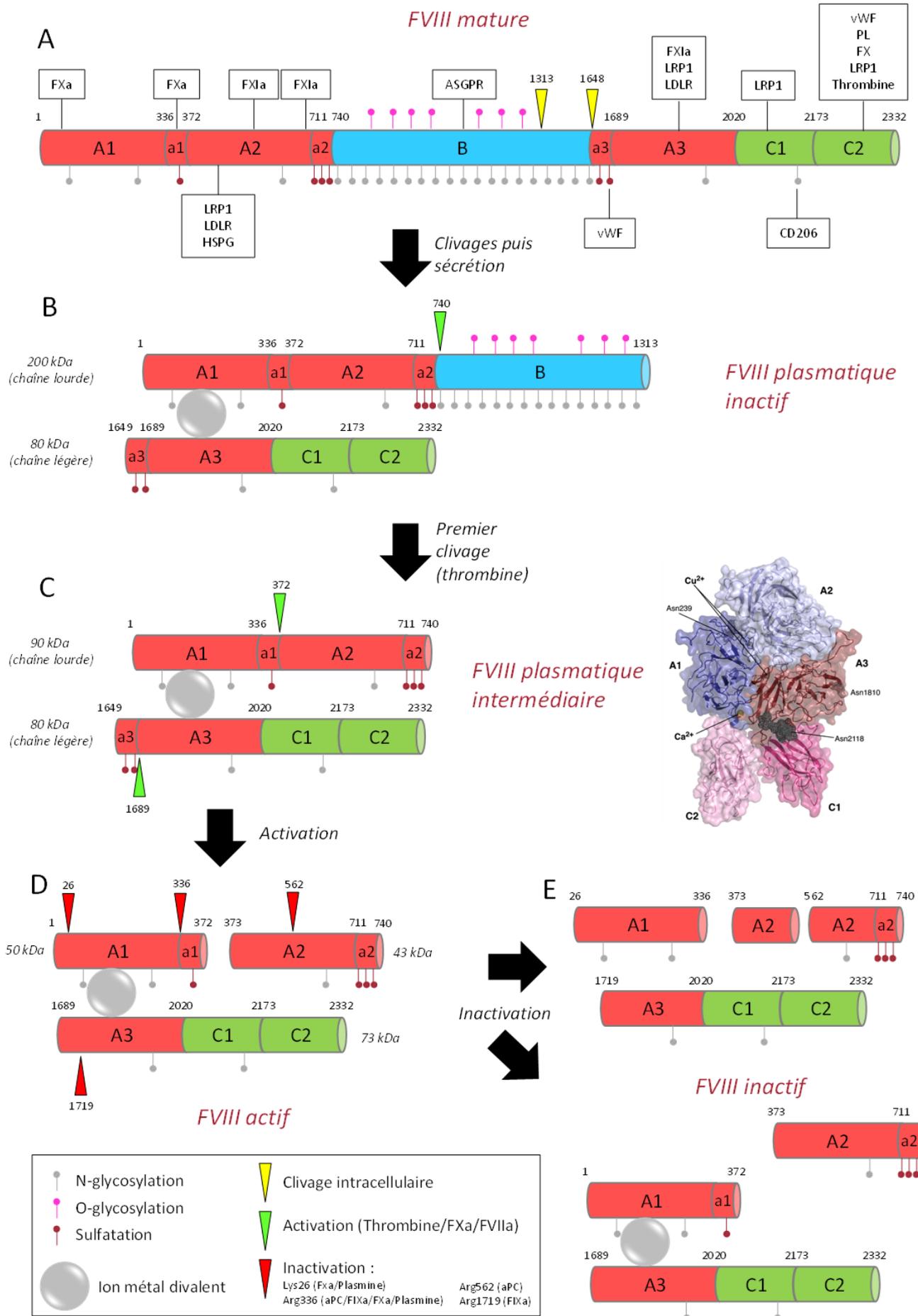


Figure 5 : Structure et devenir du FVIII. **A)** FVIII mature de 2332 acides aminés, avec ses modifications post-traductionnelles et ses différents sites de fixations. Les marques jaunes représentent les clivages catalysés par les protéases dans l'appareil de Golgi avant sa sécrétion. **B)** Sous cette forme, le FVIII inactif circule dans le sang lié au VWF (non représenté ici). C'est un hétérodimère composé d'une chaîne lourde de 200 kDa (A1-A2-B) et d'une chaîne légère (A3-C1-C2) de 80kDa. La marque verte représente le premier site de clivage du FVIII, catalysé par la thrombine en vue de son activation. **C)** Forme intermédiaire du FVIII, composée d'une chaîne lourde de 90 kDa et de chaîne légère de 80 kDa. A droite est représentée la structure tridimensionnelle de la forme intermédiaire (Ngo et al., 2008). Les marques vertes représentent les clivages catalysés par la thrombine et le FXa (Arg372) et seulement par la thrombine pour l'Arg1689. **D)** FVIII actif, pouvant interagir avec les phospholipides membranaires (PL), le FIXa (enzyme dont il est le co-facteur) et le FXa dans le complexe tenase. A ce stade, le FVIIIa n'interagit plus avec le VWF. Les marques rouges représentent les clivages catalysés majoritairement par la protéine aPC, en vue de son inactivation. **E)** FVIII inactivé par dégradation protéolytique ou par dissociation spontanée du domaine A2, pouvant être internalisé pour son élimination de la circulation sanguine. Sous cette forme, il va pouvoir interagir avec les récepteurs de clairance comme LRP1, Siglec-5, Stabiline-2 ou CLEC4M, ainsi qu'avec CD206 pour une présentation antigénique (Lenting et al., 2010; Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016; Ngo et al., 2008; Pipe, 2009).

a. Modifications post-traductionnelles du FVIII

Après sa traduction, le FVIII va subir une série d'étapes de modification avant sa sécrétion. En effet, la protéine est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles, comme la N-glycosylation, la sulfatation et la protéolyse (Figure 5A) (Pipe, 2009).

Durant sa traduction, la protéine FVIII va être glycosylée. Le FVIII va ainsi présenter environ 25 N-glycosylations, dont 19 sont localisées au niveau du domaine B (Figure 5A). Ces glycosylations sont impliquées dans le routage intracellulaire et le repliement de la molécule. En effet, ces glycosylations préviennent les agrégations et les repliements intermédiaires, et assurent l'accrochage des protéines chaperonnes comme la calréticuline et la calnexine, ainsi que les protéines de transport LMAN1 (lectine, mannose-binding protein 1) et MCFD2 (multiple coagulation factor deficiency-2). La calréticuline et la calnexine vont permettre le repliement du FVIII, puis le complexe LMAN1/MCFD2 va prendre en charge son transport du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. De plus, le domaine A1 interagit avec la protéine chaperonne BiP (Binding-immunoglobulin protein) dans le réticulum endoplasmique via son résidu Phe309Ser, ayant aussi un rôle dans le repliement et la bonne conformation de la protéine FVIII (Lenting *et al.*, 2010; Miao *et al.*, 2004; Pipe, 2009).

Dans l'appareil de Golgi, la protéine FVIII va subir une protéolyse partielle avant sa sécrétion, par des protéases à sérines. Le FVIII sera alors composé de 2 chaînes polypeptidiques : une chaîne lourde d'environ 200 kDa (A1-a1-A2-a2-B) et d'une chaîne légère de 80 kDa (a3-A3-C1-

C2) liées entre elles par un ion métallique divalent (Figure 5B) (Lenting *et al.*, 2010; Pipe, 2009). L'identité de l'ion métallique responsable de l'interaction entre la chaîne lourde et la chaîne légère est controversée. En effet, en 1983, une équipe montre par spectrophotométrie la présence de calcium sur du FVIII purifié, mais pas d'ion métallique comme le manganèse, le magnésium ou le cuivre (Mikaelsson *et al.*, 1983). Wakabayashi *et al* en 2001 observent que les 2 chaînes sont capables d'interagir en l'absence d'ion divalent. Néanmoins, ils montrent que l'affinité des 2 chaînes est 100 fois plus importante en présence de 0.5 μM de Cu^{2+} , tandis que l'affinité n'est pas modifiée en présence de 25 mM de Ca^{2+} (Wakabayashi *et al.*, 2001). Une étude sur la structure tridimensionnelle du FVIII met en évidence la présence des structures fixant 2 ions cuivre, ainsi qu'un ion calcium (Ngo *et al.*, 2008). De plus, le FVIII va subir des modifications de ses N-glycanes en structure complexe, environ 7 O-glycosylations (au niveau du domaine B, positions exact inconnues) et des sulfatations de tyrosines spécifiques. Les sulfatations de tyrosines sont retrouvées dans les régions acides de la molécule (a1, a2 et a3), qui contiennent des motifs enrichis en acides aminés chargés négativement. Ces résidus sulfates ont un rôle important dans l'activation du FVIII médiée par la thrombine, ainsi que dans son interaction avec différentes protéines comme le VWF (Lenting *et al.*, 2010; Pipe, 2009). Une fois sécrété, cet hétérodimère circule dans le sang sous forme inactive (Mazurkiewicz-Pisarek *et al.*, 2016; Ngo *et al.*, 2008; Pipe, 2009).

b. Domaines A

Les domaines A présentent environ 30% d'homologie de séquences entre eux (Wood *et al.*, 1984), ainsi que 40% d'homologie avec le facteur V et la cérulospasme (protéine impliquée dans le transport du cuivre dans le sang) (Fang *et al.*, 2007). Il existe 3 domaines A dans la structure du FVIII : A1-a1 contenant 372 acides aminés (1-372) ; A2-a2 contenant 368 acides aminés (373-740); A3 contenant 372 acides aminés (1649-2020) (Figure 5A). Chaque domaine contient une structure en tonneau- β hautement conservée, semblable à une conformation typique d'un domaine cupredoxine-like (domaine interagissant avec un ion cuivre). Les domaines A1 et A3 présentent chacun un atome de cuivre, qui serait responsable de l'interaction entre la chaîne lourde et la chaîne légère. Le domaine A1 présente également un ion calcium, nécessaire au maintien de l'interaction entre le domaine A1 et C2. Par ailleurs, Wakabayashi *et al* ont montré que la présence de Cu^{2+} augmente l'activité du FVIII de 60%

(comparé au FVIII sans ions métallique) en plus d'augmenter l'affinité des 2 chaînes polypeptidiques. La présence d'ions Ca^{2+} augmente l'activité du FVIII de 30%, mais n'a pas d'effet sur l'affinité des 2 chaînes (Figure 5D) (Ngo *et al.*, 2008; Wakabayashi *et al.*, 2001).

Les domaines A jouent un rôle majeur dans l'interaction du FVIII avec le VWF, son activation et inactivation, son activité coagulante ainsi que sa clairance (Mazurkiewicz-Pisarek *et al.*, 2016; Ngo *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2003).

Domaine A1

Le domaine A1 se situe sur la chaîne lourde de la protéine FVIII et comporte différents sites de clivage ainsi qu'un site de fixation au facteur X. Il existe 3 sites de clivage au niveau du domaine A1 : l'un impliqué dans l'activation du FVIII, les deux autres impliqués dans l'inactivation du FVIIIa (Lenting *et al.*, 2010; Ngo *et al.*, 2008; Pipe, 2009). Le premier clivage est situé après l'Arg372, séparant le domaine A1 du domaine A2. Il est impliqué dans l'activation de la protéine FVIII, et est catalysé majoritairement par la thrombine, mais aussi par le FXa (Nogami *et al.*, 2004, 2008). Les deux sites de clivages impliqués dans l'inactivation du FVIIIa sont situés après la Lys36 et après l'Arg336. Le premier est catalysé par le FXa et la plasmine, tandis que le deuxième est catalysé par la protéine aPC (activated protein C, inhibiteur majeur de l'activité du FVIIIa), le FIXa, le FXa et la plasmine (Figure 5). De plus, le domaine A1 interagit avec la protéine chaperonne BiP dans le réticulum endoplasmique, permettant le repliement et la bonne conformation de la protéine FVIII (Fang *et al.*, 2007; Lenting *et al.*, 2010).

La région charnière a1 forme 2 hélices α qui connectent le domaine A1 avec le domaine A2. Le site de fixation au FX se situe sur cette région (résidus 361-363). Le complexe FVIIIa/FIXa va avoir pour rôle d'activer le FX ; le FVIIIa étant le co-facteur de l'enzyme FIXa. Ce site de fixation contribue au bon accrochage du FX durant son activation par le complexe. De plus, le domaine A1 apparaît comme nécessaire à la bonne orientation du domaine A2 pour assurer sa fixation au FIXa (Figure 5) (Fang *et al.*, 2007; Lenting *et al.*, 2010; Mazurkiewicz-Pisarek *et al.*, 2016; Miao *et al.*, 2004; Ngo *et al.*, 2008; Pipe, 2009; Wang *et al.*, 2003).

Domaine A2

Le domaine A2 se situe également sur la chaîne lourde de la protéine FVIII et comporte différents sites de clivages et de fixation pour diverses protéines. Il existe 3 sites de fixation au niveau du domaine A2 : deux impliqués dans sa fonction coagulante, et un impliqué dans sa clairance. Les deux premiers sites de fixation sont situés au niveau des résidus 558-565 et 698-712, et permettent la fixation du FIXa. Ce sont des sites de haute affinité, ayant un rôle essentiel dans le renforcement de l'activité enzymatique du FIXa (Lenting et al., 2010; Ngo et al., 2008; Pipe, 2009). Le troisième site de fixation se situe sur les résidus 484-509, et permet la fixation de récepteurs et protéines impliqués dans la clairance du FVIII comme LRP1 (Low density lipoprotein - receptor-related protein 1), LDLR (Low density lipoprotein-receptor) ou encore HSPG (heparan-sulphate proteoglycans) (Lenting et al., 2010) (Figure 5).

Au sein du domaine A2, il existe 2 sites de clivage : l'un impliqué dans l'activation du FVIII, l'autre dans son inactivation. Le premier est catalysé par la thrombine et se situe après l'Arg740 (entre le domaine A2 et le domaine B). Il a pour rôle d'éliminer le domaine B et faciliter l'activation de la protéine FVIII. Le deuxième est catalysé par la protéine aPC et se situe après l'Arg562. Ce clivage entraîne une perte d'affinité du FVIIIa pour le FIXa et participe donc à l'inactivation de FVIIIa (Figure 5) (Fang *et al.*, 2007; Lenting *et al.*, 2010; Mazurkiewicz-Pisarek *et al.*, 2016; Ngo *et al.*, 2008; Pipe, 2009; Wang *et al.*, 2003).

Domaine A3

Contrairement aux domaines A1 et A2, le domaine A3 se situe sur la chaîne légère de la protéine FVIII, et comporte 3 sites de fixation ainsi que 2 sites de clivages. Le premier site de fixation se situe au niveau de la partie a3, sur la tyrosine sulfatée 1680. Il joue un rôle essentiel dans la fixation du VWF, ayant pour rôle de protéger le FVIII d'un clivage prématuré. Le deuxième est un site de fixation de haute affinité au FIXa, localisé au niveau des résidus 1811-1818. Le troisième site de fixation se situe sur les résidus 1804-1934 et permet la fixation des récepteurs LRP1 et LDLR impliqués dans la clairance du FVIII. Les 2 derniers sites se chevauchent (Figure 5A) (Lenting et al., 2010; Mazurkiewicz-Pisarek et al., 2016; Ngo et al., 2008).

Le premier site de clivage est catalysé par la thrombine. Il se situe après l'Arg1689 et a pour rôle d'éliminer la partie a3, rendant le FVIII instable et diminuant l'affinité du VWF pour le FVIII.

Il permet donc son activation. Le deuxième site de clivage est catalysé par la protéine FIXa et se situe après l'Arg1719. Il entraîne la perte d'affinité du FVIIIa pour le FIXa, ce qui engendre l'inactivation du FVIIIa (Figure 5) (Fang *et al.*, 2007; Lenting *et al.*, 2010; Mazurkiewicz-Pisarek *et al.*, 2016; Ngo *et al.*, 2008; Pipe, 2009; Wang *et al.*, 2003).

c. Domaine B

Le rôle du domaine B, situé sur la chaîne lourde de la protéine FVIII, est mal connu à ce jour. Il est codé par un unique exon (l'exon 14), s'étendant de l'acide aminé 741 à l'acide aminé 1648 (soit 908 acides aminés) et représentant 40% de la masse de la protéine FVIII (Mazurkiewicz-Pisarek *et al.*, 2016; Pipe, 2009). Contrairement aux domaines A et C, le domaine B ne présente aucune homologie de séquence avec d'autres protéines connues, y compris le domaine B du facteur V (Pipe, 2009). Néanmoins, le domaine B partage avec le facteur V la caractéristique particulière d'être largement glycosylé (O et N-glycosylation) sur les résidus asparagine, sérine et thréonine (Figure 5A) (Lenting *et al.*, 2010; Pipe, 2009). Bien que ce domaine n'ait pas d'impact direct dans l'activité pro-coagulante du FVIII, il est montré qu'il joue un rôle majeur dans le routage et le repliement de la protéine FVIII dans la cellule, ainsi que dans sa sécrétion. De plus, il semble impliqué dans différentes étapes du cycle de vie du FVIII (Pipe, 2009).

Rôle intracellulaire

Dans la cellule, le domaine B joue un rôle majeur dans le devenir de la protéine FVIII nouvellement synthétisée, jusqu'à sa sécrétion. La grande quantité de mannose présente sur les N-glycanes du domaine B interagit avec la calnexine (protéine de la membrane du réticulum endoplasmique) et calréticuline (protéine de la lumière du réticulum endoplasmique) (Pipe, 2009; Pipe *et al.*, 1998). Ce sont des protéines chaperonnes impliquées dans le repliement de glycoprotéines, et dans le contrôle de sa bonne conformation (Ellgaard and Helenius, 2003). Grâce à ces interactions, le FVIII va se conformer dans sa structure tertiaire. Une fois la structure tridimensionnelle du FVIII correctement établie, il doit quitter le réticulum endoplasmique pour l'appareil de Golgi. Le complexe récepteur-cargo spécifique, composé de la protéine transmembranaire LMAN1 et de son partenaire soluble MCFD2, est nécessaire pour assurer ce

transfert. L'interaction entre le complexe LMAN1/MCFD2 et le domaine B est dépendante des N-glycanes présents sur ce domaine (Figure 5) (Pipe, 2009; Zhang et al., 2005).

Une fois dans l'appareil de Golgi, le FVIII est protéolysé. En raison de la conformation tridimensionnelle du FVIII, le domaine B est particulièrement sujet à la protéolyse. La structure du domaine ainsi que le motif « Arg-X-X-Arg » est reconnue par des protéases à sérines intracellulaires de la famille subtilisin-like. Le FVIII est alors clivé au niveau de son domaine B, au niveau des acides aminés 1313 et 1648, pour générer la chaîne lourde et la chaîne légère de la protéine (Figure 5B). Une portion du domaine B de 572 acides aminés persiste donc sur la protéine FVIII inactive sécrétée, contenant 15 des 19 sites de N-glycosylation (Pipe, 2009; Zimmermann *et al.*, 2014).

Rôle plasmatique

Contrairement au milieu intracellulaire, le rôle du domaine B dans la circulation sanguine est relativement peu connu. Il est acquis que le domaine B n'a pas d'impact sur l'activité coagulante du FVIII. Néanmoins, des études suggèrent que la partie conservée du domaine B pourrait limiter son activation, ainsi que moduler l'interaction du FVIII avec différentes molécules. Une étude suggère que la présence du domaine B inhibe l'interaction entre la protéine FVIII inactive et les plaquettes actives, de la même manière que le VWF mais dans une moindre mesure. L'étude compare l'affinité du FVIII inactif, délété ou non du domaine B, pour les plaquettes activées et montre que la présence du domaine B diminue cette affinité (Li and Gabriel, 1997).

Lors de l'activation du FVIII, la thrombine clive la glycoprotéine au niveau de l'Arg740, permettant d'éliminer le domaine B. Des études ont montré que cette élimination facilite l'accès de la thrombine aux 2 autres sites de clivage (Arg372 et Arg1689) permettant ainsi l'activation du FVIII. Ces études suggèrent donc que le domaine B protège le FVIII d'une activation prématurée (Newell and Fay, 2007; Pipe, 2009).

Le domaine B est susceptible de moduler l'internalisation du FVIII. L'ASGPR (asialoglycoprotein receptor) connu pour être impliqué dans l'endocytose de glycoprotéines de la circulation, est capable d'interagir avec le FVIII. En 2005, Bovenschen *et al* ont montré que le FVIII total, mais pas le FVIII délété du domaine B, est capable de se fixer à l'ASGPR. Leur étude montre que le domaine B se lie avec une forte affinité à l'ASGPR. Les N-glycanes semblent essentiels à cette

fixation, étant donné qu'un traitement enzymatique les éliminant abolit la fixation du FVIII au récepteur. Néanmoins, puisque le FVIIIa ne contient pas de domaine B, l'équipe suggère que l'ASGPR joue un rôle dans le contrôle qualité du FVIII sécrété et non dans la clairance, internalisant le FVIII partiellement glycosylé (Bovenschen *et al.*, 2005a; Pipe, 2009).

d. Domaines C

Les domaines C partagent approximativement 50% d'homologie entre eux. Ils partagent également 40% d'homologie avec le domaine C du facteur V (Du *et al.*, 2015). Il existe 2 domaines C dans la structure du FVIII : le domaine C1 de 153 acides aminés (2021-2172), et le domaine C2 de 160 acides aminés (2173-2332) (Figure 5) (Mazurkiewicz-Pisarek *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2003). Ces domaines, situés sur la chaîne légère de la protéine FVIII, ont une structure tridimensionnelle hautement similaire. Chaque domaine C projette 3 structures β en épingle à cheveux contenant des résidus basiques et hydrophobes sur le même plan (Figure 5D). Ces structures sont responsables de la fixation du FVIII aux phospholipides membranaires chargés négativement (Ngo *et al.*, 2008).

Le domaine C2 présente des particularités fonctionnelles. Il est connecté uniquement au domaine C1, ce qui lui procure une grande flexibilité (Ngo *et al.*, 2008). Ce domaine ne contient aucun site de clivage, mais contient différents sites de fixation, se situant au niveau des résidus 2303-2332. Il comporte les sites de fixation de 3 molécules essentielles au FVIII : le VWF assurant le maintien d'un FVIII inactif, les phospholipides membranaires essentiels à l'activité de coagulation du FVIIIa, ainsi que le FXa dont la fixation sur ce domaine permet l'inactivation du FVIIIa. De plus, au niveau des résidus 2173-2332 du domaine C2 se situe un site de fixation au récepteur LRP1, permettant la clairance du FVIII. Tous les sites de fixation se chevauchent (Figure 5A). Les modifications de la structure du FVIII au cours de son activation/inactivation permettent à chaque protéine d'interagir en temps voulu avec le FVIII. Le domaine C1 a pour rôle de faciliter les interactions entre le domaine C2 et le VWF, les phospholipides membranaires et le FXa. Comme le domaine C2, il contient également un site de fixation au LRP1 au niveau des résidus Lys2065 et Lys2092. Par ailleurs, il présente un N-glycane de type mannose au niveau de son résidu Asn2118 (Figure 5A). Ce N-glycane permet une interaction avec le récepteur CD206 présent à la surface des cellules dendritiques, entraînant l'internalisation du FVIII et sa présentation aux lymphocytes T CD4⁺ (Du *et al.*, 2015; Fang *et al.*,

2007; Lenting *et al.*, 2010; Mazurkiewicz-Pisarek *et al.*, 2016; Ngo *et al.*, 2008; Pellequer *et al.*, 2011).

3) Sécrétion du FVIII

La sécrétion de la protéine FVIII est dépendante de sa bonne conformation et de son routage intracellulaire. En raison de son interaction avec des protéines chaperonnes comme la calnexine, la calréticuline et BiP, une quantité significative de molécule FVIII est retenue dans le réticulum endoplasmique, ce qui limite donc sa sécrétion (Marquette *et al.*, 1995; Miao *et al.*, 2004). Le domaine B (principalement ses N-glycosylations) et le domaine A1 jouent un rôle majeur dans l'interaction du FVIII avec ces protéines chaperonnes. En 2004, Miao *et al.* ont étudié la sécrétion et l'activité de différents variants de FVIII : 1) une forme délétée du domaine B (BDD-FVIII) ; 2) une forme partiellement délétée du domaine B (présence des 226 premiers acides aminés de ce domaine, dont 6 N-glycosylations) appelée 226aa/N6 ; 3) un variant également délété du résidu Phe309Ser du domaine A1 (variant F309S/226aa/N6). L'objectif de l'étude était de développer un FVIII recombinant sécrété plus efficacement, avec une activité coagulante normale. Les résultats de ce travail ont montré tout d'abord que la délétion totale du domaine B résultait en un taux d'ARNm 17 fois supérieur, en raison d'une plus grande stabilité de celui-ci. La délétion complète du domaine B (BDD-FVIII) est responsable d'une sécrétion supérieure de seulement 30% de plus que le FVIII total, suggérant qu'une interaction intracellulaire limite encore la capacité de sécrétion. L'hypothèse des auteurs était que la protéine BiP soit responsable de cette limitation. En effet, étant donné que la protéine BiP présente une activité ATPase peptide dépendante, le relargage du FVIII par la protéine BiP et son transport hors du réticulum endoplasmique demande un haut niveau d'ATP. Ces auteurs observent une augmentation de la sécrétion et de l'activité du variant 226aa/N6, ainsi que du variant F309S/226aa/N6 dans une plus forte mesure, par rapport à BDD-FVIII. Le résidu Phe309Ser étant au cœur de la cavité hydrophobe responsable de l'interaction entre le FVIII et BiP, sa délétion limitait donc l'interaction, permettant alors d'augmenter la sécrétion du FVIII tout en réduisant l'énergie nécessaire à celle-ci et sans altérer son activité. De plus, l'ajout d'une partie du domaine B augmentait la sécrétion du FVIII sans altérer l'activité du FVIII. Ces résultats montrent le rôle majeur des domaines A1 et B dans la sécrétion et l'activité du FVIII (Miao *et al.*, 2004).

Les N-glycosylations de la protéine FVIII paraissent essentielles dans la bonne sécrétion du FVIII. En effet, l'inhibition de la N-glycosylation par un traitement à la tunicamycine réduit drastiquement la sécrétion du FVIII, qui est retrouvé en complexe stable avec la protéine BiP (Dorner et al., 1987). Dans le processus de sécrétion, le complexe LMAN1/MCFD2 forme un récepteur de protéine cargo spécifique ayant pour rôle de transporter le FVIII et le FV du réticulum endoplasmique vers le compartiment intermédiaire Golgi. Ce complexe interagit avec les N-glycosylations de la protéine FVIII, majoritairement présentes sur le domaine B. Une mutation du gène LMAN1 ou du gène MCFD2 induit un déficit combiné en facteurs V et VIII (F5F8D), un déficit de la coagulation rare. Ces protéines ont donc un rôle essentiel dans la sécrétion de ces deux facteurs de coagulation. Par ailleurs, les variants BDD-FVIII et 226aa/N6 sont correctement sécrétés malgré une perte de sites N-glycosylés du domaine B, suggérant que les N-glycosylations en dehors du domaine B sont importantes pour l'interaction du complexe LMAN1/MCFD2 avec le FVIII (Everett et al., 2014; Lenting et al., 2010; Miao et al., 2004).

A la suite de processus protéolytiques intracellulaires, le FVIII est sécrété sous forme d'hétérodimère inactif, lié par un ion métallique divalent. Il est composé d'une chaîne légère de 80 kDa (a3-A3-C1-C2), et d'une chaîne lourde (A1-a1-A2-a2-B) hétérogène, de poids variant entre 90 à 200 kDa. La protéolyse de la chaîne lourde, responsable de la variabilité du poids moléculaire du FVIII, s'effectue par sa partie C-terminale (Figure 5). Dans la majorité des cas, la forme sécrétée est composée d'une chaîne lourde de 200 kDa, se terminant par l'acide aminé Arg1313 et contenant 15 des 19 sites N-glycosylés du domaine B. Une fois dans la circulation sanguine, le FVIII circule en complexe avec sa protéine porteuse, le facteur de von Willebrand (VWF) (Pipe, 2009).

4) Complexe VWF-FVIII et demi-vie du FVIII

Le VWF est une glycoprotéine multimérique essentielle au maintien de l'intégrité du FVIII dans la circulation sanguine. Il sert de protéine chaperonne au FVIII, ayant pour rôle d'augmenter sa demi-vie dans la circulation. En effet, en absence de VWF (cas de la maladie de von Willebrand de type 3, un trouble sévère de l'hémostase), la demi-vie du FVIII plasmatique est de 2 à 3h (Tuddenham *et al.*, 1982). A l'inverse, la présence de VWF augmente drastiquement la demi-vie plasmatique du FVIII, se situant alors entre 12h et 14h, sans augmenter son expression par

le foie (Kaufman *et al.*, 1999). En se fixant au FVIII, le VWF va limiter son activation prématurée en l'absence de blessure, en bloquant son interaction avec le FIXa (Lenting *et al.*, 1994) ou les phosphatidylsérines exprimées à la surface membranaire (Pipe *et al.*, 2016; Saenko and Scandella, 1995). Par ailleurs, il va inhiber sa protéolyse prématurée par les protéines aPC et le FXa (Dimitrov *et al.*, 2012), ainsi que sa clairance en limitant son interaction avec les récepteurs LRP. La capacité du VWF à limiter les interactions du FVIII avec ces différentes protéines réside en la haute affinité du complexe FVIII-VWF ($K_d = 0.2 - 0.9 \text{ nM}$). C'est une liaison non covalente médiée par des liaisons hydrophobes et électrostatiques, s'effectuant par la chaîne légère du FVIII (domaines C2, C1 et a3), ainsi que la région D'D3 du VWF. Néanmoins le VWF ne protège pas le FVIII de la protéolyse par la thrombine (Terraube *et al.*, 2010). Dans des conditions physiologiques, les concentrations de FVIII et de VWF sont très différentes. Tandis que la concentration plasmatique de FVIII est de 100 à 250 ng/mL (approximativement 1 nM), celle du VWF est de 8 à 10 µg/mL (approximativement 50 nM), donnant un ratio molaire de FVIII:VWF d'environ 1:50. Ainsi, la plus grande majorité du VWF sanguin circule sous forme libre, tandis que 95 à 98% du FVIII circule en complexe avec le VWF (Dimitrov *et al.*, 2012; Pipe *et al.*, 2016).

La localisation où s'effectue l'interaction entre le VWF et le FVIII est un point important. Le VWF est exprimé et stocké en grande majorité par les cellules endothéliales dans les corps de Weibel-Palade, ainsi que par les mégacaryocytes dans les α -granules (Broos *et al.*, 2011; Rosenberg *et al.*, 1998). Bien que le FVIII soit également exprimé par certains sous-types de cellules endothéliales, le VWF et le FVIII ne sont majoritairement pas co-exprimés (Pipe *et al.*, 2016). L'interaction FVIII-VWF étant caractérisée par une vitesse d'association très rapide ($8.56 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), c'est immédiatement après la sécrétion du FVIII dans la circulation que le complexe se forme, dans la majorité des cas (Dimitrov *et al.*, 2012; Pipe *et al.*, 2016). Néanmoins, des études sur la maladie de von Willebrand (vWD) et l'hémophilie A suggèrent qu'il existe un stock de complexe VWF-FVIII dans les cellules exprimant les deux protéines. En effet, dans le cas d'une forme modérée de l'hémophilie A et de vWD, un traitement à la 1-desamino-8-D-arginine vasopressine (DDAVP) est utilisé pour stimuler rapidement le relargage de VWF et FVIII endogène, suggérant l'existence d'un stock intracellulaire de ces deux facteurs. A l'inverse, dans le cas d'une forme sévère de vWD (type 3, absence de VWF), ce traitement ne permet pas d'augmenter le taux de FVIII sanguin, suggérant que le VWF est nécessaire à la

formation d'un stock intracellulaire de FVIII (Mannucci *et al.*, 1981a). Grâce à ces observations, Rosenberg *et al.*, (1998) se sont intéressés au trafic et à la sécrétion du FVIII dans des cellules exprimant le VWF. En transfectant le FVIII ou le VWF dans la lignée AT-20 (utilisée pour analyser la sécrétion), ils ont mis en évidence que le FVIII seul n'était pas stocké dans des vésicules de stockage contrairement au VWF seul. Toutefois, en co-transfectant le FVIII et le VWF, ils démontrent que le FVIII se retrouve co-localisé avec le VWF dans les vésicules de stockage. A travers des mutations du VWF ou du FVIII, ils mettent également en évidence que le trafic du FVIII du réseau trans-golgien vers les vésicules de stockage est dépendante du VWF (Pipe *et al.*, 2016; Rosenberg *et al.*, 1998). Le VWF est donc un élément crucial à la protection du FVIII dans le sang, permettant une augmentation de sa demi-vie et de sa biodisponibilité. Il est important de noter que l'interaction FVIII-VWF est très dynamique, avec une vitesse d'association et de dissociation rapide (Pipe *et al.*, 2016).

5) Activation et inactivation : rôle du FVIIIa dans l'hémostase

Le VWF maintient la stabilité et la protection de l'hétérodimère FVIII. Lors d'une lésion de l'endothélium, le VWF se fixe à la matrice sous-endothéliale et participe à l'agrégation plaquettaire, ainsi qu'à la localisation du FVIII au site lésionnel. L'activation du FVIII en FVIIIa est nécessaire pour son action pro-coagulante dans le complexe tenase FVIIIa/FIXa. Cette activation s'effectue par un processus protéolytique médié par des sérine-protéases impliquées dans la coagulation, comme la thrombine, le FXa et le FVIIa. Son inactivation s'effectue soit par dissociation spontanée du FVIIIa, soit, de la même manière que son activation, par dégradation protéolytique médiée par les protéines aPC, le FXa, le FIXa et la plasmine (Kamikubo *et al.*, 2017; Lenting *et al.*, 2010; Samuelson Bannow *et al.*, 2019; Terraube *et al.*, 2010).

a. Activation du FVIII

A la suite d'une lésion d'un vaisseau sanguin, le facteur tissulaire (FT) est exposé à la circulation sanguine et forme un complexe avec le FVIIa. Le complexe tenase FVIIa/FT est une enzyme responsable de l'initiation et de la propagation du processus de coagulation, en activant le FIX et le FX. L'activation du FVIII s'effectue par différents mécanismes. Le complexe FVIIa/FT active

le FVIII, tandis qu'en parallèle il génère une petite quantité de thrombine qui active également le FVIII et les plaquettes. De même, le FXa généré par les complexes tenase FVIIa/FT et FVIIIa/FIXa active le FVIII (Figure 6A) (Furukawa *et al.*, 2019).

La thrombine est largement reconnue comme étant l'activateur majeur du FVIII *in vivo*. Elle clive le FVIII au niveau de l'Arg372 et de l'Arg740 de la chaîne lourde, ainsi qu'au niveau de l'Arg1689 de la chaîne légère. Tous ces sites de clivage sont localisés au niveau C-terminal des régions acides (a1, a2, a3) (Furukawa *et al.*, 2019; Mazurkiewicz-Pisarek *et al.*, 2016; Nogami *et al.*, 2000). L'interaction entre le FVIII et la thrombine s'effectue au niveau des domaines A2 et C2 du FVIII, et au niveau des exo-sites anioniques de la thrombine. Par ailleurs, les sulfatations des tyrosines des régions riches en acides aminés acides (a1, a2 et a3) peuvent interagir avec la thrombine, et jouent un rôle dans l'activation du FVIII par celles-ci. En effet, il a été montré par mutagenèse que les sulfatations au niveau des Tyr346 (a1) et Tyr1664 (a3) accélèrent le clivage du FVIII par la thrombine (Fay, 2004; Michnick *et al.*, 1994).

Le FXa est également connu pour activer le FVIII, en agissant sur les mêmes sites que la thrombine, mais de manière moins efficace (Fay, 2004; Venkateswarlu, 2010; Wang *et al.*, 2003). L'activité pro-coagulante d'un FVIIIa généré par le FXa est 4 fois plus faible que l'activité d'un FVIIIa généré par la thrombine. Par ailleurs, l'activation du FVIII par le FXa est inhibée en présence du VWF, contrairement à une activation par la thrombine (Nogami *et al.*, 1999). L'interaction entre le FXa et le FVIII s'effectue par la région a1 et le domaine C2 du FVIII, ainsi que par les exo-sites de la protéase FXa. Les sulfatations des tyrosines n'influencent pas la capacité du FXa à cliver le FVIII (Fay, 2004; Nogami *et al.*, 2004).

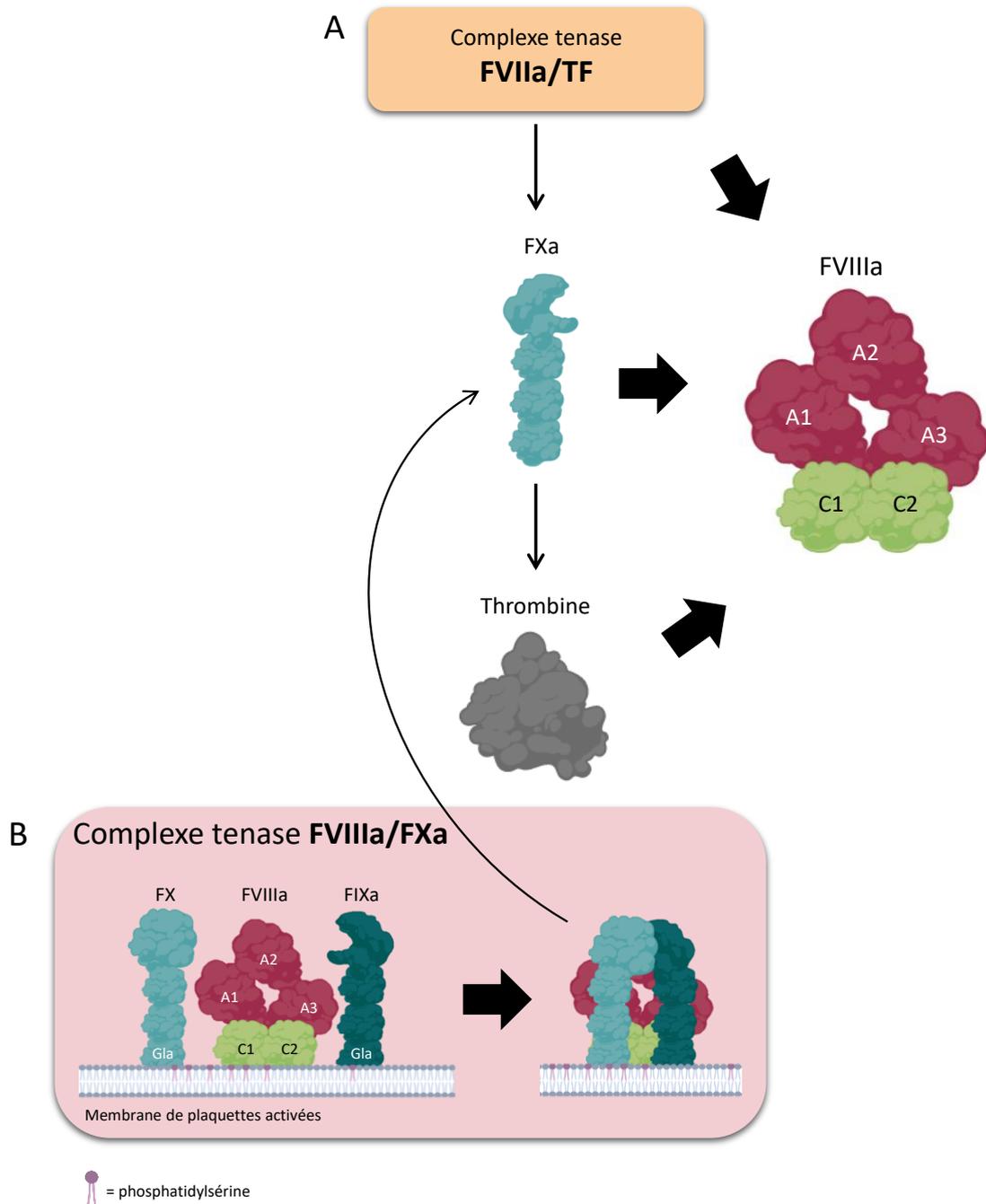


Figure 6 : Schématisation de l'activation et de l'activité du FVIII. **A)** L'activation du FVIII s'effectue par différents mécanismes. Dans un premier temps, le complexe tenase FVIIa/TF se forme et active le FVIII en FVIIIa, puis génère une petite quantité de FXa et de thrombine, qui active également le FVIII. En parallèle, le complexe tenase FVIIIa/FIXa se forme. (Furukawa et al., 2019). **B)** Le FVIIIa et le FIXa agissent majoritairement sur des plaquettes activées, présentant des phosphatidylsérines à leur surface. Le rôle du complexe est de catalyser l'activation du FX en FXa durant le processus hémostatique. Seul, le FIXa possède une très faible activité protéolytique. C'est en présence du FVIIIa, son cofacteur, que l'efficacité catalytique (rapport K_{cat}/K_m) du FIXa est significativement augmentée. Le FVIIIa est capable d'interagir avec le FX et le FIXa, et va orienter leur interaction (Ahmad and Walsh, 2005; Fang et al., 2019).

Le complexe FVIIa/FT est également capable d'activer par protéolyse le FVIII (Soeda *et al.*, 2010; Warren *et al.*, 1999). Le FVIIa active le FVIII au début du processus de coagulation, avant la boucle d'activation médiée par la thrombine (Kamikubo *et al.*, 2017). Cette activation est dépendante de la présence de FT et de phospholipides, et s'effectue par le clivage de l'Arg372 et de l'Arg740. La présence de VWF n'empêche pas l'activation du FVIII par le FVIIa. Il semble que le domaine C2 soit impliqué dans la fixation du FVIII au FT, mais le site précis n'est pas identifié. Par ailleurs, l'activation du FVIII par le FXa est augmentée en présence du FVIIa ou du FVII (Furukawa *et al.*, 2019).

Concernant la chronologie de la protéolyse du FVIII, l'hypothèse majeure est que le premier clivage s'effectue au niveau de l'Arg740, éliminant le domaine B pour faciliter le clivage des deux autres sites (Newell and Fay, 2007). La protéolyse Arg372 semble être la 2^{ème} étape du processus d'activation, permettant d'exposer un domaine critique pour l'interaction entre FVIIIa et FIXa, au niveau du domaine A2 (Newell and Fay, 2007; Venkateswarlu, 2010). Le dernier clivage, au niveau de l'Arg1689, permet de libérer le FVIIIa du VWF, en réduisant drastiquement l'affinité du FVIIIa pour le VWF (1400 fois plus faible), ce qui permet une activation complète du FVIII (Terraube *et al.*, 2010). L'activation résulte en une exposition de nombreux sites d'interactions, incluant ceux pour les phosphatidylsérines, FIXa, et le substrat FX. Ces clivages génèrent un FVIII actif sous la forme d'un hétérotrimère instable (Figure 5D) composé du domaine A1, du domaine A2, ainsi que de la chaîne légère composée des domaines A3-C1-C2 (Figure 5D) (Furukawa *et al.*, 2019; Mazurkiewicz-Pisarek *et al.*, 2016; Terraube *et al.*, 2010). L'instabilité de l'hétérotrimère est causée par le domaine A2. En effet le domaine A1 et la chaîne légère A3-C1-C2 interagissent par un ion métallique divalent. Cependant, l'association du domaine A2 avec le dimère A1/A3-C1-C2 est indépendante de cet ion. Elle est médiée par une interaction électrostatique et est réversible ($K_d \approx 260$ nM à pH physiologique) (Fay, 2004; Venkateswarlu, 2010).

Suite à sa libération du VWF, le FVIIIa va pouvoir interagir avec le FIXa sur une surface phospholipidique. L'interaction avec le FIXa va alors stabiliser le FVIIIa, et le complexe tenase FVIIIa/FIXa se forme, où le FVIIIa joue un rôle de cofacteur non-enzymatique (Fang *et al.*, 2007; Fay, 2004; Lenting *et al.*, 2010).

b. Formation du complexe tenase FVIIIa/FIXa

Le FVIIIa forme le « complexe tenase » avec le FIXa. Il sert de cofacteur non-enzymatique à la protéase FIXa pour activer le FX nécessaire à l'amplification de la coagulation. L'assemblage du complexe tenase est médié par des interactions protéine-protéine et protéine-lipide (Du *et al.*, 2015; Fay, 2006).

Après sa dissociation du VWF, le FVIIIa se fixe spécifiquement aux phosphatidylsérines des plaquettes activées, chargées négativement. En effet, l'activation des plaquettes provoque l'exposition d'un haut taux de phosphatidylsérines de charge nette négative à leur surface, permettant une fixation spécifique du FVIIIa (Gilbert, 2019; Gilbert and Arena, 1996; Gilbert and Drinkwater, 1993). Par ailleurs, le FVIIIa peut également se fixer sur des vésicules synthétiques contenant des phosphatidylsérines (Ahmad and Walsh, 2005; Hsu *et al.*, 2008). Les domaines C, et plus particulièrement le domaine C2 du FVIIIa, sont essentiels à sa fixation à la membrane plasmique. D'après des simulations de fixation membranaire, Du *et al.* (2015) montrent que les protubérances hydrophobes liant les structures tertiaires en tonneaux β présents sur les domaines C, sont responsables de la fixation du FVIIIa sur les phosphatidylsérines, via des interactions hydrophobes et électrostatiques. Le rôle des acides aminés hydrophobes protubérants du domaine C2 dans la fixation aux phosphatidylsérines a été préalablement démontré par mutagenèse ciblée (Gilbert *et al.*, 2002). Le point isoélectrique (pKi) des domaines C1 et C2 étant respectivement de 9,96 et 9,43, il est supposé que les charges positives des domaines C interagissent avec les charges négatives des plaquettes activées (Du *et al.*, 2015). En plus des interactions électrostatiques, les 4 protubérances hydrophobes présentes sur chacun des domaines C semblent importantes pour l'accrochage du FVIIIa à la membrane. En effet, des mutations de ces protubérances souvent observées dans des cas d'hémophilie A, induisent une diminution de la capacité de fixation du FVIIIa à la membrane plasmique plaquettaire (Du *et al.*, 2015). Du *et al.* ont ainsi proposé que l'accrochage du FVIIIa s'effectuerait en plusieurs étapes. Le domaine C2 s'approche de la surface membranaire par les forces électrostatiques, puis s'ancre au niveau des phosphatidylsérines par des liaisons hydrophobes. L'ancrage s'effectue par pénétration des protubérances du domaine C2 dans la bicouche lipidique. Cette fixation entraîne une modification de l'angle entre le domaine C1 et C2, facilitant l'approche du domaine C1 à la membrane. Puis, le domaine C1 va s'ancre de la même manière que le domaine C2,

permettant une fixation stable de la protéine FVIIIa à la surface des plaquettes activées (Du *et al.*, 2015). Les phosphatidylsérines sont importantes à l'activité cofacteur du FVIIIa, puisqu'elles multiplient par 1500 l'efficacité catalytique du complexe FVIIIa-FIXa (Gilbert and Arena, 1996). Bien que la grande majorité des études montrent l'importance des phosphatidylsérines pour la fixation et l'activité pro-coagulante du FVIIIa, certaines études montrent qu'il existe une autre forme de fixation du FVIII à la membrane plaquettaire, indépendante des phosphatidylsérines. En effet, des études chez le lapin et la souris montrent que le blocage de l'interaction entre le FVIIIa et les phosphatidylsérines n'entraîne pas de perturbation significative du processus hémostatique (Shi *et al.*, 2008; Thiagarajan and Benedict, 1997). Gilbert *et al.* (2015) analysent la fixation du FVIIIa sur des plaquettes activées par la thrombine ou par une faible concentration de calcium ionophore, présentant un faible taux de phosphatidylsérines à leur membrane. La quantité de phosphatidylsérines présente à la surface de ces plaquettes se situe sous le seuil nécessaire pour la fixation du FVIIIa (Gilbert *et al.*, 2015). En effet, en fonction des stimuli, le taux de phosphatidylsérines exposées à la surface des plaquettes varie. La stimulation plaquettaire par la thrombine ou une faible concentration de calcium ionophore entraîne l'exposition d'une faible quantité de phosphatidylsérines (1% à 4%). A l'inverse, une combinaison de thrombine et de collagène, ou une concentration plus élevée de calcium ionophore entraîne une exposition complète de phosphatidylsérines, estimée entre 12 et 15%. Dans ces conditions, les phosphatidylsérines sont considérées comme un élément critique pour la plupart des sites de fixation du FVIIIa présents à la surface des plaquettes (Comfurius *et al.*, 1994; Gilbert *et al.*, 1991). Toutefois, ces auteurs observent une fixation du FVIIIa à la surface des plaquettes présentant un taux de phosphatidylsérines inférieur au seuil nécessaire. Afin de déterminer si la fixation s'effectue ou non au niveau des phosphatidylsérines, ils ont évalué la compétition de la lactadhérine, une protéine se fixant spécifiquement aux phosphatidylsérines. Dans le cas de plaquettes activées par la thrombine et le calcium ionophore, la lactadhérine bloque 98% des sites de fixation du FVIIIa, indiquant que les phosphatidylsérines sont déterminantes. A l'inverse, sur des plaquettes activées uniquement par la thrombine, la lactadhérine bloque moins de 10% des sites de fixation au FVIIIa, indiquant que les phosphatidylsérines ne sont pas nécessaires à la fixation du FVIIIa dans ces conditions. De plus, la mutation des sites de fixation aux phosphatidylsérines n'empêche pas la fixation du FVIIIa, signifiant que les plaquettes activées par la thrombine présentent un site de fixation

indépendant des phosphatidylsérines. Par ailleurs, ces sites permettent une activité fonctionnelle du FVIIIa. Des analyses supplémentaires montrent que les sites de fixation indépendants des phosphatidylsérines sont majoritairement situés au niveau de la fibrine soluble fixée au récepteur $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ des plaquettes. Cette fixation s'effectue par le domaine C2 du FVIIIa, est bloquée par le VWF et permet l'activité du FVIIIa. Néanmoins, ces découvertes n'éliminent pas l'importance des phosphatidylsérines dans la fonction pro-coagulante du FVIIIa sur les plaquettes stimulées dans le processus hémostatique (Gilbert *et al.*, 2015).

Une fois le FVIIIa fixé à la membrane plaquettaire, il va interagir avec la protéinase FIXa. Le FVIIIa est un cofacteur critique pour le FIXa durant le processus protéolytique du FX. L'activité protéolytique du FIXa seul est faible, mais augmente drastiquement après la fixation au FVIIIa. En effet, cette fixation, effectuée sur les phosphatidylsérines, améliore de 100 000 à 200 000 fois l'activité catalytique du FIXa. Par ailleurs, l'affinité entre le FVIIIa et le FIXa est plus faible quand le FVIIIa est plasmatique ($K_d \approx 1\text{nM}$), et augmente d'environ 10^3 quand les facteurs sont fixés à des phospholipides membranaires (Hsu *et al.*, 2008; Saenko *et al.*, 1999a). La liaison du FVIIIa et du FIXa requiert donc leur fixation à la surface d'une membrane plasmique, ainsi que la présence d'un ion calcium. D'après des analyses de cristallographie et de modélisation, Ngo *et al.* proposent que la fixation du FVIIIa à la membrane permet un changement conformationnel qui augmente l'affinité du FVIIIa et du FIXa. De même, la fixation du FIXa à la membrane entraînerait une modification de son angle par rapport à la surface, en faveur de son interaction avec le FVIIIa. L'interaction entre le FVIIIa et le FIXa s'effectue à travers les domaines A du FVIIIa, principalement par le domaine A3, qui possède une haute affinité pour le FIXa ($K_d \approx 14.8 \pm 3.2\text{ nM}$). Le domaine A2 possède une affinité plus faible ($K_d \approx 300\text{ nM}$) (Lenting *et al.*, 1994; Ngo *et al.*, 2008). La formation du complexe FVIIIa/FIXa à la surface membranaire prolonge de 10 fois la demi-vie du FVIIIa. En effet, le FIXa stabilise l'interaction entre le domaine A2 et l'hétérodimère A1/A3-C1-C2 du FVIIIa (Figure 5D), réduisant le taux de dissociation du domaine A2 et augmentant par 10 l'affinité de ce domaine avec l'hétérodimère A1/A3-C1-C2 (Fay, 2004; Saenko *et al.*, 1999a). Le domaine a1 est important pour la bonne orientation du domaine A2 pour sa fixation au FIXa (Fay, 2004). Le rôle du FVIIIa dans ce complexe est d'augmenter la constante catalytique (K_{cat}) et de diminuer la constante de Michaelis (K_m) du FIXa. Le FVIIIa, et principalement le domaine A2, augmente 10^6 fois la constante catalytique du FIXa (Fay, 2004; Venkateswarlu, 2010). Les mécanismes par lesquels

le FVIIIa augmente l'efficacité catalytique (rapport K_{cat}/K_m) pour la génération de FXa sont peu connus. Le site actif du FIXa est relativement éloigné de la surface membranaire, à environ 7 nm. Le domaine A2 interagit avec ce domaine catalytique, et est capable de moduler son activité par des mécanismes peu connus à ce jour (Fang *et al.*, 2019; Fay, 2004).

Le dernier élément du complexe est le FX, dont les informations concernant son interaction avec le FVIIIa sont peu nombreuses. Le FX va également se fixer à la membrane plasmique par son domaine Gl_a, pour interagir avec le FVIIIa et le FIXa. La présence du FX augmente par 15 l'affinité du FIXa pour le FVIIIa. Ce dernier va interagir avec le FX par son domaine A1 avec une affinité modérée ($K_d \approx 1 \text{ à } 3 \mu\text{M}$), ainsi que par son domaine C2. Par ailleurs, le domaine A1 interagit avec le domaine catalytique du FX (Ahmad and Walsh, 2005; Fay, 2004; Lapan and Fay, 1997; Nogami *et al.*, 1999).

Ce complexe tenase est donc un élément clé pour l'amplification de la cascade de coagulation. Dans ce complexe, le FVIIIa va faciliter l'interaction entre le FX et le FIXa, et va augmenter l'efficacité catalytique du FIXa pour l'activation du FX en FXa (Figure 6B).

c. Inactivation du FVIIIa

Pour diminuer l'activité du complexe tenase, une des options est d'inactiver le FVIIIa. Différentes voies ont été identifiées : 1) dissociation spontanée, 2) dégradation protéolytique médiée par les protéines aPC, FXa, FIXa et la plasmine (Lenting *et al.*, 2010).

Le FVIIIa étant une molécule hétérotrimérique instable, une dissociation spontanée du domaine A2 est possible, due à la réversibilité et la faiblesse de l'interaction entre ce domaine et les domaines A1/A3-C1-C2. Néanmoins, cette dissociation est inhibée par la présence de FIXa et de phospholipides. Une faible concentration en sels permet d'améliorer la stabilité de l'interaction avec le domaine A2, et augmente la conversion de FX en FXa environ 8 fois par rapport à une concentration physiologique (Wang *et al.*, 2003).

L'inactivation protéolytique du FVIIIa est le résultat du clivage de l'Arg336 et de l'Arg562 médié par la protéine aPC en présence de la protéine S, son cofacteur (Figure 5E). L'aPC est l'inactivateur majeur de la protéine FVIIIa. Il se fixe au niveau du domaine A3 de la protéine (Lenting *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2003). Son clivage en position Arg562 résulte en la perte du site de fixation au FIXa situé au niveau du domaine A2. Néanmoins, le FIXa protège

spécifiquement le clivage du FVIIIa au niveau de l'Arg562, mais cet effet est aboli en présence de la protéine S (Fay, 2004; Mazurkiewicz-Pisarek *et al.*, 2016; Pipe, 2009). Le clivage de l'Arg336 implique la libération de la région a1, altérant les interactions électrostatiques entre le domaine A2 et le reste de la protéine, et perturbant l'interaction entre le domaine A2 et le FX. Ce clivage rend alors la protéine moins efficace et plus instable (Fay, 2004; Lenting *et al.*, 2010). Une autre protéase à considérer est le FIXa. Dans le processus de dégradation, il faut prendre en compte que le FIXa joue 2 rôles opposés. D'un côté le FIXa protège le FVIIIa de la dégradation et stabilise la protéine. D'un autre côté, le FIXa peut inactiver le FVIIIa par protéolyse de l'Arg336, mais aussi de l'Arg1719 entraînant la perte d'affinité du FVIIIa pour le FIXa (Figure 5E) (Fay, 2004; Lenting *et al.*, 1998, 2010). De même, le FXa est capable à la fois d'activer le FVIII et de l'inactiver. En effet, il est capable de cliver l'Arg336, ainsi que la Lys36, altérant la conformation du domaine A1 (Figure 5E). Le FXa interagit avec FVIIIa par la région a1 (Nogami *et al.*, 2003). Par ailleurs, la plasmine clive également l'Arg336 et la Lys36 (Lenting *et al.*, 2010).

L'inactivation de la protéine FVIII est importante pour limiter l'activité du complexe tenase. Par la suite, le FVIII inactivé va être éliminé de la circulation par son internalisation par divers types cellulaires (Lenting *et al.*, 2010).

6) La clairance du FVIII

La majorité du FVIII est probablement éliminée de manière dépendante du VWF. Toutefois, les mécanismes de clairance du FVIII non activé, des sous unités dégradées ou du complexe FVIII-VWF ne sont que partiellement caractérisés (Swystun *et al.*, 2018, 2019a). Des études animales utilisant du FVIII radiomarqué montrent que le foie et la rate sont les sites majeurs pour la clairance du complexe FVIII-VWF, ainsi que les macrophages (Navarrete *et al.*, 2009; van Schooten *et al.*, 2008). Durant les deux dernières décennies, différents récepteurs impliqués dans la clairance du FVIII ont été décrits.

a. LRP1

Il est bien établi que le récepteur hépatique majeur responsable de la clairance du FVIII est le low-density-lipoprotein-receptor (LDLR) - related protein 1 (LRP1), membre de la famille des

LDLR, capable de reconnaître de nombreux ligands. C'est un récepteur endocytaire abondamment exprimé dans le foie, principalement au niveau des hépatocytes et des macrophages résidents (Young *et al.*, 2016). L'identification de ce récepteur comme étant impliqué dans la clairance du FVIII a été initialement reportée par Saenko *et al.*, et Lenting *et al.*, en 1999. Ces études montrent une interaction directe entre le FVIII et le récepteur LRP1, qui n'est pas inhibée par la présence de VWF, suggérant que la fixation du complexe est possible. Ils notent que les cellules exprimant LRP1 sont capables d'internaliser du FVIII radiomarqué, contrairement à des cellules déficientes en LRP1. Par ailleurs, l'internalisation du FVIII par LRP1 est inhibée de 70% en présence de la protéine RAP (receptor-associated protein), antagoniste prévenant la fixation d'un ligand sur LRP1 (Lenting *et al.*, 1999; Saenko *et al.*, 1999b). Sarafanov *et al.*, montrent *in vitro* et *in vivo* que l'internalisation du complexe radiomarqué FVIII/VWF par LRP1 est favorisée en présence d'HSPG à la surface membranaire. En effet, l'inhibition simultanée d'HSPG et de LRP1 entraîne une prolongation de la demi-vie du FVIII plus importante que l'inhibition de LRP1 seule (Sarafanov *et al.*, 2001). En 2003, Bovenschen *et al.*, confirment l'importance du récepteur LRP1 dans la clairance du FVIII, en démontrant qu'une délétion hépatique du gène *LRP1* chez la souris entraîne un doublement de la concentration plasmatique de FVIII, retarde de manière significative la clairance de FVIII injecté en intraveineux, et augmente sa demi-vie (Bovenschen *et al.*, 2003). Plus tard, ces auteurs montrent que LRP1 régule le taux de FVIII plasmatique également avec la contribution du récepteur LDLR (membre de la famille des LDLR), grâce à des souris déficientes en LRP1 et LDLR. Ils observent une augmentation synergique de la concentration plasmatique et de la survie du FVIII chez ces souris, suggérant que les LDLR contribuent au catabolisme du FVIII *in vivo* (Bovenschen *et al.*, 2005b).

Néanmoins, en présence de RAP la clairance du FVIII est inhibée à hauteur de 70%, signifiant qu'il existe d'autres mécanismes impliqués dans la clairance du FVIII (Lenting *et al.*, 1999; Pipe, 2009).

b. ASGPR

L'ASGPR (asialoglycoprotein receptor) est un membre de la famille des lectines de type-C (c'est-à-dire dépendant du calcium), abondamment exprimé dans les hépatocytes, ainsi que dans les cellules dendritiques et potentiellement les monocytes (Bovenschen *et al.*, 2005a; Gu *et al.*,

2019; Harris et al., 2012). Il est impliqué dans la fixation et l'endocytose de glycoprotéines de la circulation sanguine. En 2005, Bovenschen *et al.* montrent que le FVIII, plus particulièrement son domaine B, se fixe à l'ASGPR de manière dose-dépendante et avec une haute affinité ($K_d \approx 2$ nM). Un traitement enzymatique par l'endoglycosidase F abolit complètement les interactions entre FVIII et ASGPR, montrant que les N-glycosylations présentes sur le FVIII sont responsables de l'interaction. Par ailleurs, des analyses de clairance chez la souris ont révélé que la demi-vie du FVIII dans la circulation sanguine augmente en présence de l'ASOR (ASGPR-antagonist asialo-orosomucoïd), un antagoniste des ASGPR. Néanmoins, l'importance physiologique de cette interaction n'est pas connue, étant donné le rôle prédominant que joue le récepteur LRP1. L'hypothèse de l'équipe est que l'ASGPR joue un rôle dans le contrôle qualité du FVIII après sa sécrétion, en fixant et internalisant les molécules de FVIII incomplètement N-glycosylées (Bovenschen *et al.*, 2005a; Pipe, 2009).

c. Siglec-5

Siglecs (sialic-acid-binding-immunoglobulin-like-lectines) est une famille de récepteurs comprenant 14 membres, ayant chacun une affinité pour différents types de structures et de conformations d'acide sialique. Ils sont majoritairement exprimés par les cellules d'origine hématopoïétique comme les neutrophiles, les lymphocytes B, les monocytes, les cellules dendritiques et les macrophages. Chaque Siglec est exprimé préférentiellement sur un nombre limité de cellules. Par exemple, Siglec-5 est exprimé par les monocytes/macrophages (y compris par des lignées comme THP-1 et U937), les neutrophiles et les lymphocytes B. Étant donné que les macrophages sont importants pour la clairance du FVIII, et que le FVIII et le VWF présentent des structures sialylées, Pegon *et al.* (2012) se sont intéressés à Siglec-5 comme récepteur potentiel de la clairance de ces glycoprotéines (Pegon *et al.*, 2012; van Schooten *et al.*, 2008). L'équipe a analysé la fixation de VWF et FVIII sur une protéine Siglec-5 purifiée, ainsi que sur des cellules exprimant Siglec-5 *in vitro*. Les résultats montrent une interaction de Siglec-5 avec le FVIII ainsi que le VWF. Un traitement du VWF avec une sialidase résulte en une perte totale de l'interaction entre VWF et Siglec-5, suggérant que l'interaction est dépendante de l'acide sialique. À l'inverse, ce traitement n'affecte pas l'interaction entre FVIII et Siglec-5. Par ailleurs, ils observent une co-localisation de VWF et de FVIII avec des marqueurs endosomaux, suggérant que la fixation des protéines au récepteur Siglec-5 est suivie par l'endocytose de

celles-ci. Enfin, ils observent une diminution significative de la concentration en FVIII/VWF chez des souris sur-exprimant Siglec-5 dans leurs hépatocytes. Ces résultats suggèrent que le FVIII et le VWF peuvent être des ligands de Siglec-5 et que ce dernier peut contribuer à la régulation de la concentration plasmatique de VWF et FVIII, ainsi que du complexe FVIII/VWF (Pegon *et al.*, 2012).

d. Stabiline-2

La stabiline-2 (STAB-2) est un récepteur scavenger membre de la famille des lectines de type-C. Il est exprimé par les cellules endothéliales sinusoidales du foie (LSEC) et de la rate, ainsi que par des cellules immunitaires comme les macrophages. C'est un récepteur de clairance pour des glycosaminoglycanes comme l'acide hyaluronique (Lee *et al.*, 2011; Swystun *et al.*, 2018). Une mutation du récepteur STAB-2, diminuant son expression, est associée à une augmentation d'environ 30% de la concentration plasmatique du FVIII et du VWF, suggérant qu'il est impliqué dans la régulation du taux de ces protéines (Huffman *et al.*, 2015). En 2018, Swystun *et al.* observent que l'interaction entre STAB-2 et FVIII est faible en absence de VWF. Des analyses de clairance sur des souris n'exprimant pas STAB-2 ou VWF ont mis en évidence que la clairance du FVIII par STAB-2 est dépendante de la présence de VWF. STAB-2 est un récepteur capable d'internaliser le VWF seul, ainsi que le complexe FVIII-VWF (Swystun *et al.*, 2018).

e. CLEC4M

CLEC4M (C-type lectin domain family 4 member M) est également un membre de la famille des lectines de type-C, exprimé par les LSEC (Swystun *et al.*, 2018). Il a été caractérisé comme étant un récepteur de clairance du VWF, en le fixant par ses N-glycanes pour son internalisation (Rydz *et al.*, 2013). CLEC4M est également décrit comme un récepteur d'adhérence à des pathogènes comme le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) (Bashirova *et al.*, 2001). Récemment, Swystun *et al.* se sont intéressés à la capacité de CLEC4M d'agir comme un récepteur d'endocytose du FVIII, en présence ou non du VWF. Par l'utilisation de HEK293 exprimant CLEC4M *in vitro*, ils ont mis en évidence que le FVIII se fixe sur ce récepteur par ses N-glycanes, et qu'il est internalisé et dégradé dans les lysosomes. Des analyses de la clairance sur des souris

n'exprimant ni le FVIII ni le VWF, mais exprimant CLEC4M au niveau hépatique, montrent que le FVIII recombinant injecté est internalisé dans les LSEC exprimant CLEC4M. Ces résultats suggèrent que CLEC4M est un nouveau récepteur de la clairance du FVIII, ayant une interaction dépendante de l'exposition des N-glycanes, en présence ou absence du VWF (Swystun et al., 2019a).

f. SCARA5

SCARA5 (Scavenger receptor class A member 5) est une protéine membranaire de type II, composée d'une région C-terminale intracellulaire, d'une région transmembranaire, et d'un domaine extracellulaire en région N-terminale, composé d'un domaine collagène et d'un domaine SRCR (scavenger receptor cystein rich) (Jiang et al., 2006). SCARA5 forme un trimère à la surface membranaire, et semble être exprimé par de nombreux tissus comme la rate, le cœur ou le cerveau (Li et al., 2009; Ojala et al., 2013). SCARA5 est décrit comme pouvant fixer et internaliser le VWF seul ou en complexe avec le FVIII. Toutefois, le FVIII seul n'est pas capté et internalisé par SCARA5 (Swystun et al., 2019b).

II. Le facteur de von Willebrand

Le facteur de von Willebrand (VWF) est une glycoprotéine plasmatique multimérique ayant un rôle central dans l'activation plaquettaire et la coagulation (Lenting *et al.*, 2015). Il a été découvert en 1973 par Weiss et son équipe, qui l'identifie comme étant le « facteur de rétention des plaquettes » responsable de la maladie de von Willebrand (Weiss *et al.*, 1973). En effet, une altération fonctionnelle et/ou quantitative de l'expression du VWF est responsable de la maladie de von Willebrand, le trouble hémorragique héréditaire le plus commun (Leebeek and Eikenboom, 2016a).

1) Structure du gène *VWF*

En 1985, 4 équipes clonent pour la première fois le gène *VWF* de manière indépendante (Ginsburg *et al.*, 1985; Lynch *et al.*, 1985; Sadler *et al.*, 1985; Verweij *et al.*, 1985). Le gène *VWF* est situé sur le bras court du chromosome 12 en position 12q13.3, et s'étend sur approximativement 178 kb (Shelton-Inloes *et al.*, 1987). Il est composé de 52 exons de tailles variant de 40 pb (exon 50) à 1379 pb (exon 28), et de 51 introns de tailles variant de 97 pb (intron 29) à environ 19,9 kb (intron 6) (Tableau VII) (Ginsburg, 1991; Mancuso *et al.*, 1989). L'épissage génère un ARN messager d'environ 9 kb, traduit en un précurseur polypeptidique monomérique de 2813 acides aminés (Verweij *et al.*, 1986).

En 1991, Mancuso *et al.*, distinguent un pseudogène non fonctionnel nommé *VWFP* sur le bras long du chromosome 22 en position 22q11-q13. Ce pseudogène, ayant une taille d'environ 21 à 29 kb, correspond aux exons 23 à 34 du gène *VWF* avec une homologie de séquence de 97%. Etant non fonctionnel, son rôle n'est pas connu (Mancuso *et al.*, 1991).

2) Origine du VWF

Contrairement au FVIII, l'origine cellulaire du VWF est bien connue. La biosynthèse de VWF *in vivo* est restreinte aux cellules endothéliales et aux mégacaryocytes (Jaffe *et al.*, 1974; Sporn *et al.*, 1985). Le VWF synthétisé par les mégacaryocytes est stocké dans les α -granules des plaquettes. Cependant, le VWF synthétisé par les cellules endothéliales est soit directement sécrété dans le plasma, soit stocké dans les corps de Weibel-Palade (Sporn *et al.*, 1985; Wagner

et al., 1982). Néanmoins, les cellules endothéliales représentent le site majeur de production du VWF plasmatique. Des études histologiques chez le porc montrent une expression plus importante de VWF au niveau des cellules endothéliales veineuses par rapport aux cellules endothéliales artérielles (Wu *et al.*, 1987). Chez la souris, Yamamoto *et al.* montrent que la sécrétion est plus abondante dans les vaisseaux larges. De plus, les tissus pulmonaires et cérébraux contiennent 5 à 50 fois plus d'ARNm de VWF par rapport aux tissus hépatiques et rénaux (Yamamoto *et al.*, 1998).

Tableau VII: Taille des exons et des introns (en paires de bases) composant le gène VWF

Exons	Taille (bp)	Introns	Taille (bp)
1	250	1	1224
2	55	2	1803
3	165	3	10205
4	103	4	283
5	209	5	14789
6	125	6	19908
7	217	7	1593
8	123	8	1176
9	112	9	987
10	47	10	6023
11	137	11	752
12	139	12	1191
13	101	13	4909
14	196	14	776
15	216	15	4073
16	241	16	5725
17	95	17	2271
18	161	18	7799
19	104	19	1561
20	139	20	3109
21	135	21	1955
22	147	22	3295
23	141	23	212
24	114	24	1792
25	157	25	732
26	159	26	704
27	136	27	2156
28	1379	28	1494
29	117	29	97
30	141	30	283
31	144	31	2443
32	165	32	1350
33	44	33	292
34	178	34	15394
35	221	35	1394
36	193	36	211
37	342	37	1843
38	200	38	6153
39	103	39	443
40	75	40	1790
41	105	41	1158
42	206	42	5525
43	150	43	4401
44	111	44	2207
45	181	45	1043
46	41	46	524
47	117	47	13891
48	99	48	976
49	129	49	507
50	40	50	1960
51	98	51	582
52	330		

Tableau issu de la base de données EAHAD
(https://grenada.lumc.nl/LOVD2/VWF/home.php?select_db=VWF)

3) Biosynthèse et structure de la protéine VWF

a. *Structure primaire*

La première séquence nucléotidique du VWF a été décrite en 1986 (Bonthron *et al.*, 1986). Le précurseur polypeptidique monomérique de 2813 acides aminés est nommé pré-pro-VWF, dont les 22 premiers acides aminés constituent le peptide signal. Il est composé de 15 domaines : D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK, où les domaines D1-D2 de 741 acides aminés représentent le pro-peptide (Figure 7A). Le VWF mature est alors composé de 2050 acides aminés, du domaine D' au domaine CK (Brehm, 2017; Pannekoek and Voorberg, 1989; Zhou *et al.*, 2012). La séquence VWF comprend une grande quantité de résidus cystéine (232 résidus sur 2813), environ 8,3% de plus que la moyenne des autres protéines humaines (Shapiro *et al.*, 2014; Titani *et al.*, 1986). Ces résidus sont majoritairement retrouvés au niveau des extrémités C et N-terminales. Ils sont tous impliqués dans la formation de ponts disulfures intra- et inter-chaînes, qui ont un rôle important dans le repliement de la protéine, et sa multimérisation (Shapiro *et al.*, 2014). Toutefois, certains ponts disulfures du VWF sont sensibles à la réduction, et peuvent être convertis en thiols libres une fois la protéine sécrétée (Li *et al.*, 2008).

Les domaines D1, D2 et D3 contiennent tous un domaine von Willebrand D (VWD), une structure cystéine-8 (C8), une structure trypsin-inhibitor-like (TIL) et un module E. Le domaine D' ne possède ni domaine VWD, ni de structure C8. Le domaine D4 ne possède pas de module E mais comprend une séquence spécifique D4N (Zhou *et al.*, 2012). Les domaines D'D3 contiennent des sites de fixation pour le FVIII, la P-sélectine et l'intégrine $\beta 2$ (Lenting *et al.*, 1998; Michaux *et al.*, 2006; Pendu *et al.*, 2006). Le domaine D4 contient un site de fixation à ADAMTS13, une métalloprotéase ayant pour rôle de contrôler la taille des multimères de VWF (Figure 7A) (Crawley *et al.*, 2011).

Les domaines C sont riches en cystéine, formant chacun deux sous-domaines riches en ponts disulfures, essentiels à la bonne conformation de la protéine et sa dimérisation. Les 6 domaines C en tandem donnent une grande flexibilité au VWF (Springer, 2014; Zhou *et al.*, 2012). Les domaines C contiennent des sites de fixation pour la fibrine, et aux intégrines $\alpha 11\beta 3$ et $\alpha \nu \beta 3$ (Figure 7A) (Beacham *et al.*, 1992; Keuren *et al.*, 2004).

Les domaines A, contrairement aux autres, comportent seulement deux résidus cystéines chacun. Ces résidus sont responsables des structures en boucle des domaines A1 (entre la

Cys1272 et la Cys1458) et A3 (entre la Cys1686 et la Cys1872). Le domaine A2 est le seul domaine du VWF qui en est dépourvu, en raison de la position adjacente des deux cystéines (Cys1669 et Cys1670). Cette particularité structurale confère au domaine A2 une capacité d'élongation en présence de forces de cisaillement élevées (Marti *et al.*, 1987). Les domaines A1 et A3 contiennent de nombreux sites de fixation, dont le récepteur GPIIb, l'ostéoprotégérine, les différentes fibres de collagène ou la thrombospondine (Figure 7A) (Fujimura *et al.*, 1986; Pareti *et al.*, 1987; Pimanda *et al.*, 2004; Shahbazi *et al.*, 2007). Le domaine A2 contient le site de clivage effectué par ADAMTS13, entre la Tyr1605 et la Met1606 (Dent *et al.*, 1990).

Le domaine CK (cystein-knok) est riche en cystéine et en ponts disulfures, et est nécessaire pour la dimérisation du VWF (Katsumi *et al.*, 2000; Marti *et al.*, 1987). Il contient également des sites de fixation pour le CTGF (connective tissue growth factor) et l'IGFBP7 (insulin-like growth factor binding protein 7) (Figure 7A) (van Breevoort *et al.*, 2012; Pi *et al.*, 2012a).

Tous ces domaines sont organisés de manière compacte, nécessitant les parties C et N-terminales pour une sécrétion optimale (Zhou *et al.*, 2012).

b. Dimérisation et multimérisation

Le pré-pro-VWF subit de nombreuses modifications post-traductionnelles. Après le clivage du peptide signal par la furine lors de sa translocation dans le réticulum endoplasmique, les monomères de pro-VWF subissent un grand nombre de N-glycosylations, puis s'assemblent en dimère de pro-VWF (Figure 7B). Cette dimérisation s'effectue à pH 7,4 par la formation d'une liaison covalente, impliquant 3 ponts disulfures inter-chaînes via les domaines C-terminaux cystein-knok (CK) (Katsumi *et al.*, 2000). La localisation structurale de ces 3 ponts les protège de la réduction, rendant les dimères hautement stables (Zhou and Springer, 2014). La maturation continue dans l'appareil de Golgi ; où la chute du pH ($\text{pH} \approx 6,2$) entraîne une modification conformationnelle importante des dimères, favorisant l'association homolatérale du pro-peptide D1-D2, ainsi que des domaines A2, A3, D4 et des domaines C. A ce stade, les dimères de pro-VWF adoptent une conformation nommée « dimère en bouquet », et vont subir des O-glycosylations (Figure 7B) (Lenting *et al.*, 2015; Springer, 2014; Wagner *et al.*, 1987; Zhou *et al.*, 2011).

Par la suite, une multimérisation s'effectue par la formation de ponts disulfures entre les domaines D3 des dimères de pro-VWF. La présence du pro-peptide D1-D2 et du domaine D' est cruciale dans cette multimérisation pour deux raisons. Premièrement, ces domaines servent pour le bon alignement des dimères de pro-VWF, facilitant donc l'interaction des domaines D3. Deuxièmement, le pro-peptide possède une activité disulfide isomérase, qui va alors catalyser la formation des ponts disulfures (Mayadas and Wagner, 1989). Les dimères en bouquet s'assemblent autour d'une hélice correspondant aux tubules des corps de Weibel-Palade. Cette configuration favorise la compaction des multimères essentiels à son stockage (Figure 7C) (Springer, 2014; Zhou et al., 2011). Le processus de multimérisation génère un pool hétérogène de multimères de pro-VWF, de tailles variant entre 2 et plus de 60 monomères de 250 kDa (Badirou et al., 2010; Jaffe et al., 1974). Le processus prend fin lors du clivage du pro-peptide par une furine dans le réseau trans-golgien, qui reste néanmoins fortement associé de manière non-covalente (Figure 7D)(Rehemtulla and Kaufman, 1992; Springer, 2014).

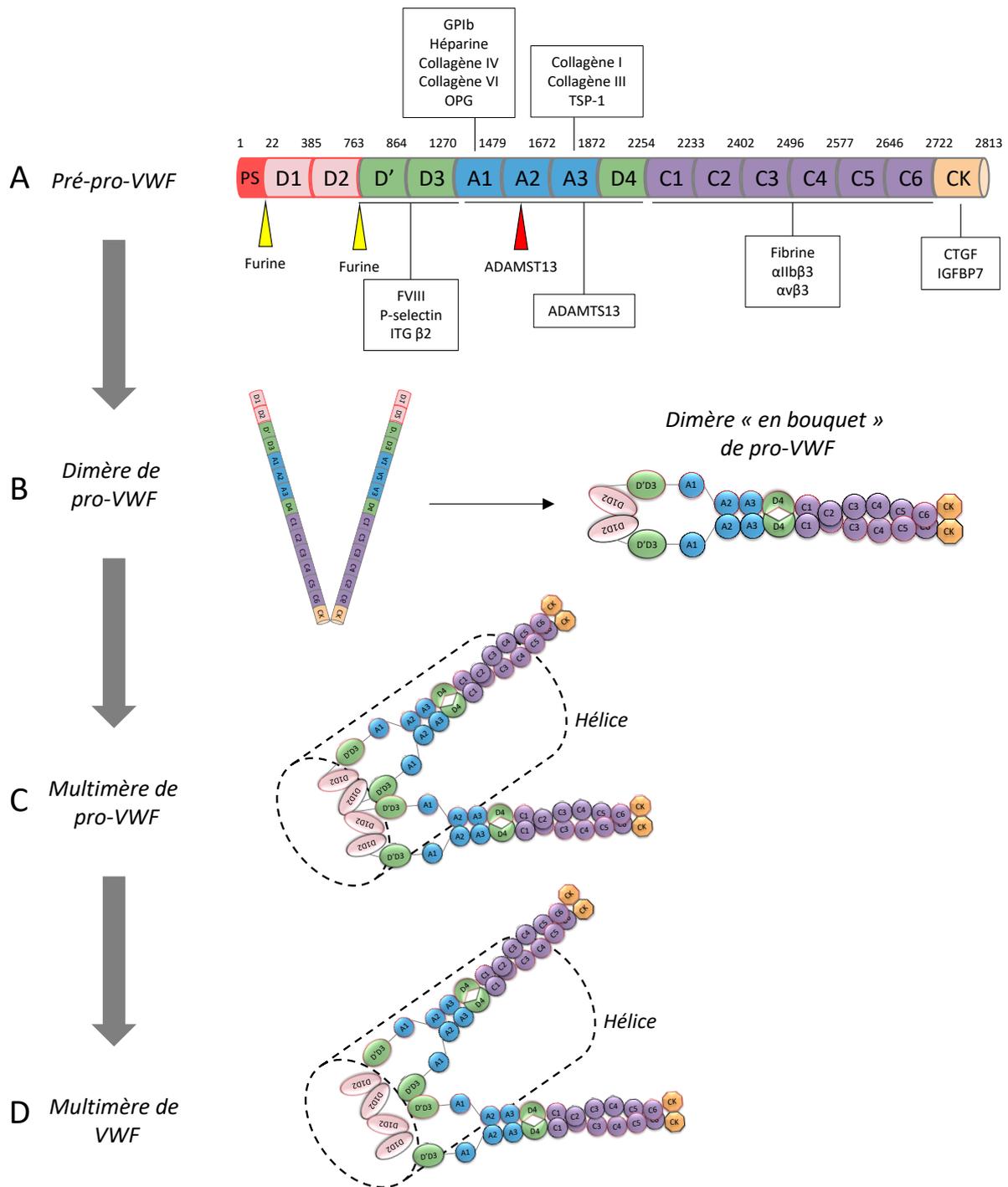


Figure 7 : Structure de la protéine VWF. **A)** Représentation de la structure primaire de la protéine VWF de 2813 acides aminés, avec différents sites de fixation protéiques. PS correspond au peptide signal, et D1-D2 correspond au pro-peptide. Les sites de clivage sont représentés par les triangles de couleur, jaune pour la furine, et rouge pour ADAMTS13. **B)** La dimérisation par le domaine CK s'effectue dans le réticulum endoplasmique. La compaction du VWF en structure « bouquet » s'effectue dans l'appareil de Golgi. **C)** Les dimères en bouquets s'assemblent autour d'une hélice correspondant aux tubules des corps de Weibel-Palade, dans le réseau trans-golgien. **D)** Clivage du pro-peptide par une furine dans le réseau trans-golgien, qui reste néanmoins fortement associé de manière non-covalente (Lenting et al., 2012, 2015; Springer, 2014).

c. Glycosylations

Durant sa synthèse, le VWF est sujet à de nombreuses modifications post-traductionnelles, incluant des glycosylations, cruciales pour le cycle de vie du VWF. Au niveau du réticulum endoplasmique, le pro-VWF subit 17 N-glycosylations, dont 4 sont localisées sur le pro-peptide (Canis *et al.*, 2012; Lenting *et al.*, 2015). Dans l'appareil de Golgi, 10 O-glycosylations sont ajoutées au VWF (Canis *et al.*, 2010; Samor *et al.*, 1989). Ces glycosylations subissent des maturations extrêmement variables, principalement au niveau des N-glycosylations où l'on recense plus de 300 structures différentes (Canis *et al.*, 2012). En effet, plus de 90% des glycanes sont recouverts par un résidu acide sialique, impliqué dans la clairance du VWF. Une partie des O-glycosylations présente 2 à 3 résidus d'acides sialiques. De plus, 10 N-glycanes monosulfatés ont été identifiés sur le VWF circulant, dont la fonction n'est pas connue (Canis *et al.*, 2010, 2012). Par ailleurs, approximativement 13% des N-glycanes et 1% des O-glycanes des VWF matures provenant des cellules endothéliales portent des déterminants antigéniques des groupes sanguins (Matsui *et al.*, 1992).

La composition oligosaccharidique du VWF diffère selon l'origine cellulaire de la glycoprotéine. En effet, le VWF plaquettaire est 50% moins sialylé, et n'exprime pas l'antigène A et B, tandis que l'antigène H est exprimé normalement (McGrath *et al.*, 2013). De plus, contrairement aux VWF endothélial et plasmatique, le VWF plaquettaire n'est pas retrouvé associé au FVIII dans les α -granules (McGrath *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2006; Yarovoi *et al.*, 2003).

4) Stockage et sécrétion du VWF

Après la synthèse, les multimères de VWF sont transportés dans les organelles de stockage des mégacaryocytes/plaquettes (α -granules) et des cellules endothéliales (corps de Weibel-Palade) (Sporn *et al.*, 1985; Wagner *et al.*, 1982). Ces deux organelles de stockage diffèrent l'un de l'autre par leur dépendance au VWF pour leur formation. En effet, les α -granules sont capables de se former en absence de VWF, tandis que la formation des corps de Weibel-Palade est strictement dépendante de la présence du VWF (Haberichter *et al.*, 2005; Lenting *et al.*, 2015). Par ailleurs, les mécanismes de sécrétion diffèrent également en fonction de l'origine cellulaire du VWF (Lenting *et al.*, 2015).

La sécrétion plaquettaire de VWF s'effectue suite à l'activation plaquettaire effectuée par l'ADP ou la thrombine (Figure 8) et représente une contribution mineure à la concentration plasmatique de VWF (Broos *et al.*, 2011; Golebiewska and Poole, 2015). Les cellules endothéliales vont soit stocker le VWF dans les corps de Weibel-Palade, soit le libérer directement dans le plasma (Wagner *et al.*, 1982). Concernant le VWF stocké, il existe deux voies distinctes pour la libération du VWF endothélial : une voie constitutive et une voie régulée (Sporn *et al.*, 1986; Tsai *et al.*, 1991). La voie constitutive est majoritaire (van den Biggelaar *et al.*, 2014; Giblin *et al.*, 2008; Nightingale and Cutler, 2013). Les corps de Weibel-Palade ont des mouvements aléatoires dans le cytoplasme (Romani de Wit *et al.*, 2003). Chaque mouvement peut conduire le corps en périphérie de la cellule, entraînant potentiellement sa fusion avec la membrane plasmique, et donc la libération du contenu dans l'espace extracellulaire (au niveau du sang ou du tissu sous-endothélial). Le VWF circulant est principalement issu de ce mécanisme de fusion aléatoire (Lenting *et al.*, 2015). Toutefois, cette voie de sécrétion est insuffisante pour produire une grande quantité de VWF, nécessaire à l'agrégation plaquettaire lors de l'hémostase (André *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2002). Pour une sécrétion massive de corps de Weibel-Palade, l'activation des cellules endothéliales par différents stimuli est nécessaire. Il s'agit de stimuli inflammatoires comme l'interleukine-1 (Bevilacqua *et al.*, 1984) ; de stimuli provenant de plaquettes activées comme l'ADP, l'histamine ou l'épinéphrine (McGrath *et al.*, 2010) ; de la thrombine (Storck *et al.*, 1995) ou encore de la vasopressine, dont un analogue (la desmopressine) est cliniquement utilisé comme traitement d'une forme modérée de la maladie de von Willebrand (Mannucci and Cattaneo, 1992). D'un point de vue macroscopique, on peut distinguer 3 étapes dans la sécrétion de ces corps : 1) les corps de Weibel-Palade se concentrent au niveau de la zone périnucléaire de la cellule endothéliale (événement plus ou moins prononcé en fonction du stimulus) (Romani de Wit *et al.*, 2003) ; 2) formation de plaques enrichies en VWF, probablement dues à la fusion de plusieurs corps de Weibel-Palade, et formation d'une capsule de sécrétion (Romani de Wit *et al.*, 2003; Valentijn *et al.*, 2010) ; 3) Sécrétion de faisceaux de multimères de VWF hautement pro-agrégant plaquettaire (André *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2002).

Le VWF est la plus grande protéine humaine dans la circulation sanguine (Ruggeri and Ware, 1993), avec une taille pouvant atteindre 15 μ m après élongation due aux forces de cisaillement (Schneider *et al.*, 2007). Sa taille dans la circulation est soumise à un mécanisme de régulation.

En effet, alors que dans les vésicules de stockage la taille des multimères peut s'élever jusqu'à 60 sous-unités dimériques, dans la circulation ils n'atteignent pas plus de 30 sous-unités dimériques (Springer, 2011). Ce mécanisme de régulation implique majoritairement la métalloprotéinase ADAMTS13. Les forces de cisaillement en condition de flux (Tsai, 1996) entraînent l'exposition du site de clivage du VWF situé au niveau du domaine A2 (Tyr1605-Met1606) (Dent *et al.*, 1990; Furlan *et al.*, 1996). ADAMTS13 se fixe au niveau du domaine A2 et D4 pour effectuer le clivage du VWF (Gao *et al.*, 2006).

5) La clairance

La demi-vie du VWF dans la circulation sanguine varie entre 4,6 à 26h en fonction des individus (Brown *et al.*, 2003; Sztukowska *et al.*, 2008). Le déterminant majeur de cette variabilité inter-individu est probablement la variabilité des structures des glycanes, en particulier la présence des déterminants de groupes sanguins. En effet, les individus de groupes non-O présentent une demi-vie du VWF plus longue que les individus du groupe O, après un traitement à la desmopressine (Gallinaro *et al.*, 2008; Gill *et al.*, 1987).

La clairance du VWF plasmatique s'effectue principalement au niveau hépatique et splénique, selon une cinétique indépendante de la taille des multimères (Badirou *et al.*, 2010; Casari *et al.*, 2013a). Les cellules majoritairement impliquées dans la clairance du VWF sont les macrophages (Casari *et al.*, 2013b; Castro-Núñez *et al.*, 2012; van Schooten *et al.*, 2008) ainsi que les cellules endothéliales comme les LSECs (Swystun *et al.*, 2018) et les hépatocytes (Grewal *et al.*, 2008). Les récepteurs impliqués dans la clairance du FVIII sont également ceux impliqués dans la clairance du VWF : ASGPR (Grewal *et al.*, 2008), LRP1 (Rastegarlarlari *et al.*, 2012), Siglec-5 (Pegon *et al.*, 2012), CLEC4M (Rydz *et al.*, 2013) et STAB-2 (Swystun *et al.*, 2018).

Le VWF circule sous la forme d'une protéine globulaire, avec la majorité de ses glycanes sialylés. Sous cette forme, le VWF sera reconnu par 5 récepteurs de clairance : CLEC4M, Siglec-5, STAB-2, SCARA5 et SR-AI. CLEC4M, exprimé par les LSEC, se lie aux N-glycanes du VWF pour son internalisation. Siglec-5, majoritairement exprimé par les macrophages et les hépatocytes, interagit spécifiquement avec les résidus d'acides sialiques (Pegon *et al.*, 2012; Rydz *et al.*, 2013). STAB-2, exprimé par les LSEC et les macrophages, a été récemment décrit comme impliqué dans la clairance du VWF *in vivo* (Swystun *et al.*, 2018). SCARA5, notamment exprimé

par les cellules endothéliales sinusoidales spléniques, est décrit comme impliqué dans la clairance du VWF, bien qu'une déficience en ce récepteur n'altère pas le taux de VWF (Swystun et al., 2019b). SR-AI (Scavenger receptor class A member I) est un récepteur macrophagique capable de fixer le VWF, et semble contribuer à sa clairance (Wohner et al., 2018).

Afin d'interagir avec les récepteurs LRP1 et ASGPR, le VWF globulaire sialylé va devoir subir des modifications conformationnelles. Une élongation du VWF induite par les forces de cisaillement permet l'exposition de son site d'interaction (domaines A1-A2-A3) avec le récepteur LRP1 exprimé à la surface des hépatocytes et des macrophages (Castro-Núñez *et al.*, 2012; Fazavana *et al.*, 2020; Rastegarlarlari *et al.*, 2012). De ce fait, l'interaction entre VWF et LRP1 n'intervient pas en condition statique, et nécessite la présence d'une intensité minimale de forces de cisaillement (Rastegarlarlari *et al.*, 2012). Le récepteur ASGPR ne joue pas un rôle majeur dans le processus de clairance du VWF, puisqu'il n'est pas capable d'interagir avec des protéines fortement sialylées comme le VWF (Grewal *et al.*, 2008; Pipe *et al.*, 2016). Il intervient essentiellement lorsque le VWF est hyposialylé, après l'action d'une sialidase bactérienne ou de sialyltransférase (Ellies *et al.*, 2002). Par ailleurs, le poids, l'âge et le régime alimentaire peuvent également jouer un rôle dans le niveau de sialylation du VWF (Knezevic *et al.*, 2010).

6) Fonction du VWF dans l'hémostase

Le VWF joue un rôle majeur dans l'hémostase primaire. Il intervient suite à une brèche vasculaire dans l'adhérence et l'activation plaquettaire au niveau du tissu sous-endothélial via le récepteur GPIb, puis dans l'agrégation plaquettaire à travers le récepteur α IIb β 3 (Figure 2) (Broos *et al.*, 2011; Rosenberg *et al.*, 1998). Son rôle est d'autant plus important dans la microcirculation, où les forces de cisaillement sont élevées. En effet, les interactions entre le collagène sous-endothélial et les récepteurs GPVI et α 2 β 1 ne résistent pas à de telles conditions rhéologiques, par conséquent l'adhérence et l'agrégation plaquettaire sont effectuées essentiellement par le VWF (Koster *et al.*, 1995). Le VWF sous-endothélial et plasmatique, lié au collagène sous-endothélial par son domaine A3 (Pareti *et al.*, 1987), subit l'action de forces de cisaillement induisant un changement de conformation du multimère de VWF, d'une forme globulaire à étendue (Siedlecki *et al.*, 1996). Ce déploiement permet l'exposition du domaine A1 au récepteur GPIb (Fujimura *et al.*, 1986), dont l'interaction permet de ralentir les plaquettes, leur roulement et leur adhérence réversible au tissu sous-endothélial (Jackson,

2007). En plus de son impact sur les plaquettes lors de l'hémostase primaire, le VWF joue également un rôle dans l'hémostase secondaire en interagissant avec le FVIII par ses domaines D'D1 (Terraube *et al.*, 2010; Wagner, 1990). Cette interaction permet l'augmentation de la demi-vie et de la biodisponibilité du facteur de coagulation FVIII au site lésionnel (Pipe *et al.*, 2016).

Le VWF est une protéine capable d'interagir avec un grand nombre de molécules différentes, suggérant son implication dans de nombreuses fonctions biologiques (Lenting *et al.*, 2012; Randi *et al.*, 2018).

III. Les différents rôles hémostatiques du FVIII et du VWF

L'hémophilie A et la maladie de von Willebrand sont deux troubles de la coagulation, fréquemment associés à une perte osseuse, une altération de l'inflammation et du système vasculaire (Bhat *et al.*, 2015; Nieuwenhuizen *et al.*, 2014; Stephensen and Rodriguez-Merchan, 2013).

Les patients souffrant d'une forme sévère d'hémophilie A présentent des saignements spontanés, principalement localisés au niveau articulaire (hémarthrose) ou musculaire (hématome). Des saignements répétés au niveau des articulations peuvent conduire à une arthropathie hémophilique (Mingot-Castellano, 2019; Zimmerman and Valentino, 2013). Il est également observé une diminution de la densité minérale osseuse chez l'enfant et l'adulte (Gerstner *et al.*, 2009; Iorio *et al.*, 2010; Stephensen and Rodriguez-Merchan, 2013). Les patients souffrant d'une forme sévère de la maladie de von Willebrand présentent des angiodysplasies digestives, entraînant des saignements digestifs (Fressinaud and Meyer, 1993; Jackson and Gerson, 2014). Certaines formes de la maladie de von Willebrand sont associées à une diminution du taux de FVIII sanguin (Casonato *et al.*, 2018).

Ces observations à partir d'études cliniques sur l'hémophilie A et la maladie de von Willebrand, ainsi que des études *in vitro* et *in vivo* révèlent des rôles extra-coagulants potentiels du FVIII et du VWF (Samuelson Bannow *et al.*, 2019).

1) Rôle dans l'angiogenèse

Le VWF est connu comme étant un marqueur et un régulateur négatif de l'angiogenèse. En 2011, Starke *et al.* démontrent qu'une absence de VWF augmente le processus angiogène, illustré par une augmentation de la prolifération de cellules endothéliales *in vitro* après l'inhibition de l'expression de VWF, ainsi qu'*in vivo* chez la souris déficiente en VWF par une augmentation de la densité capillaire auriculaire (Starke *et al.*, 2011). Etant donné le nombre important de partenaires du VWF, de nombreux mécanismes potentiels l'impliquant pourraient influencer la néo-angiogenèse. En 2017, Randi *et al.* proposent un modèle où le VWF régulerait négativement l'angiogenèse par la dérégulation de voies de signalisation pro-angiogènes, à travers 2 mécanismes principaux : 1) un mécanisme direct en tant que ligand extracellulaire, impliquant le récepteur $\alpha\beta_3$; 2) un mécanisme indirect par sa capacité à contrôler le stockage

d'autres protéines dans les corps de Weibel-Palade, comme l'angiopoïétine-2 ou la galactine-3 (Randi and Laffan, 2017). Le mécanisme direct implique l'association entre VEGF-R2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) et le récepteur $\alpha\beta3$ sur les cellules endothéliales, importante pour le rétrocontrôle négatif de la voie VEGF-R2. Or, le VWF contrôle l'expression du récepteur $\alpha\beta3$ à la surface des cellules endothéliales en prévenant son internalisation. Son absence inhibe alors la présence d' $\alpha\beta3$ et donc le rétrocontrôle négatif sur la voie VEGF-R2 (Starke *et al.*, 2011). Le mécanisme indirect implique l'incapacité des cellules endothéliales à former des corps de Weibel-Palade en absence de VWF. La perte des corps de Weibel-Palade entraîne une augmentation de la sécrétion des protéines normalement produites et stockées dans ces organelles, incluant l'angiopoïétine-2 et la galactine-3. L'angiopoïétine-2 est une protéine pro-angiogénique, ligand du récepteur Tie-2 (tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains-2) nécessaire dans la régulation de l'angiogenèse (Augustin *et al.*, 2009). De manière similaire, la concentration plasmatique de galactine-3, protéine pro-angiogénique habituellement stockée dans les corps de Weibel-Palade, est augmentée en absence de VWF (Xu *et al.*, 2017). La galactine-3 induit l'angiogenèse par l'intermédiaire de la voie de l'intégrine $\alpha\beta3$ et du VEGF-R2 (Markowska *et al.*, 2010).

Chez les patients hémophiles, l'hémarthrose peut être réduite avec un traitement de substitution, mais pas totalement abrogée (Mingot-Castellano, 2019; Zimmerman and Valentino, 2013). En effet, malgré un traitement prophylactique au FVIII, 30 à 50% des patients hémophiles souffrent d'arthropathie hémophilique (Aznar *et al.*, 2009; Jackson *et al.*, 2015; Schramm *et al.*, 2012). En 2015, Bhat *et al.* observent chez les souris déficientes en FVIII une néo-angiogenèse synoviale, avec une architecture vasculaire anormale après l'induction d'une hémarthrose. Ces observations se traduisent par la formation de vaisseaux larges et irréguliers, avec une augmentation de l'expression des marqueurs du remodelage vasculaire, comme l' α SMA (α -smooth muscle actin), l'endogline et le VEGF (vascular endothelium growth factor). L'équipe émet l'hypothèse que ce sont des gènes cibles du FVIII, dont la signalisation est régie par des mécanismes inconnus. Par ailleurs, ce remodelage vasculaire est maintenu plusieurs mois, et s'effectue également sur l'articulation contrôlée, n'ayant pas subi d'hémarthrose induite. Ce phénomène n'est pas observé chez les souris souffrant d'arthrose ou d'arthrite rhumatoïde, suggérant qu'il est spécifiquement lié à la déficience en FVIII (Bhat *et al.*, 2015). Ces observations sont également retrouvées chez les patients (Acharya *et al.*, 2011; Kidder *et*

al., 2016a; Mauser-Bunschoten et al., 2005; Zetterberg et al., 2014). Le degré d'arthropathie est plus important chez les hémophiles A que les hémophiles B (déficiency en facteur IX) (Melchiorre *et al.*, 2016). Toutefois, les mécanismes de l'impact du FVIII sur l'angiogenèse restent à définir.

2) Rôle dans le remodelage osseux

Chez les patients souffrant d'hémophilie A, il est fréquemment observé une diminution de la densité minérale osseuse chez l'enfant et l'adulte (Iorio *et al.*, 2010; Olivieri *et al.*, 2018). Toutefois, un traitement prophylactique avec un FVIII de substitution préserve la densité minérale osseuse chez les patients souffrant d'une forme sévère de la pathologie, sans toutefois l'abroger (Khawaji *et al.*, 2009). Ces observations étaient initialement associées au développement d'hémarthroses et à la sédentarité des patients hémophiles. Néanmoins, un lien fonctionnel entre le complexe FVIII/VWF et le remodelage osseux est suspecté depuis plusieurs années (Baud'huin *et al.*, 2009; Samuelson Bannow *et al.*, 2019).

Le remodelage osseux est contrôlé par la formation et la résorption osseuse, médiée principalement par les ostéoblastes et les ostéoclastes respectivement. Les mécanismes moléculaires mis en place dans la résorption osseuse impliquent majoritairement une triade de protéines : le récepteur RANK (receptor activator of nuclear kappa B), présent à la surface des ostéoclastes ; son ligand RANKL (RANK ligand) ; et l'OPG (ostéoprotégérine), un récepteur leurre de RANKL. La fixation de RANKL sur son récepteur active la différenciation et la maturation ostéoclastique, induisant la dégradation de la matrice osseuse. Cette dégradation est limitée par l'action de l'OPG, qui va capter RANKL et bloquer sa liaison à RANK, inhibant alors l'ostéoclastogénèse (Shahi *et al.*, 2017). Par ailleurs, en dehors du système osseux, l'OPG est décrit comme ayant un rôle pro-angiogénique (Benslimane-Ahmim et al., 2011, 2013a). En 2007, Shahbazi *et al.* montrent l'existence d'un site d'interaction pour l'OPG au niveau du domaine A1 du VWF. En 2009, Baud'huin *et al.* mettent en évidence un rôle direct du complexe FVIII/VWF sur la différenciation ostéoclastique. En effet, l'équipe démontre que le complexe FVIII/VWF inhibe la différenciation ostéoclastique induite par RANKL *in vitro*. Par ailleurs, le complexe influence l'OPG, en augmentant son effet inhibiteur de la différenciation ostéoclastique, ainsi qu'en inhibant son effet anti-apoptotique médié par TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand). L'équipe montre une interaction directe entre le

complexe FVIII/VWF et RANKL, tandis que les facteurs recombinants seuls n'interagissent pas avec RANKL. Le complexe est également capable d'interagir avec l'OPG, contrairement au FVIII seul (Baud'huin *et al.*, 2009). Plus récemment, Taves *et al.* montrent que les souris déficientes en FVIII, mais pas les souris déficientes en VWF, développent un phénotype ostéoporotique en absence d'hémarthrose induite ou de saignement observé. Ce phénotype est exacerbé deux semaines après l'induction d'un saignement artériel (Taves *et al.*, 2019). Toutefois, les mécanismes de l'impact du FVIII et du VWF sur le remodelage osseux restent à définir.

3) Activités macrophagiques et implication dans l'inflammation

En 2014, Nieuwenhuizen *et al.* observent une altération de la polarisation macrophagique chez les souris hémophiles déficientes en FVIII (Nieuwenhuizen *et al.*, 2014). Les monocytes/macrophages jouent un rôle important dans l'inflammation, notamment après une lésion. Après leur extravasation de la circulation sanguine, les monocytes se différencient en macrophages. En présence de cytokines comme l'IFN- γ (interféron γ), le TNF- α (tumor necrosis factor- α), ou bien par les LPS (lipopolysaccharides) bactériens, les monocytes se différencient en macrophage M1, pro-inflammatoires. Ces macrophages vont alors sécréter une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , les interleukines IL-6, IL-12, IL-23 ou encore IL-1 β . Leur rôle est d'éliminer les pathogènes par la génération de ROS (reactive oxygen species), la présentation antigénique ou encore en favorisant la réponse des lymphocytes Th1 et Th17 (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018). En présence d'interleukine IL-10, IL-4, IL-13 ou encore le TGF- β (tumor growth factor - β), les monocytes vont se différencier en macrophages de type M2, anti-inflammatoires. Les macrophages M2 sont catégorisés en 4 types : les M2a, activant le remodelage tissulaire et la cicatrisation ; les M2b, ayant un rôle immunorégulateur par l'activation des lymphocytes Treg (T régulateur) et des lymphocytes Th2 ; les M2c, impliqués dans la phagocytose des corps apoptotiques ; et les M2d ayant un rôle pro-angiogène (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018). Dans leur étude, Nieuwenhuizen *et al.* montrent que l'induction d'une hémarthrose induit un changement de polarisation des monocytes sanguins, passant d'une majorité de monocytes de type M2 à une majorité de monocytes de type M1, un jour après l'hémarthrose. Un retour à la normal s'effectue après 7 jours. A l'inverse, ils observent une diminution des monocytes M1 au niveau de la rate, avec un retour à la normale après 7 jours. Toutefois, au niveau de la pulpe rouge de la rate, l'équipe

constate une diminution durable du nombre de macrophages M2. De plus, ils notent une augmentation des macrophages M1 et M2 dans le tissu synovial et dans le liquide de lavage de l'articulation impactée. L'articulation contrôle (n'ayant pas subi d'hémarthrose induite) ne présente pas de variation macrophagique. L'équipe conclut à une altération de la polarisation macrophagique à la suite d'une hémarthrose chez les souris déficientes en FVIII (Nieuwenhuizen *et al.*, 2014). Toutefois, le rôle du FVIII dans la polarisation macrophagique n'est pas connu. Une étude récente chez les patients hémophiles montre également une dérégulation de la polarisation macrophagique. En effet, Knowles *et al.* ont purifié des monocytes de patients hémophiles et de donneur sain, et induit leur différenciation en macrophage M1 par un traitement au GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), ou en macrophage M2 par un traitement au M-CSF (macrophage colony-stimulating factor). Les monocytes des patients hémophiles ont un taux de polarisation plus faible par rapport aux donneurs, avec une polarisation dérégulée en réponse au M-CSF, et partiellement dérégulée en réponse au GM-CSF. Par ailleurs, les monocytes des patients hémophiles expriment une plus faible quantité de récepteur pour le M-CSF et GM-CSF. Toutefois, cette étude a été réalisée chez des patients hémophiles A et B sans distinction, par conséquent le rôle du FVIII dans ce trouble n'est pas défini (Knowles *et al.*, 2019).

Contrairement au rôle indéterminé du FVIII dans l'inflammation, le VWF est connu pour avoir un impact direct dans la réaction inflammatoire, notamment sur le recrutement leucocytaire. En effet, le VWF en complexe avec les plaquettes favorise le roulement et l'extravasation leucocytaire *in vitro* (Bernardo *et al.*, 2005; Petri *et al.*, 2010). Pendu *et al.* montrent que le VWF peut agir comme une surface adhésive pour des leucocytes, par l'intermédiaire de PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1) et les intégrines $\beta 2$ (Pendu *et al.*, 2006). Par ailleurs, afin d'observer les effets du VWF sur le recrutement leucocytaire, Hillgruber *et al.* ont induit une inflammation cutanée chez des souris traitées avec un anticorps bloquant anti-VWF, ou chez des souris déficientes en VWF. Dans deux modèles distincts, de vascularite induite et de dermatite de contact irritative, une baisse significative du nombre de leucocytes recrutés a été observée chez les souris déficientes en VWF et traitées avec l'anticorps bloquant en comparaison des souris contrôles. L'équipe a également montré que la diminution du recrutement leucocytaire est associée à une diminution de la perméabilité vasculaire. Il est

intéressant de noter que l'anticorps bloquant anti-VWF n'altère pas l'effet pro-coagulant du VWF, le temps de saignement étant inchangé (Lacey *et al.*, 2012).

Chapitre 3 : Les différents troubles de la coagulation

La cascade de coagulation est un processus complexe et finement régulé par de nombreux facteurs de coagulation. Un déficit en l'un des facteurs de coagulation peut entraîner le développement d'un trouble de la coagulation. Les hémophilies A et B sont les plus communes, et avec la maladie de von Willebrand, elles représentent environ 95% de l'ensemble des troubles de la coagulation. Les 5% restant correspondent aux déficits rares de la coagulation (Menegatti and Peyvandi, 2019; Palla et al., 2015).

I. Déficits rares de la coagulation

Les déficits en facteur VIII (hémophilie A), et facteur IX (hémophilie B) ou en VWF (maladie de von Willebrand) représentent 95 à 97% des coagulopathies (Peyvandi et al., 2016a). Les 3 à 5% restants correspondent aux déficits rares de la coagulation (DRC), un ensemble de pathologies hémorragiques comprenant les déficits en fibrinogène, pro-thrombine, facteur V, facteur VII, facteur X, facteur XI, facteur XIII, le déficit en facteurs vitamine K-dépendants et le déficit combiné en FV et FVIII (Menegatti and Peyvandi, 2019).

1) Déficit congénital en fibrinogène

Les déficits congénitaux en fibrinogène sont dus à une baisse de la concentration et/ou de la fonction du fibrinogène circulant. Ils comprennent 2 classes : le type I est un déficit quantitatif, caractérisé par une absence de fibrinogène (afibrinogénémie) ou une faible concentration, inférieur à 1,5 g/L (hypofibrinogénémie) ; le type II est un déficit qualitatif, associé à un déficit quantitatif (hypodysfibrinogénémie) ou non (dysfibrinogénémie). Ces pathologies sont associées à des mutations d'un ou plusieurs gènes du fibrinogène : α (*FGA*), β (*FGB*), γ (*FGG*), localisés au niveau du chromosome 4. Le traitement mis en place chez les patients est un traitement prophylactique de substitution, pouvant être du fibrinogène recombinant, du plasma frais congelé, ou du fibrinogène cryoprécipité (Menegatti and Peyvandi, 2019; de Moerloose *et al.*, 2013).

L'afibrinogénémie est extrêmement rare, avec une prévalence d'environ 1 / 1 000 000 (de Moerloose *et al.*, 2013). Les symptômes cliniques d'une afibrinogénémie sont les plus sévères, caractérisés par des hémorragies au niveau du cordon ombilical, des épistaxis, hémarthroses, des saignements mucocutanés (Lak *et al.*, 1999; de Moerloose *et al.*, 2013). Dans 85% des cas, l'afibrinogénémie se manifeste durant la période néonatale (Lak *et al.*, 1999; Peyvandi *et al.*, 2006). Des saignements spontanés au niveau du système nerveux central ont été recensés, et ont été responsables du décès des patients (Parameswaran *et al.*, 2000). L'hypofibrinogénémie est plus fréquente que l'afibrinogénémie. Les patients étant le plus souvent asymptomatiques, la prévalence est difficile à déterminer (Peyvandi *et al.*, 2012). Toutefois, les femmes présentant cette pathologie sont plus susceptibles de souffrir d'hémorragie postpartum, ou encore de faire des fausses couches (Goodwin, 1989).

L'hypodysfibrinogénémie et la dysfibrinogénémie sont plus fréquentes que les désordres de type I. Les patients souffrant de dysfibrinogénémie sont le plus souvent asymptomatiques. Toutefois, certains souffrent d'hémorragie suite à des traumatismes, à un accouchement ou à une opération chirurgicale. Une étude recensant 260 cas de dysfibrinogénémie montre que 55% des patients n'ont pas de complication clinique, 25% montrent des saignements, et 20% ont une tendance à développer des thromboses veineuses (Haverkate and Samama, 1995; Menegatti and Peyvandi, 2019). Deux mécanismes peuvent expliquer le développement de thrombose chez ces patients : 1) le fibrinogène défectueux est incapable de fixer la thrombine, entraînant une élévation du taux de thrombine ; 2) le fibrinogène défectueux forme un caillot de fibrine, résistant à la dégradation par la plasmine (de Moerloose *et al.*, 2013). Une étude comparant la dysfibrinogénémie et l'hypodysfibrinogénémie montre que cette dernière a une tendance plus prononcée à entraîner des thromboses chez les patients (Casini *et al.*, 2017).

2) Déficit congénital en prothrombine

Le déficit en prothrombine est un trouble héréditaire récessif de la coagulation, résultant d'un déficit en facteur II nommé « prothrombine ». Cette maladie est due à des mutations du gène *F2*, présent au niveau du chromosome 11 et codant pour la prothrombine. C'est un trouble extrêmement rare, touchant environ 1 personne sur 2 000 000. Il existe deux types de déficits en prothrombine : le type I, ou « hypoprothrombinémie », défini par une concentration plasmatique inférieure à 10% du taux normal ; et le type II, ou « dysprothrombinémie », défini

par la production d'une prothrombine dysfonctionnelle avec une concentration normale ou proche de la normalité (Lancellotti *et al.*, 2013). Une absence complète de prothrombine ne semble pas viable, comme le montre la mortalité embryonnaire ou néonatale des modèles murins déficientes en prothrombine (Mullins *et al.*, 2009). Les patients souffrant d'hypoprothrombinémie montrent des saignements aggravés après une blessure, des hémorragies des muqueuses, des hématomes et hémarthroses. Toutefois, les patients ayant un taux de prothrombine supérieur à 30%, ou les patients souffrant de dysprothrombinémie sont le plus souvent asymptomatiques (Lancellotti *et al.*, 2013; Menegatti and Peyvandi, 2019). Il n'existe pas de prothrombine recombinante ou de dérivé plasmatique spécifique, par conséquent, pour les cas sévères, le plasma frais congelé ou le PCC (prothrombin complex concentrate) sont utilisés comme traitement de substitution (Lechler, 1999).

3) Déficit congénital en facteur V : parahémophilie

Le déficit en facteur V, également nommé parahémophilie, est un trouble héréditaire de la coagulation, causé par une baisse du taux plasmatique de facteur V. Il est dû à des mutations du gène *F5*, présent au niveau du chromosome 1 et codant pour le facteur V. C'est un trouble autosomique récessif rare, touchant environ 1 personne sur 1 000 000 (Dorgalaleh *et al.*, 2017; Tabibian *et al.*, 2019). Le déficit en FV est catégorisé en trois groupes, en fonction de l'activité du FV détecté dans la circulation : 1) la forme légère, avec un taux de FV $\geq 10\%$; 2) la forme modérée, avec un taux de FV $< 10\%$; et 3) la forme sévère, avec un taux de FV indétectable (Tabibian *et al.*, 2019; Thalji and Camire, 2013). Les symptômes les plus fréquents sont l'épistaxis, la ménorragie et les saignements des muqueuses, ainsi que les saignements post-opératoires (Park *et al.*, 2016). Les hémorragies mortelles, au niveau du système nerveux central, du système gastro-intestinal ou les hémarthroses sont plus rarement décrits chez ces patients (Dorgalaleh *et al.*, 2017). La prise en charge des patients parahémophiles repose sur un traitement de substitution, utilisant du plasma frais congelé afin de maintenir un taux de FV supérieur à 20% (Park *et al.*, 2016). Toutefois, le premier concentré de facteur V a été récemment développé, et semble corriger les paramètres comme le « temps de prothrombine », analysé sur le sang de patients souffrant d'une forme sévère. Ce concentré n'est pas encore commercialisé (Bulato *et al.*, 2018).

4) Déficit combiné en facteur V et facteur VIII : F5F8D

Le déficit combiné en facteur V et facteur VIII (F5F8D) est un trouble héréditaire autosomique récessif de la coagulation dû à un déficit en facteur V et en facteur VIII. C'est une pathologie rare, touchant environ 1 personne sur 1 000 000 (Shao *et al.*, 2019). La plupart des patients présente un niveau et une activité de FV et de FVIII entre 5 et 30% de la normale, et manifeste des saignements légers à modérés (Shao *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2006). Les symptômes sont semblables à ceux observés chez les patients souffrant d'une forme modérée d'hémophilie A, ou de parahémophilie (Peyvandi *et al.*, 1998a; Seligsohn *et al.*, 1982). Ce déficit peut être causé par des mutations de deux gènes : le gène *LMAN1* présent sur le chromosome 18 et codant pour la protéine LMAN1 ; et/ou le gène *MCFD2* présent sur le chromosome 2 et codant pour la protéine MCFD2 (Zhang *et al.*, 2006). Ces deux gènes sont impliqués dans la sécrétion du FV et FVIII (Zhang *et al.*, 2005). Les épisodes hémorragiques sont traités de manière ponctuelle et pendant une chirurgie, nécessitant une source de FV et de FVIII. Pour le FV, le plasma frais congelé est utilisé, tandis que pour le FVIII, différentes sources peuvent être utilisées, comme le FVIII recombinant ou un dérivé plasmatique (Mumford *et al.*, 2014).

5) Déficit congénital en facteur VII : hypoproconvertinémie

Le déficit en facteur VII, également nommé hypoproconvertinémie, est le déficit rare de la coagulation le plus fréquent, avec une incidence allant de 1 / 300 000 à 1 / 500 000 (Robinson, 2019). C'est une maladie héréditaire autosomique récessive associée à des mutations du gène *F7* codant pour le facteur VII, présent sur le chromosome 13. Ces mutations peuvent engendrer une protéine dysfonctionnelle ou une diminution du taux de FVII. Les patients atteints de cette pathologie peuvent développer des formes sévères, modérées ou asymptomatiques, toutefois, le degré de sévérité n'est pas corrélé aux taux de FVII circulant. Les complications observées dans les formes sévères sont des hémorragies du système nerveux central, du système gastro-intestinal, et des hémarthroses (Mariani *et al.*, 2005; Peyvandi *et al.*, 2012). Les symptômes les plus communs sont des ménorragies et des épistaxis (Peyvandi *et al.*, 1997). Le traitement de substitution est un facteur VII actif recombinant, injecté 2 à 3 fois par semaine en raison de sa demi-vie faible (Mumford *et al.*, 2014; Napolitano *et al.*, 2013).

6) Déficit congénital en facteur X

Le déficit en facteur X est une maladie héréditaire autosomique récessive de la coagulation, affectant une personne sur 1 000 000 (Peyvandi *et al.*, 2013). Ce déficit est en lien avec des mutations du gène *F10* codant pour le facteur X et localisées au niveau du chromosome 13 (Chafa *et al.*, 2009). On distingue deux types de déficits en facteur X : le type I, caractérisé par une diminution de la concentration et de l'activité du facteur X ; le type II caractérisé par une diminution de l'activité du facteur X, avec une concentration normale ou proche de la normalité (Menegatti and Peyvandi, 2009). Les patients souffrant d'une forme sévère de la pathologie (activité du FX < 1 %) présentent des saignements du cordon ombilical ou du système nerveux central, ainsi que des hémarthroses, hématomes ou encore des hémorragies gastro-intestinales. Toutefois, le symptôme le plus fréquent à chaque niveau de sévérité est l'épistaxis (Herrmann *et al.*, 2006; Peyvandi *et al.*, 1998b). Concernant le traitement, le plasma frais congelé et le PCC ont été largement utilisés. Récemment, deux concentrés, plus simples d'utilisation, sont disponibles : un complexe FIX/FX lyophilisé congelé, et un dérivé plasmatique de facteur X hautement purifié, ayant récemment obtenu une autorisation de mise sur le marché (Austin *et al.*, 2016; Escobar *et al.*, 2016; Karimi *et al.*, 2012).

7) Déficit congénital en facteur XI

Le déficit en facteur XI, également nommé hémophilie C, est une maladie héréditaire autosomique de la coagulation, affectant une personne sur 1 000 000 (Duga and Salomon, 2009). Elle est due à des mutations du gène *F11* codant pour le facteur XI et localisées au niveau du chromosome 14 (Kravtsov *et al.*, 2004). Une forme sévère de la pathologie est caractérisée par une concentration plasmatique inférieure à 15 UI/dL. Toutefois, la sévérité de la pathologie n'est pas corrélée au génotype, mais au site lésionnel. En effet, lors d'une lésion au niveau d'un site avec un haut potentiel fibrinolytique, par exemple au niveau des voies urogénitales ou au niveau des cavités dentaires après une extraction, le risque d'hémorragie est augmenté par rapport à un site avec un potentiel fibrinolytique plus faible (Salomon *et al.*, 2006). Le traitement de cette pathologie est basée sur des anti-fibrinolytiques, des dérivés plasmatiques de FXI ou du plasma frais congelé, ainsi que du FVIIa recombinant en pré-opératoire (Bolton-Maggs *et al.*, 2014; Duga and Salomon, 2013).

8) Déficit congénital en facteur XIII

Le déficit en facteur XIII est une maladie autosomique récessive de la coagulation (Dorgalaleh and Rashidpanah, 2016). Elle est associée à des mutations d'un des gènes codant pour le facteur XIII : *F13A* présent sur le chromosome 6 et codant pour la sous-unité A, ou le *F13B* présent sur le chromosome 1 et codant pour la sous-unité B (Board *et al.*, 1992; Saito *et al.*, 1990). Ce déficit est classifié en trois groupes : type I FXIII-A, type II FXIII-A, et FXIII-B. Le type I est un déficit quantitatif résultant en une diminution de la production d'un FXIII-A normal, tandis que le type II est caractérisé par une concentration normale ou proche, d'un FXIII-A défectueux. Le déficit FXIII-B est caractérisé par une diminution de la concentration et de l'activité du FXIII-B (Kohler *et al.*, 2011). Les déficits en FXIII-A affectent environ une personne sur 1 à 3 millions (Ivaskevicius *et al.*, 2007). Le symptôme le plus commun chez les patients souffrant de déficience en FXIII est l'hémorragie du cordon ombilical. De plus, des hémorragies intracrâniennes sont fréquemment décrites et sont la première cause de mortalité chez ces patients (Anwar *et al.*, 2002; Dorgalaleh *et al.*, 2017; Naderi *et al.*, 2014). Un traitement prophylactique de substitution est mis en place immédiatement après le diagnostic, utilisant du FXIII recombinant. Néanmoins, si ce facteur recombinant n'est pas disponible, l'utilisation de FXIII cryoprécipité ou de dérivé plasmatique de FXIII est possible (Biswas *et al.*, 2014; Caudill *et al.*, 2009; Menegatti and Peyvandi, 2019).

9) Déficit congénital en facteurs vitamine K-dépendants

Les facteurs de coagulation vitamine K-dépendants (prothrombine, FVII, FIX et FX) ont besoin de l' α -glutamyl carboxylase (GGCX) et de VKORC1 (vitamin K epoxide reductase enzyme complex) pour leur synthèse (Brenner *et al.*, 2009). Le déficit en facteurs vitamine K-dépendants est un trouble autosomique récessif de la coagulation. Le premier cas recensé a été décrit en 1966, chez une jeune fille présentant un taux faible ou indétectable de prothrombine, FVII, FIX et FX (McMillan and Roberts, 1966). Deux gènes sont impliqués dans cette pathologie : le gène *GGCX* codant pour la protéine du même nom, présent sur le chromosome 2 ; et le gène *VKORC1* codant pour la protéine du même nom, présent sur le chromosome 16 (Fregin *et al.*, 2002; Kuo *et al.*, 1995; Rost *et al.*, 2004a). Une mutation du gène *GGCX* correspond au déficit en facteurs vitamine K-dépendants de type I (Soute *et al.*, 1992), et la mutation du gène *VKORC1* correspond au type II (Fregin *et al.*, 2002). Les symptômes

cliniques de cette pathologie varient en fonction de la concentration des facteurs de coagulation. Les patients atteints d'une forme sévère montrent dès la naissance des hémorragies intracrâniennes spontanées, ou des saignements du cordon ombilical, pouvant être létaux. Plus tard, ils présentent des hémarthroses, des saignements péritonéaux, des tissus mous ou gastro-intestinaux (Brenner *et al.*, 2009; Oldenburg *et al.*, 2000). Un traitement à la vitamine K permet de restaurer l'activité des facteurs de coagulation, et peut être administré par voie orale ou parentérale (Marchetti *et al.*, 2008; Rost *et al.*, 2004b).

II. La maladie de von Willebrand

La maladie de von Willbrand (vWD) a été décrite pour la première fois en 1926 par le docteur Erik von Willebrand. Il l'a décrit comme étant une pathologie hémorragique héréditaire différente de l'hémophilie, affectant les membres des deux sexes d'une même famille dans l'archipel d'Åland en Finlande (Nilsson, 1999). La vWD est le trouble héréditaire de l'hémostase le plus commun, affectant environ 1% de la population. Elle est due à un déficit quantitatif et/ou qualitatif en facteur de von Willebrand (VWF) (Rodeghiero *et al.*, 1987; Sadler *et al.*, 2006). La classification établie par l'« International Society on Thrombosis and Haemostasis » définit trois types de vWD : le type 1, caractérisé par un déficit quantitatif partiel de VWF ; le type 2, caractérisé par un déficit fonctionnel de VWF, et divisé en 4 catégories ; le type 3, caractérisé par un déficit total en VWF (Tableau VIII). Dans la plupart des cas, la vWD est une maladie autosomique dominante, mais elle peut parfois être récessive (Leebeek and Eikenboom, 2016a; Sadler, 1994; Sadler *et al.*, 2006). Elle est le plus souvent associée à une diminution de la concentration en FVIII (Federici *et al.*, 2014).

Tableau VIII: Classification de la maladie de Von Willebrand

Type	Sous-type	Physiopathologie	Fréquence
Type 1	-	Déficit quantitatif partiel en VWF	50-75%
Type 2	2A	Diminution d'affinité du VWF pour les plaquettes et le sous-endothélium Absence de multimères de haut poids moléculaire	20-45%
	2B	Augmentation de la fixation entre le VWF et les plaquettes	
	2M	Anomalie d'interaction VWF-plaquettes, sans déficit des multimères de haut poids moléculaire.	
	2N	Diminution de l'affinité entre le VWF et le FVIII, associé à une diminution du taux de FVIII sanguin	
Type 3	-	Déficit quantitatif total en VWF	> 5%

D'après Castaman *et al.*, 2003; Leebeek and Eikenboom, 2016; Sadler, 1994; Sadler *et al.*, 2006.

1) Les différents types de la maladie de von Willebrand

a. Type 1

La vWD de type 1 est le type de vWD le plus fréquent, représentant environ 50 à 75% des patients (Castaman *et al.*, 2003). Il est attribué à une diminution proportionnelle de la concentration en VWF et de son activité fonctionnelle, sans atteinte significative de sa structure multimérique, et pouvant être associé à une diminution de la concentration en FVIII (Sadler *et al.*, 2006). Le diagnostic des patients souffrant du type 1 de la vWD est complexe en raison de la variabilité de la concentration en VWF dans la population normale. En moyenne, la concentration sanguine de VWF est de 100 UI/dL, mais varie entre 50 et 200 UI/dL (Gill *et al.*, 1987; Nichols *et al.*, 2008). Par conséquent, le seuil délimitant une concentration de VWF physiologique ou pathologique est difficile à définir. Plus la concentration est faible, plus il est aisé de diagnostiquer la vWD de type 1. Les individus présentant un taux de VWF < 30 UI/dL sont considérés comme atteints de cette pathologie. À l'inverse, les patients présentant un taux de VWF entre 30 et 50 UI/dL posent problème pour le diagnostic et le traitement (Leebeek and Eikenboom, 2016a). En effet, dans le cas d'une concentration < 30 UI/dL, les patients portent le plus souvent une mutation au niveau du gène *VWF*, entraînant une diminution de la sécrétion du VWF (Eikenboom *et al.*, 1996), une sensibilité plus accrue à la clairance (Sadler *et al.*, 2006) ou à la protéolyse par ADAMST13 (Bowen and Collins, 2004). Chez les patients présentant un taux entre 30 et 50 UI/dL, la cause de la pathologie peut être due à d'autres facteurs, comme le groupe sanguin (Flood *et al.*, 2016). En effet, 80% des américains présentant un taux faible de VWF sont de groupe O (Gill *et al.*, 1987).

b. Type 2

La vWD de type 2 est caractérisé par un déficit fonctionnel du VWF.

Le type 2A est défini par une anomalie de l'interaction du VWF avec les plaquettes et le sous-endothélium, associée à une absence de multimères de haut poids moléculaire. Les mutations du gène *VWF* associées au type 2A peuvent impacter le processus de dimérisation (Kinoshita *et al.*, 1984; Schneppenheim *et al.*, 1996), de multimérisation (Gaucher *et al.*, 1994; Ruggeri *et al.*, 1982a), de formation d'un pont disulfure (Schneppenheim *et al.*, 2001; Zimmerman *et al.*, 1986), ou bien augmenter la sensibilité à la protéolyse (Dent *et al.*, 1991; Lyons *et al.*, 1992).

Le type 2B est caractérisé par une mutation gain de fonction sur le gène *VWF*, augmentant la capacité du VWF à fixer le récepteur GPIb α des plaquettes, entraînant la dégradation et la diminution de VWF de haut poids moléculaire (Dupont et al., 2019; Nichols et al., 2008; Ruggeri and Zimmerman, 1980). Les mutations du gène *VWF* associées au type 2B se situent au niveau du domaine A1 ou à proximité de celui-ci, impactant le domaine de liaison au récepteur GPIb α (Cooney *et al.*, 1991; Kroner *et al.*, 1992). Les patients souffrant du type 2B présentent souvent une thrombopénie, aggravée en cas d'opération chirurgicale ou de grossesse (Giles *et al.*, 1987; Hultin and Sussman, 1990). Ces thrombopénies sont probablement causées par une séquestration d'agrégats VWF-plaquettes dans la microcirculation. Ces agrégats sont dissous par la protéolyse de VWF par ADAMST13, provoquant alors la baisse de VWF de haut poids moléculaire (Casonato *et al.*, 1990; Nichols *et al.*, 2008). Une autre caractéristique du type 2B est la thrombocytopénie, dont l'origine est mal connue. En 2009, une étude regroupant 67 patients atteints de la vWD de type 2B montre que le degré de thrombocytopénie dépend de la mutation du gène *VWF*, et que la tendance hémorragique est directement corrélée à la numération plaquettaire (Federici *et al.*, 2009a). Différentes hypothèses pourraient expliquer la thrombocytopénie, comme une altération de la production de plaquettes (Nurden *et al.*, 2006) ou par la présence d'agrégats de VWF / plaquettes circulants en cours d'élimination (Casari *et al.*, 2013b; Nurden *et al.*, 2000; Rayes *et al.*, 2010).

Le type 2M est défini par une anomalie d'interaction VWF-plaquettes, sans déficit des multimères de haut poids moléculaire. Les mutations du gène *VWF* associées au type 2M se situent également au niveau du domaine A1, diminuant son interaction avec le récepteur GPIb (Hillery *et al.*, 1998; Mancuso *et al.*, 1996). Toutefois, une mutation au niveau du domaine A3 est également reportée, réduisant l'interaction VWF-collagène et donc l'adhérence plaquettaire (Ribba *et al.*, 2001).

Le type 2N est défini par une forte diminution de l'affinité entre le VWF et le FVIII, provoquant une baisse du taux de FVIII sanguin, semblable aux cas d'hémophilie A (Mazurier and Meyer, 1996; Mazurier *et al.*, 1990; Nishino *et al.*, 1989). Les mutations causant cette forme se situent au niveau des domaines D'D3, impliqués dans les interactions entre VWF et FVIII (Hilbert *et al.*, 2003; Kroner *et al.*, 1991). La mutation Arg854Gln est la plus courante, ayant un impact mineur sur le taux de FVIII, causant la forme la moins sévère de la vWD de type 2N (Mazurier and Meyer, 1996).

c. Type 3

La forme la plus sévère de la vWD est le type 3, défini par un déficit quantitatif total en VWF. Elle est caractérisée par un taux et une activité indétectable de VWF, également associés à un taux très faible en FVIII (entre 1 et 9 UI/dL) (Lak *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1992). Des mutations non-sens et des décalages du cadre de lecture causent généralement la vWD de type 3, bien qu'elle puisse également être due à des délétions, des insertions ou des mutations faux-sens (Baronciani *et al.*, 2003; Eikenboom, 2001).

d. Syndrome de von Willebrand acquis

Il existe une forme acquise de la vWD, nommée AvWS (acquired von Willebrand syndrome), caractérisée par un déficit du VWF n'étant pas causé par une mutation du gène *VWF*, mais lié à d'autres pathologies (Nichols *et al.*, 2008). Ce syndrome se traduit par une absence de symptômes hémorragiques préalables et d'historique familial, ainsi que par l'apparition tardive de la pathologie. Le diagnostic est généralement posé devant un syndrome hémorragique, post-opératoire ou post-traumatique (Kumar *et al.*, 2003; Rodeghiero *et al.*, 1987). Contrairement à la vWD constitutionnelle, l'AvWS est une coagulopathie rare, avec une prévalence difficile à établir, toutefois estimée à 0,04% de la population générale (Kumar *et al.*, 2003). Cette pathologie est décrite pour la première fois en 1968, chez un garçon de 7 ans atteint d'un lupus érythémateux systémique (Simone *et al.*, 1968). D'après les résultats de « the International Society of Thrombosis and Hemostasis », l'AvWS semble se développer chez les patients présentant des néoplasmes lymphoprolifératifs et myéloprolifératifs, des pathologies cardiaques, des tumeurs solides ou des maladies auto-immunes (Federici *et al.*, 2000; Mital *et al.*, 2015a, 2015b). La pathogénèse de l'AvWS est complexe et partiellement connue. Dans la plupart des cas, la synthèse et la sécrétion du VWF par les mégacaryocytes et les cellules endothéliales sont normales (Mital, 2016; Siaka *et al.*, 2003). Plusieurs mécanismes peuvent conduire à cette pathologie : 1) le développement d'auto-anticorps, impactant la fonction du VWF et augmentant sa clairance ; 2) l'adsorption du VWF par les cellules cancéreuses ou les plaquettes, résultant en une augmentation de sa clairance ; et 3) la perte des multimères de haut poids moléculaire en raison d'une augmentation des forces de cisaillement et/ou de la protéolyse (Collins *et al.*, 2008; Mital, 2016; Tefferi and Nichols, 1997). La stratégie thérapeutique est basée sur l'identification et le traitement de la maladie associée, causant

l'AvWS. Toutefois, le traitement des hémorragies est nécessaire, et comporte plusieurs options : 1) l'injection d'un concentré de VWF ou d'un VWF recombinant, pouvant être associé au FVIII ou à la desmopressine (Federici, 2006; Federici *et al.*, 1998; Tiede *et al.*, 2011) ; 2) l'injection d'immunoglobuline chez les patients présentant une maladie lymphoproliférative ou une maladie auto-immune (Federici, 2005; Michiels and van Vliet, 1999) ; ou 3) la plasmaphérèse additionnée de plasma frais congelé chez les patients ne répondant pas aux autres traitements (Federici, 2000; Silberstein *et al.*, 1987).

2) Manifestation clinique

Les symptômes de la vWD varient en fonction des patients, du type et du niveau d'activité du VWF (Leebeek and Eikenboom, 2016a). Chez l'enfant, les symptômes les plus fréquents sont les contusions, l'épistaxis et les ménorragies (Sanders *et al.*, 2015). Chez l'adulte, ce sont les ménorragies, les saignements cutanés, les saignements de la cavité buccale, et le saignement abondant de blessures mineures. La majorité des patients (60 à 80%) présentent des saignements post-opératoires, ou après une extraction dentaire (de Wee *et al.*, 2012). Les saignements majeurs, pouvant entraîner le décès du patient, sont les saignements gastro-intestinaux, causés par des angiodysplasies digestives. Ces saignements sont plus fréquents chez les patients âgés atteints de la vWD de type 2 ou 3 (Franchini and Mannucci, 2013; Makris *et al.*, 2015; de Wee *et al.*, 2012). Des hémarthroses avec arthropathie sont rarement observées, à l'exception des patients atteints du type 3 et du type 2N ayant un déficit sévère en FVIII (van Galen *et al.*, 2012, 2017; de Wee *et al.*, 2012). Chez les patientes, il est fréquemment observé des saignements post-partum (Castaman and James, 2019; De Wee *et al.*, 2011).

3) Traitements

L'objectif thérapeutique est de corriger les taux de VWF et de FVIII. Le traitement repose sur trois grands principes : 1) l'augmentation de la concentration plasmatique de VWF par les cellules endothéliales (desmopressine) ; 2) la perfusion de concentré de VWF en association ou non avec du FVIII ; 3) l'utilisation d'agents non spécifiques (Calmette and Clauser, 2018).

La desmopressine est un analogue de la vasopressine, une hormone antidiurétique. La desmopressine stimule la sécrétion de VWF (et de FVIII) des cellules endothéliales par son effet agoniste sur le récepteur vasopressine V2 (Kaufmann and Vischer, 2003; Kaufmann *et al.*, 2000). Ce traitement est utilisé chez les patients présentant un type 1 de la vWD, est inefficace chez les patients présentant un type 3, et peut aggraver la thrombopénie chez les patients de type 2B (Castaman and Linari, 2017; Castaman *et al.*, 2008; Federici *et al.*, 2009b; Ruggeri *et al.*, 1982b). La desmopressine – injectée en intraveineuse, en intra-nasale ou en sous-cutanée – permet de multiplier par 2 à 4 la concentration sanguine de VWF et FVIII en 30 à 60 minutes (Köhler and Harris, 1988; Leissinger *et al.*, 2014; Siew *et al.*, 2014). Le développement de tachyphylaxies, c'est-à-dire la réduction progressive de la réponse du VWF due à l'épuisement des stocks de VWF après plusieurs injections rapprochées, est la limite majeure de ce traitement, en particulier lorsqu'un traitement prolongé est nécessaire (chirurgie lourde ou de traumatisme sévère). Les principaux effets secondaires de ce traitement sont le flush facial et l'hypotension. Des complications cardiovasculaires ou une hyponatrémie sont des effets secondaires plus rares (Leebeek and Eikenboom, 2016a; Leissinger *et al.*, 2014; Rodeghiero *et al.*, 2009).

L'injection intraveineuse de concentré plasmatique de VWF seul ou de VWF-FVIII est le traitement le plus efficace pour les patients pour lesquels la desmopressine n'est pas efficace, c'est-à-dire les patients atteints du type 3 et pour la plupart des patients atteints du type 2 (Leebeek and Eikenboom, 2016a; Lethagen *et al.*, 2004). Ce traitement substitutif est recommandé en cas d'opération chirurgicale ou de traumatisme, et n'est pas recommandé en traitement prophylactique (Borel-Derlon *et al.*, 2007; Leebek and Eikenboom, 2016a). Toutefois, certains patients atteints de la vWD de type 3 développent des allo-anticorps anti-VWF en réponse à la transfusion de concentré plasmatique. Ces allo-anticorps peuvent inhiber le rôle hémostatique du traitement, et peuvent causer des réactions allergiques létales (Baronciani *et al.*, 2003; James *et al.*, 2013; Mannucci *et al.*, 1981b). Par conséquent, et pour limiter les risques de transmissions virales, un VWF recombinant a été mis au point. Baxter-Baxalta (par la suite acheté par Shire, puis par Takeda) produisent du VWF recombinant grâce à la lignée cellulaire CHO (chinese hamster ovary), également utilisée pour la production de FVIII recombinant. Vanicog alpha, dont la marque est Veyvondi (ou Vonvendi aux Etats-Unis), est une protéine VWF recombinante hautement purifiée, produite en absence de la protéase

ADAMTS13 permettant d'obtenir des VWF de haut poids moléculaire (Mannucci, 2019; Turecek *et al.*, 2009). Différentes études menées chez des patients atteints de vWD montrent l'intérêt et l'efficacité du produit : une étude en phase 1 a défini le profil pharmacocinétique et pharmacodynamique de Vonicog alpha chez 32 patients atteints de formes sévères (type 3 ou type 1 sévère) (Mannucci *et al.*, 2013) ; une étude en phase 3 sur des patients atteints de forme sévère, traités à la demande pour différents types d'épisodes hémorragiques (Gill *et al.*, 2015) ; une étude en phase 3 chez des patients atteints d'une forme sévère lors d'une chirurgie non urgente (Peyvandi *et al.*, 2019).

L'agent non spécifique le plus utilisé est l'acide tranexamique. C'est un anti-fibrinolytique particulièrement efficace sur les hémorragies des muqueuses (ménorragies, métrorragies, épistaxis, chirurgie bucco-dentaire). Il est utilisé pour les formes mineures de la pathologie, ou en complément d'un traitement substitutif pour les interventions chirurgicales, au niveau buccal, uro-génital ou gastro-intestinal. Par ailleurs, des saignements prolongés malgré un traitement avec un concentré de VWF peuvent être contrôlés par des transfusions plaquettaires (Calmette and Clauser, 2018; Leebeek and Eikenboom, 2016b; Mannucci, 2009).

III. Les hémophilies A et B

Cette partie va traiter majoritairement de l'hémophilie B, tandis que l'hémophilie A sera détaillée dans un chapitre dédié.

1) Historique

L'hémophilie est une pathologie ancienne, dont les premiers cas semblent remonter au II^{ème} siècle après J.-C. En effet, le Talmud de Babylone indique qu'une femme ayant perdu ses 2 premiers fils à la suite de la circoncision, est autorisée à ne pas faire circoncire les suivants, faisant référence à des saignements fatals (Rosendaal *et al.*, 1991; Rosner, 1969). La première description « moderne » de l'hémophilie apparaît en 1803. Le médecin américain John Conrad Otto décrit un trouble hémorragique héréditaire dans plusieurs familles et sur plusieurs générations, où seul les hommes sont affectés, et dont la transmission se fait via une femme non affectée (Otto, 1996). En 1820, le Dr Nasse est le premier à donner une description génétique du trouble hémorragique. Dans la « Loi de Nasse », il indique que les femmes des familles atteintes transmettent ce trouble de leur père à leurs fils, sans qu'elles-mêmes ne l'expriment (Nissé, 1927). Le terme « hémophilie » émerge en 1828, par le médecin allemand Johann Lukas Schönlein, dans sa dissertation à l'Université de Zurich.

Dans les années 1830-1900, l'hémophilie est aussi connue sous le nom de « maladie des rois », en raison de nombreux cas répertoriés chez les membres des familles royales Européennes. Le fils Leopold (mort à 37 ans d'hémorragie cérébrale) de la célèbre reine Victoria d'Angleterre était atteint d'hémophilie. Les deux filles de la reine, vectrices à leur tour et l'ont transmise aux familles royales d'Espagne, d'Allemagne et de Russie (Ingram, 1976). En 1893, le Dr. Wright décrit pour la première fois l'hémophilie comme étant un temps de coagulation anormalement long (Wright, 1893). Suite à cela, de nombreuses recherches et essais thérapeutiques seront menés pour déterminer la cause et le traitement de ce trouble de la coagulation.

En 1946, Taylor et son équipe identifient la protéine responsable de l'hémophilie, qu'ils nomment « globuline anti-hémophilique » (Schramm, 2014). Entre 1946 et 1952, différentes équipes ont constaté une coagulation normale en mélangeant le sang de 2 patients hémophiles. Biggs et son équipe identifient alors deux types d'hémophilies : l'hémophilie A, décrite comme une déficience de la « globuline anti-hémophilique », et l'hémophilie B (ou

« Christmas disease ») comme une déficience dans un autre facteur, nommé le « Christmas Factor » (Biggs *et al.*, 1952). L'hémophilie ayant touchée les familles royales était une forme sévère d'hémophilie B (Rogaev *et al.*, 2009).

Le premier « Comité International pour la Nomenclature des facteurs de coagulation » en 1954 renomme officiellement les différents facteurs de coagulation : la « globuline anti-hémophilique » est alors nommée « Facteur VIII », et le « Christmas Factor » est nommé « Facteur IX ». Ce n'est qu'en 1965 que Judith Pool révolutionne le traitement de l'hémophilie, lorsqu'elle réussit à cryo-précipiter un concentré de fibrinogène et de Facteur VIII à partir de plasma, par la suite injecté chez les patients (Pool and Shannon, 1965). Ce procédé a permis une augmentation drastique de la qualité et de l'espérance de vie des hémophiles.

2) Description

Les hémophilies A et B sont des troubles de la coagulation caractérisés par un déficit quantitatif et/ou fonctionnel en facteur VIII (FVIII) ou en facteur IX (FIX) respectivement. Ce sont des maladies génétiques liées au chromosome X, à transmission récessive (Mannucci and Tuddenham, 2001). L'hémophilie B est moins commune que l'hémophilie A. D'après la « World Federation of Hemophilia », l'hémophilie B représente 15 à 20% de la population hémophile totale (*World Federation of Haemophilia*). La sévérité de ces pathologies est catégorisée par l'activité coagulante des facteurs VIII ou IX. La maladie est définie comme sévère lorsque l'activité coagulante est inférieure à 1% ; modérée lorsqu'elle est située entre 1 et 5% ; et légère lorsqu'elle est située entre 5 et 40% (Carcao, 2012; <https://afh.asso.fr>; Plug *et al.*, 2006; Srivastava *et al.*, 2013). Le traitement principal des hémophilies consiste en une thérapie de remplacement, avec des facteurs recombinants ou dérivés du sang, administré soit « sur demande », soit de manière prophylactique (Franchini, 2014; Royal *et al.*, 2002). Cliniquement, les hémophilies A et B sont souvent considérées comme indiscernables, étant toutes deux des troubles de la coagulation héréditaire, liées au chromosome X, présentant des phénotypes semblables. En effet, les manifestations cliniques classiques de ces pathologies sont des saignements au niveau artriculaire et musculaire (Srivastava *et al.*, 2013).

3) Traitement

La prophylaxie primaire, c'est-à-dire l'injection régulière d'un concentré de FIX après la première hémarthrose ou avant l'âge de 2 ans, est le traitement standard des formes sévères d'hémophilie B (Morfini et al., 1976). Il peut s'agir de FIX dérivé du sang (Lissitchkov et al., 2010), ou bien de FIX recombinant (Monahan and Di Paola, 2010; United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation, 2003). Ce traitement permet de prévenir les dommages articulaires, diminue la fréquence des saignements et améliore la qualité de vie.

4) Complication

Une complication majeure de l'hémophilie est le développement d'allo-anticorps contre le facteur injecté, rendant alors le traitement inefficace (Astermark et al., 2010; Franchini and Mannucci, 2011). Toutefois, dans le cas de l'hémophilie B, cette complication est rare (1 à 5% des patients) ; tandis qu'elle atteint 25 à 50% des patients hémophile A (Bolton-Maggs and Pasi, 2003; Brettler, 1996; Srivastava et al., 2013).

La stratégie à adopter dans ces cas dépend de la sévérité de la pathologie, de la concentration en anticorps inhibiteur et des réactions allergiques potentielles causées par ces anticorps. Pour les patients sans symptômes allergiques, ayant un faible taux d'inhibiteur et une bonne réponse clinique à l'injection de FIX, il est recommandé de continuer le traitement avec le FIX à plus forte dose. Pour les patients sans symptôme allergique, avec un haut taux d'inhibiteur ou une mauvaise réponse clinique à l'injection, il est recommandé d'effectuer une thérapie d'induction de la tolérance immunitaire (thérapie ITI). En cas d'échec, il est recommandé de remplacer le FIX par du FVIIa recombinant. Pour les patients ayant des symptômes allergiques et présentant des saignements peu réguliers, le traitement au FVIIa recombinant est conseillé. En cas d'échec, la thérapie ITI doit être envisagée. Enfin, pour les patients ayant des symptômes allergiques, un phénotype hémorragique sévère et ne répondant pas au traitement FVIIa recombinant, une thérapie ITI est recommandée, précédée d'une désensibilisation et/ou accompagnée d'un traitement immunosuppresseur (Beutel et al., 2009; Bon et al., 2015; Dolan et al., 2018; Kempton and Meeks, 2014)

Chapitre 4 : L'Hémophilie A

I. Hémophilie A : maladie génétique

1) Description de l'hémophilie A

L'hémophilie A est un trouble de la coagulation héréditaire causée par une anomalie du gène *F8*, entraînant une altération fonctionnelle et/ou quantitative de l'expression du facteur de coagulation VIII (FVIII). Il s'agit d'une maladie génétique rare touchant environ 1 personne sur 5000, à transmission récessive liée au chromosome X. Dans environ 2/3 des cas, la mutation provient d'un héritage familial, et dans le tiers restant, il s'agit de mutation *de novo* (apparition sporadique de la maladie). Les femmes étaient historiquement décrites comme étant uniquement vectrices de la pathologie (Nissé, 1927). Aujourd'hui, il est acquis que les femmes porteuses de la mutation présentent une coagulation anormale, dû à une concentration de FVIII plus faible que la population normale (Carcao, 2012; <https://afh.asso.fr>; Plug *et al.*, 2006). Il existe également de rares cas de femmes exprimant l'hémophilie A, pouvant être dus à la réception de deux chromosomes X mutés (parents porteurs de mutations du gène *F8*), ou bien à l'inactivation du chromosome X portant l'allèle sain (Carcao, 2012; Mannucci and Tuddenham, 2001; Morita *et al.*, 1971; Song *et al.*, 2011).

Les critères de diagnostic de l'hémophilie A incluent : 1) la présence d'une mutation du gène *F8*, 2) un taux d'activité du FVIII inférieur à 40% du taux normal, 3) l'absence de la maladie de von Willebrand (Kurian *et al.*, 2020). L'ampleur des manifestations cliniques est fonction de la sévérité de la pathologie, qui est directement liée à l'activité coagulante du FVIII mesurée dans le plasma. La forme la plus sévère de l'hémophilie A touche 40% des patients, avec une activité du FVIII coagulant (FVIII:C) inférieure à 1%. La forme modérée de la pathologie affecte 20% des patients, avec une activité du FVIII:C entre 1 et 5% ; et la forme mineure concerne alors 40% des patients, avec un taux de FVIII:C pouvant aller jusqu'à 40%. Les formes sévères et modérées de l'hémophilie A se manifestent par des saignements récurrents, pouvant être spontanés dans les formes sévères (sans traumatisme visible), principalement au niveau des muscles (hématomes) et des articulations (hémarthroses). La récurrence de ces saignements peut conduire au développement d'arthropathies hémophiliques invalidantes, et dans certains cas peuvent engager le pronostic vital du patient. Pour les formes mineures, les saignements seront

moins fréquents et le plus souvent observés suite à des traumatismes ou lors d'intervention chirurgicales (Tableau IX). Concernant les femmes porteuses d'une mutation du gène *F8*, elles présentent une concentration en FVIII:C d'environ 50%, et ont tendance à saigner plus fréquemment que la normale, notamment après des interventions chirurgicales, lors des ménorrhées ou de l'accouchement (Carcao, 2012; <https://afh.asso.fr>; Plug *et al.*, 2006).

Tableau IX : Les différentes formes de l'hémophilie A.

Forme de l'hémophilie	Taux de FVIII	Symptômes
Mineure	5% à 40%	Saignements anormaux suite à des blessures mineures, chirurgies, extraction dentaire. Pas de saignements spontanés.
Modérée	1% à 5%	Saignements anormaux suite à des blessures mineures, chirurgies, extraction dentaire. Rares saignements spontanés, articulaire et musculaire.
Sévère	< 1%	Saignements anormaux suite à des blessures mineures, chirurgies, extraction dentaire. Saignements spontanés très fréquents, articulaire et musculaire.

D'après Carcao, 2012; <https://afh.asso.fr>; Plug *et al.*, 2006; Srivastava *et al.*, 2013

2) Anomalies génétiques entraînant l'hémophilie A

Les anomalies génétiques du gène *F8* à l'origine de la pathologie sont extrêmement variées, expliquant l'hétérogénéité phénotypique retrouvée chez les patients. Ces anomalies peuvent toucher une partie plus ou moins importante du gène *F8*, au niveau des exons et des introns. La base de données des facteurs de coagulation EAHAD (European Association for Haemophilia and Allied Disorders) recense 3052 variants uniques du gène *F8*, correspondant à 10 144 cas d'hémophilie A dans le monde (Figure 8) (McVey *et al.*, 2020).

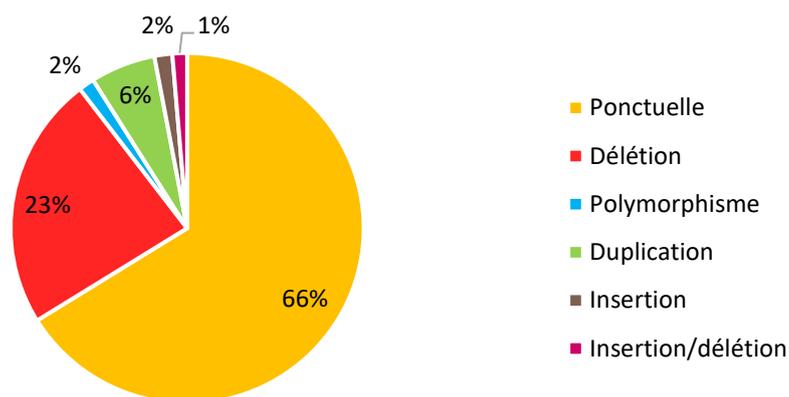


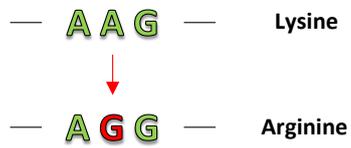
Figure 8 : Fréquence des types de mutation du gène F8. Graphique issu de la base de données EAHAD (<http://f8-db.eahad.org/statistics.html.php>) montrant les statistiques des types de mutations du gène F8 responsables de l'hémophilie A.

Les mutations ponctuelles du gène *F8* dans l'hémophilie A sont les anomalies les plus fréquentes, comprenant des mutations faux-sens, non-sens, ainsi que des mutations altérant l'épissage (Figure 9). Les mutations faux-sens semi-conservatrices (où le nouvel acide aminé et l'acide aminé normal sont similaires) sont le plus souvent associées à une forme mineure, sauf si elles se trouvent dans une région structurellement ou fonctionnellement importante. Les mutations faux-sens non-conservatrices sont plutôt associées à une forme modérée à sévère, en fonction de la région touchée. Les mutations non-sens, à l'origine d'un codon stop prématuré, impliquent que la protéine est tronquée et donc le plus souvent non-fonctionnelle. Ces mutations sont donc retrouvées dans les formes sévères de la pathologie. Les conséquences des mutations créant ou supprimant un site d'épissage sont variables. Si le transcrit peut-être correctement produit, cela conduira à une forme modérée à mineure ; si ce n'est pas le cas, cela conduira plutôt à une forme sévère (Bhopale and Nanda, 2003; Bowen, 2002).

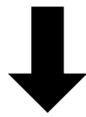
La deuxième anomalie la plus fréquente dans l'hémophilie A est la délétion, incluant une délétion totale ou partielle (plus ou moins conséquente) du gène. Les délétions peuvent concerner les parties non codantes ou codantes du gène, pouvant créer un décalage dans le cadre de lecture. Les délétions, éliminant un pan entier du gène, sont généralement associées à une forme sévère de la maladie (Bowen, 2002).

A

Mutation faux-sens semi conservatrice



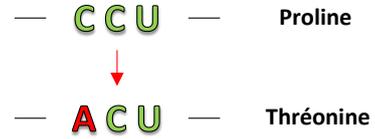
La Lysine et l'Arginine sont structurellement proches



Forme mineure
(Sauf dans une région importante comme a3)

B

Mutation faux-sens non conservatrice



La Proline et la Thréonine sont structurellement différentes

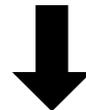


Forme modérée

Forme sévère
(Dans une région importante comme a3)

C

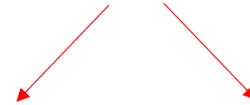
Mutation non-sens



Forme sévère

D

Altération de l'épissage

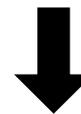


Protéine tronquée

Protéine suffisamment
intègre



Forme sévère



Forme
modérée/mineure

Figure 9 : Conséquence des mutations ponctuelles dans l'hémophilie A.

Néanmoins, la base de données EAHAD ne prend pas en compte les réarrangements géniques, plus rares à l'exception de l'inversion de l'intron 22 (Inv22) et de l'intron 1 (Inv1) du gène *F8*. L'Inv22 résulte d'une recombinaison intra-chromosomique responsable de près de la moitié des cas de formes sévères de l'hémophilie A. L'intron 22 contient une séquence riche en nucléotides GC de 9.5 kb (*int22h-1*), pouvant interagir avec 2 séquences homologues : *int22h-2* et *int22h-3*. Ces 2 copies sont orientées dans le sens opposé à *int22h-1*. Il existe 2 types d'Inv22 : le type 1 (Inv22-1) impliquant *int22h-1* et *int22h-3*, et le type 2 (Inv22-2), impliquant *int22h-1* et *int22h-2*, après une inversion préalable entre *int22h-2* et *int22h-3*. Ces 2 types d'Inv22 entraînent le déplacement des exons 1 à 22 en direction du télomère, les séparant des exons 23 à 26. Deux ARNm seront alors transcrits : le premier contient les exons de 1 à 22, une partie de l'intron 22 ainsi que 2 exons non-FVIII (sous le contrôle du promoteur du gène *F8*) ; le deuxième est le transcrit de *F8B* (Figure 10A) (De Brasi and Bowen, 2008; Graw *et al.*, 2005; Sauna *et al.*, 2015).

L'Inv1 est plus rare, environ 1 à 5% des cas sévères d'hémophilie A. L'intron 1 contient une séquence d'environ 1 kb nommée *int1h-1*. En amont de l'exon 1, il existe une région homologue nommée *int1h-2*, différente d'un seul nucléotide et orientée dans le sens inverse de l'*int1h-1*. Cette inversion entraîne la séparation de l'exon 1 du reste du gène. Deux ARNm chimériques en résultent : le premier contient l'exon 1 suivi par des exons facultatifs, ainsi que les exons de 2 à 6 du gène *VBP1* (sous le contrôle du promoteur *F8*) ; le deuxième est transcrit sous le contrôle du promoteur C6.1A, contient tous les exons (sauf le dernier) du gène *C6.1A* suivi par des exons facultatifs, ainsi que les exons 2 à 26 du gène *F8* (Figure 10B) (Bagnall *et al.*, 2002; Graw *et al.*, 2005).

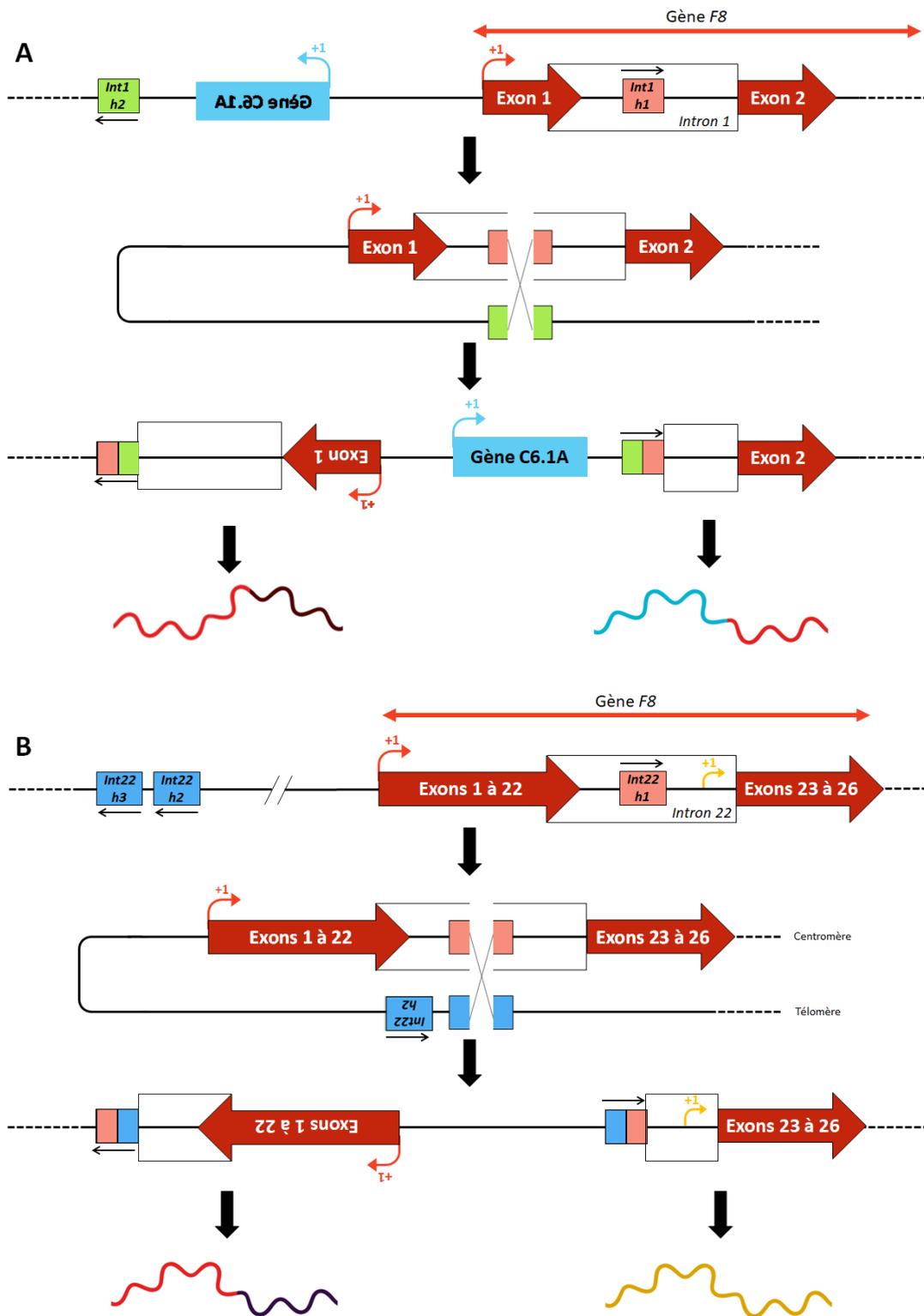


Figure 10 : Inversion intra-chromosomique de F8 responsable de forme sévère d’hémophilie A. A) Inv1 : recombinaison homologue entre int1h1 présent dans l’intron 1 et int1h2 extragénique de séquence identique (à l’exception d’un nucléotide), conduisant à la production de deux ARNm chimériques B) Inv22 de type 1 : recombinaison homologue entre int22h1 présent dans l’intron 22 et int22h3 extragénique de séquence similaire, conduisant à la production d’un ARNm chimérique et de la protéine F8B. Les flèches représentent l’orientation des séquences homologues, et les flèches « +1 » représentent les promoteurs et le sens de transcription. (Bagnall et al., 2002; De Brasi and Bowen, 2008; Graw et al., 2005; Sauna et al., 2015).

II. Manifestations cliniques

La symptomatologie clinique de l'hémophilie A est inversement corrélée à l'activité FVIII:C (Tableau IX). Les formes mineures d'hémophilie sont le plus souvent asymptomatiques, les hémorragies survenant lors de traumatismes ou d'interventions chirurgicales. Les patients atteints de formes modérées souffrent d'hémorragies parfois spontanées, mais le plus souvent à la suite de légers traumatismes. Enfin, pour les formes sévères, des saignements fréquents et spontanés au niveau musculaire sont communs, mais la marque de l'hémophilie A sévère est l'hémarthrose (Mingot-Castellano, 2019; Zimmerman and Valentino, 2013). En plus des troubles hémorragiques, certains patients souffrant d'hémophilie A présentent une densité minérale osseuse affaiblie ; un statut immunitaire différent des patients sains, caractérisé par un profil pro-inflammatoire ; ainsi qu'une augmentation de l'angiogenèse dans le cas d'arthropathie hémophilique (Bhat et al., 2015; Gamal Andrawes et al., 2020a; Goldscheitter et al., 2020; Jardim et al., 2017; Zetterberg et al., 2014). Jusqu'à récemment, ces troubles associés à l'hémophilie A étaient attribués à la sédentarité prolongée et aux hémorragies répétées chez les patients. Toutefois, le développement et la disponibilité de traitement prophylactique, ainsi que des études *in vitro* et *in vivo* sur les potentiels rôles extra-coagulants du FVIII remettent ceci en question (Valentino and Khair, 2020). Dans tous les cas, la prise en charge des saignements est essentielle à la qualité de vie des patients, ainsi que pour limiter le développement de pathologies associées.

1) Troubles hémorragiques

Les premiers symptômes hémorragiques de l'hémophilie A apparaissent le plus souvent dans l'enfance. Dans 90% des cas de forme sévère, ces symptômes apparaissent lors de la première année de vie, souvent au moment de l'apprentissage de la marche. Chez les enfants porteurs d'hémophilie sévère dont le déficit a été identifié avant l'âge de 2 ans, 81% d'entre eux ont eu au moins un épisode hémorragique, 56% un hématome superficiel, 41% un saignement ORL (cavité orale/épistaxis), 37% un traumatisme crânien, 28% une hémarthrose, 22% un hématome musculaire, et 8% une hémorragie intracérébrale associée à des séquelles dans 75% des cas. Dans de rares cas, des saignements *in utero* sont observés (les facteurs de coagulation ne pouvant pas passer la barrière placentaire) (Kulkarni et al., 2017; Zimmerman and Valentino, 2013).

L'hémarthrose est un épanchement intra-articulaire sanguin. Ces saignements sont fréquemment observés chez les enfants atteints d'hémophilie sévère, les premiers surviennent généralement avant l'âge de deux ans, le plus souvent lors de l'apprentissage de la marche. Les hémarthroses sont moins fréquentes en cas d'hémophilie modérée ou mineure, et surviennent le plus souvent après un traumatisme, parfois minime. En cas de saignements répétés, la membrane synoviale s'enflamme et s'hypertrophie, entraînant à long terme, le développement d'arthropathies hémophiliques. Les articulations les plus touchées, du plus fréquent au moins fréquent, sont les genoux, les coudes, les chevilles, les épaules, les poignets et les hanches (Mingot-Castellano, 2019; Zimmerman and Valentino, 2013).

La gravité des manifestations hémorragiques dépend de leur localisation, du risque vital encouru et du risque de complications fonctionnelles secondaires. Il existe 3 types de saignements mettant en jeu le pronostic vital des hémophiles :

- les hémorragies intracrâniennes. Elles doivent être traitées en urgence absolue avant même le diagnostic, afin d'éviter la mort cérébrale du patient à court terme ;
- les hémorragies de la région cervicale. Les hémorragies de l'espace rétro-pharyngial peuvent conduire à l'obstruction des voies aériennes supérieures, létale à court terme ;
- les hémorragies du muscle iliopsoas. Ce type de saignement entraîne une accumulation d'un grand volume de sang au niveau du rétro-péritoine, pouvant conduire à une déglobulisation et hypovolémie mortelle (Zimmerman and Valentino, 2013).

2) Troubles osseux

Chez les patients souffrant d'hémophilie A modérée et sévère, il est fréquemment observé une diminution de la densité minérale osseuse chez l'enfant et l'adulte, associée à une augmentation du risque de fracture (Caviglia et al., 2015; Gay et al., 2015; Iorio et al., 2010; Ulivieri et al., 2018). Parmi eux, 27% présentent un phénotype ostéoporotique et 43% une ostéopénie associée à un taux anormal de marqueurs du métabolisme osseux (Gerstner et al., 2009; Goldscheitter et al., 2020; Rodriguez-Merchan and Valentino, 2019). Initialement, l'étiologie de cette baisse de densité minérale osseuse était attribuée à la sédentarité et à la récurrence des hémarthroses chez les patients. Toutefois, l'avancée des traitements, et notamment la prophylaxie résulte en une protection hémostatique plus sûre, modifiant durablement le mode de vie des patients. Or, ces traitements de substitution préservent en

partie la densité minérale osseuse, sans toutefois l'abroger (Gamal Andrawes et al., 2020a; Khawaji et al., 2009).

3) Troubles vasculaires

Chez les patients souffrant d'arthropathie hémophilique, des études montrent une augmentation de l'angiogenèse, qui semble jouer un rôle important dans le développement de cette pathologie (Acharya et al., 2011; Zetterberg et al., 2014). En 2011, Acharya *et al.*, montrent une augmentation de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, stromal cell-derived factor-1, et matrix metalloprotease-9) ainsi que de monocytes/macrophages pro-angiogéniques, à la fois au niveau de l'articulation touchée et au niveau systémique (Acharya et al., 2011). En 2013, Zetterberg *et al.*, montrent une augmentation de l'angiogenèse au niveau de la membrane synoviale de patients souffrant d'arthropathie hémophilique, associé à une augmentation de l'expression de VEGF au niveau articulaire (Zetterberg et al., 2014).

4) Troubles inflammatoires

De récentes études montrent une altération de l'inflammation, et plus particulièrement de la polarisation macrophagique chez les patients hémophiles. En 2017, Jardim *et al.*, montrent un profil immunologique distinct chez les patients hémophiles, avec une tendance pro-inflammatoire (Jardim et al., 2017). En 2019, Knowles *et al.* montrent que les monocytes des patients hémophiles ont un taux de polarisation plus faible par rapport aux donneurs sains. Toutefois, cette étude a été réalisée chez des patients hémophiles A et B sans distinction (Knowles et al., 2019).

III. Prise en charge de l'hémophilie A

1) Diagnostic

Le diagnostic d'une hémophilie A repose sur la mise en évidence d'un déficit isolé en FVIII. Les hémophilies (A et B) sont suspectées dans 3 contextes principaux : 1) en cas d'antécédents familiaux ; 2) en cas d'accidents hémorragiques inexpliqués ; 3) lors d'un bilan de coagulation de routine (découverte fortuite). Une symptomatologie hémorragique est la raison principale du diagnostic de l'hémophilie, qu'il s'agisse d'une forme familiale ou sporadique (Chambost *et al.*, 2002).

a. Dépistage par mesure TCA

Lors d'un bilan de coagulation, l'hémophilie est suspectée devant un allongement isolé du temps de céphaline avec activateur (TCA). Le profil typique compatible avec le diagnostic d'hémophilie est un allongement du TCA, avec un ratio TCA malade / témoin supérieur à 1,2 et un taux de prothrombine normal. Toutefois, l'allongement du TCA peut également être observé dans d'autres situations cliniques ou thérapeutiques, il est donc recommandé de doser le taux de FVIII sanguin (Bowyer *et al.*, 2011; Peyvandi *et al.*, 2016b; Srivastava *et al.*, 2013).

b. Evaluation du type d'hémophilie A

Le diagnostic phénotypique de l'hémophilie A repose sur un dosage fonctionnel du FVIII inférieur à 40%. Il peut être réalisé selon deux méthodes : une méthode « chronométrique » et une méthode « chromogénique ». Le dosage chronométrique du FVIII est effectué sur le plasma du patient dilué et mélangé à un plasma déficient en FVIII, et repose sur la mesure d'un TCA. Le dosage chromogénique du FVIII est fondé sur la mesure de son activité enzymatique sur un substrat chromogène. Une mesure de la densité optique permet d'évaluer la concentration en FVIII. Ces deux méthodes sont complémentaires. Par ailleurs, il est important de distinguer l'hémophilie A de la maladie de von Willebrand, en analysant l'affinité du VWF du patient avec un FVIII (Bowyer *et al.*, 2011; Peyvandi *et al.*, 2016b; Srivastava *et al.*, 2013).

Suite à ces analyses (méthode chronométrique, chromogénique, ou les deux), le classement du type de la maladie est réalisé en fonction du taux de FVIII (Tableau IX). Cette classification est

nécessaire et suffisante pour proposer une prise en charge adaptée au patient et lui établir la carte d'hémophile. Il est recommandé de compléter ce diagnostic par une analyse génétique moléculaire quel que soit le degré de sévérité de l'hémophilie, afin d'optimiser la prise en charge à long terme (Peyvandi et al., 2016b; Srivastava et al., 2013).

c. Diagnostic génétique

Le génotypage confirme le diagnostic, et peut présenter un intérêt pronostic sur le risque d'apparition d'inhibiteurs, l'efficacité de l'induction de tolérance immune et sur la réponse au traitement par la desmopressine (Peyvandi et al., 2016b).

2) Outils thérapeutiques

Parmi les outils thérapeutiques utilisés dans l'hémophilie A, on distingue la protéine FVIII employée à visée substitutive, et les agents by-passant, contournant / mimant l'action du FVIII. Les traitements hémostatiques dits non spécifiques tels que l'acide tranexamique, la desmopressine sont également utilisés (voir Tableau XI dans la partie « Traitement à l'étude ») (Franchini et al., 2013; Peyvandi et al., 2016b).

a. Facteurs VIII de substitutions

Le traitement de substitution est le traitement principal de l'hémophilie A (Peyvandi et al., 2016b). Les FVIII de substitution peuvent être d'origine plasmatique (élaboré à partir de sang de patient sain), ou issus de la biotechnologie (recombinants).

Lors de l'utilisation de FVIII dérivé de sang de patients, il existe un risque de transmission d'agents infectieux comme le VIH, le VHC (virus de l'hépatite C) ou le VHB (virus de l'hépatite B), y compris ceux dont la nature est encore inconnue. Néanmoins, après le drame du sang contaminé des années 1980, ces risques sont limités par des contrôles stricts lors de la sélection des dons et la réalisation de tests de dépistage (Raso and Hermans, 2018). En outre, une recherche du matériel génomique des différents virus sur les pools de plasma est effectuée, et le traitement inclut des étapes d'élimination et d'inactivation virale (Chtourou *et al.*, 2007). Malgré cela, depuis les années 1990, l'utilisation de FVIII recombinant augmente

progressivement, jusqu'à quasiment remplacer les FVIII dérivés du sang dans les pays économiquement riches (Hermans et al., 2012).

Parmi les FVIII recombinants, on distingue ceux à demi-vie « classique », et ceux à demi-vie « allongée ». Les FVIII recombinants (FVIIIr) à demi-vie classique peuvent être composés de la protéine complète, ou de la protéine délétée de son domaine B (Raso and Hermans, 2018). Toutefois, afin d'alléger le traitement substitutif en limitant le nombre d'injections, différentes technologies ont été développées pour allonger la demi-vie du FVIII recombinant :

- La fusion d'un fragment Fc d'immunoglobuline G ou d'albumine avec le FVIIIr, inhibant sa dégradation lysosomale (Powell, 2015),
- La PEGylation du FVIIIr par liaison à une ou plusieurs chaînes Poly Ethylène Glycol (PEG), inhibant sa dégradation enzymatique et bloquant son interaction avec les récepteurs de clairance (Veronese and Pasut, 2005),
- La modification de la séquence protéique du FVIIIr, alors composée d'une chaîne polypeptidique unique avec un domaine B tronqué, permettant une liaison covalente entre les chaînes lourdes et légères. Cette forme est plus stable et a une meilleure affinité avec le VWF (Schmidbauer et al., 2015).

b. Agent by-passant

Chez certains patients, le traitement de substitution ne fonctionne pas, en raison du développement d'inhibiteurs. Dans ces cas, les agents by-passants tels que le FVIIa d'origine recombinante et les concentrés de facteurs du complexe prothrombique activés d'origine plasmatique sont utilisés. Ces deux produits sont équivalents en termes d'efficacité et d'effets indésirables thrombotiques mais la réponse à l'un ou à l'autre de ces traitements est variable en fonction des patients (Franchini et al., 2013).

c. Traitement non spécifique

La desmopressine est un analogue de la vasopressine, stimulant la sécrétion de VWF et de FVIII par les cellules endothéliales, via son effet agoniste sur le récepteur vasopressine V2. Ce traitement est indiqué chez les patients souffrant d'hémophilie A mineure (Hews-Girard et al., 2018; Loomans et al., 2018).

L'acide tranexamique est un anti-fibrinolytique particulièrement efficace sur les hémorragies des muqueuses (ménorragies, métrorragies, épistaxis, chirurgie bucco-dentaire), en inhibant l'activité de la plasmine (Chauncey and Wieters, 2020; Sheu, 2018).

Depuis 2018, un nouveau traitement non spécifique est développé (Mahlangu et al., 2018; Young et al., 2017). L'emicizumab est un anticorps monoclonal bi-spécifique, humanisé et recombinant, mimant la fonction du FVIII en se liant au FIXa et au facteur X, et exprimant une activité cofacteur équivalente au FVIII. L'emicizumab est structurellement différent du FVIII, et ne présente pas d'homologie de séquence avec lui, permettant de ne pas être neutralisé par les inhibiteurs. C'est une nouvelle alternative thérapeutique, présentant la caractéristique d'être administrée par voie sous cutanée de manière prophylactique une fois par semaine (Blair, 2019).

3) Modalité de traitement

a. Traitement à la demande

Le traitement à la demande consiste à traiter un épisode hémorragique déclaré en administrant le FVIII de substitution. Il permet de stopper le saignement sans agir directement sur la résorption de l'hématome ou de l'hémarthrose déjà constitué. Le principe est de traiter le plus tôt possible après le traumatisme ou l'apparition des premiers symptômes évocateurs d'un saignement. La dose appropriée et la fréquence d'injection dépendent de la forme de la pathologie et du type de saignement. La mise à disposition des traitements à domicile, la formation à l'auto-traitement et les stages d'éducation thérapeutique ont pour objectif de permettre une prise en charge rapide et donc optimale (Meunier et al., 2017; Polack et al., 2015; Srivastava et al., 2013).

Bien que le traitement de substitution soit le traitement de base de l'hémophilie A, pour les patients hémophiles A mineurs bon répondeur à la desmopressine, celle-ci est à privilégier lorsqu'elle n'est pas contre-indiquée (Castaman, 2008).

b. Prophylaxie

La prophylaxie dans l'hémophilie A consiste en des injections intraveineuses de FVIII de substitution, systématiquement répétées à intervalle régulier sur une longue durée. La prophylaxie est recommandée précocement chez les patients souffrant d'une forme sévère, pour prévenir les saignements spontanés, les hémarthroses et le développement d'arthropathies, avec l'objectif de préserver les fonctions musculo-squelettiques (Fischer et al., 2001; Peyvandi et al., 2016b). Elle n'est pas recommandée pour les patients souffrant d'une forme mineure ou modérée, sauf exception.

La prophylaxie dite primaire débute au plus tard à la 2^{ème} hémarthrose (qu'elle soit spontanée ou post-traumatique), ou avant les 3 ans chez les hémophiles sévères, ou modérés répondant à ces critères. La mise en place d'une prophylaxie secondaire (après plus de 2 hémarthroses ou au-delà de 3 ans) ou tertiaire (après apparition d'une arthropathie) concerne tous les enfants hémophiles sévères n'ayant pas bénéficié d'une prophylaxie primaire (Manco-Johnson et al., 2017).

Le traitement est débuté à raison d'une injection hebdomadaire de FVIII (50 UI/kg). L'évaluation et l'adaptation du traitement sont réalisées à un rythme au moins trimestriel à l'occasion des consultations médicales systématiques, avec consignes d'anticipation des visites en cas d'hémarthrose(s) survenant dans l'intervalle. En cas de survenue d'une hémarthrose, le traitement est augmenté au palier suivant et ainsi de suite (Tableau X). Il est également conseillé de vérifier les valeurs résiduelles de FVIII afin de s'assurer que le schéma posologique permet d'obtenir un taux de FVIII supérieur à 1 %. Des objectifs de taux résiduels plus élevés peuvent à l'heure actuelle être visés avec l'utilisation des médicaments à demi-vie allongée (Giangrande et al., 2017; Meunier et al., 2009).

Tableau X : Schéma thérapeutique de la prophylaxie précoce et progressivement intensifié

Paliers	Posologie
Palier 1	50 UI/kg 1 fois par semaine
Palier 2	30 UI/kg 2 fois par semaine
Palier 3	30 UI/kg 3 fois par semaine ou toutes les 72h
Palier 4	25 à 30 UI/kg toutes les 48h

D'après Meunier et al., 2009.

c. Apparition d'inhibiteur

La complication majeure du traitement de l'hémophilie A est le développement d'anticorps neutralisants anti-FVIII, qui touche environ 30% des patients hémophiles A sévère et modérée (DiMichele, 2000). Chez l'hémophile sévère ayant développé un inhibiteur, les saignements, les douleurs et les hospitalisations sont plus fréquentes. Dans le cas d'hémophilie modérée et mineure, l'inhibiteur peut neutraliser le facteur de coagulation exogène et endogène, pouvant donner au patient une symptomatologie d'hémophilie sévère. L'apparition d'un inhibiteur spécifique vis-à-vis du traitement anti-hémophilique rend le traitement conventionnel inefficace et augmente la morbi-mortalité (Peyvandi et al., 2017; Šalek et al., 2017; Walsh et al., 2016).

Une individualisation du traitement reste la meilleure approche thérapeutique. Le choix du traitement entre la substitution conventionnelle par FVIII ou l'utilisation d'un agent by-passant doit prendre en compte le titre de l'inhibiteur, son évolution et les expériences de traitement des épisodes hémorragiques préalables (Bhardwaj et al., 2018; Hay et al., 2006; Teitel et al., 2007):

- Lorsque le patient présente un faible taux d'inhibiteur, le traitement par FVIII prescrit au moment de l'apparition de l'inhibiteur peut être maintenu à plus forte dose, pour à la fois neutraliser l'inhibiteur et permettre une activité coagulante,
- Lorsque le patient présente un fort taux d'inhibiteur, le traitement devient inefficace. Dans ce cas, la mise en place de l'induction de tolérance immune (ITI) est effectuée,
- Lorsque le patient présente un faible taux d'inhibiteur, et que l'ITI est inefficace, l'utilisation de médicament by-passant est alors indispensable.

Induction de tolérance immune

Le but des traitements d'induction de tolérance immune (ITI) est de restaurer la tolérance au FVIII chez les patients présentant un taux d'inhibiteur élevé. Il consiste en l'injection de forte dose de FVIII sur plusieurs mois. Bien que l'ITI soit un traitement lourd, prolongé et coûteux, il est efficace chez 65 à 70% des patients (Hay et al., 2012; Schep et al., 2018). Il est alors souhaitable d'essayer d'éradiquer l'inhibiteur afin de restaurer la possibilité de traitement par FVIII. Il existe différents protocoles pour la mise en place d'une ITI, soit à base de faibles doses

sur plusieurs années, soit de fortes doses sur plusieurs mois, jusqu'à récupération d'une demi-vie normale du FVIII injecté. Le protocole d'ITI à faibles doses utilise des injections de 25 à 50 UI/kg toutes les 48h (Mauser-Bunschoten et al., 1995). Le protocole d'ITI à fortes doses utilise des doses de 100 à 200 UI/kg une à deux fois par jour jusqu'à ce que le taux d'inhibiteur soit inférieur à 0.6 UB (Brackmann et al., 1996; Mancuso et al., 2017).

Traitement avec des agents by-passants

Pendant longtemps, les agents by-passants (FVIIa recombinant et concentré de facteurs du complexe prothrombique activés) ont été la seule possibilité pour envisager un traitement prophylactique.

Concernant la prophylaxie par concentré de facteurs du complexe prothrombique activés, des études ont démontré que son administration 3 fois par semaine permettait de réduire l'incidence des saignements de plus de 60%, certains patients ne déclarant plus aucun épisode de saignement sur la période de prophylaxie. La qualité de vie s'est améliorée de manière significative. Toutefois, ce traitement n'a pas empêché la progression de la détérioration articulaire de patients atteints d'arthropathie avant le début du traitement, bien qu'il soit utile pour prévenir les lésions articulaires dans les articulations saines auparavant (Antunes et al., 2014; Leissingner et al., 2011; Valentino, 2010).

Concernant la prophylaxie par FVIIa recombinant, des études ont montré une réduction des saignements d'environ 50%. La qualité de vie ne s'est pas améliorée de façon statistiquement significative (Konkle et al., 2007; Young et al., 2012).

A partir des années 2010, la prophylaxie par agents by-passants chez les patients avec inhibiteurs s'est développée (López-Fernández et al., 2016; Young et al., 2011).

Emicizumab

La prévention des accidents hémorragiques chez les patients avec inhibiteur a été transformée par la mise sur le marché en 2018 de l'emicizumab. Des études ouvertes, multicentriques et randomisées (HAVEN 1 et HAVEN 2), chez des adultes, des adolescents et des enfants atteints d'hémophilie A avec inhibiteurs ont montré une forte efficacité de ce traitement dans la

prévention des saignements. Une réduction de 87 % et de 79 % a été respectivement démontrée par rapport au traitement à la demande et aux traitements prophylactiques par agents by-passants (Oldenburg et al., 2017; Young et al., 2017). Ces résultats cliniques indiquent que l'emicizumab permet de répondre aux besoins actuels de prophylaxie qui n'étaient jusqu'à lors que partiellement résolus avec les agents by-passants chez les patients hémophiles A avec inhibiteurs. En 2019, il constitue probablement le traitement de première intention dans cette indication, et possède une AMM (autorisation de mise sur le marché) en France pour son utilisation dans le cas de patients hémophiles avec inhibiteur (<http://www.omedit-idf.fr/>, 2020).

En plus de son intérêt pour traiter les patients avec inhibiteur, l'étude HAVEN 3 montre les mêmes résultats en prophylaxie chez les patients hémophiles A n'ayant pas développé d'inhibiteur (Mahlangu et al., 2018). En France, l'AMM pour l'emicizumab a été étendue le 11 mars 2020, afin d'être utilisé pour les patients hémophiles A sévère sans inhibiteur (www.legifrance.gouv.fr/).

4) Traitements à l'étude

Les traitements de l'hémophilie A sont en pleine évolution pour répondre au mieux aux problématiques des patients. Un large panel de traitements sont actuellement à l'étude, qu'ils soient substitutifs ou non (Tableau XI).

a. Traitement substitutif

Protéine de fusion

L'allongement de la demi-vie des FVIIIr a permis dans un premier temps de réduire la fréquence d'injection, de 3 à 4 fois par semaine à 2 fois par semaine chez les patients souffrant d'une forme sévère d'hémophilie A (Mahlangu *et al.*, 2014; Shah *et al.*, 2018). Récemment, une nouvelle protéine de fusion rFVIII_{IFc}-VWF-XTEN (BIVV001) est entrée en phase 3 d'étude clinique, ayant une demi-vie d'environ 37h (Konkle *et al.*, 2020). Cette protéine de fusion est composée d'un FVIII couplé à un fragment Fc d'immunoglobuline, sur lequel est couplé le domaine D'D3 du VWF avec des linkers XTEN (Konkle *et al.*, 2020; Seth Chhabra *et al.*, 2020).

La thérapie génique

La thérapie génique est une technique ayant connu des succès dans la correction à long terme de différentes maladies génétiques (Aiuti et al., 2017; Sessa et al., 2016). L'utilisation de vecteurs de la famille adénovirus (AAV) a été testée dans le cadre d'hémophilie B sévère, avec succès malgré une expression faible de FIX (Nathwani et al., 2011, 2014). Toutefois, la limite majeure pour l'utilisation de vecteur AAV dans l'hémophilie A est la taille du gène *F8*, qui excède de 4 kb la capacité d'empaquetage, ainsi que l'inefficacité de l'expression du FVIII (Ohmori, 2020). Pour pallier ce problème, McIntosh *et al.*, en 2013 utilisent une construction du gène *F8* plus petite, notamment avec une délétion du domaine B et contenant un promoteur hépatique, empaqueté dans un vecteur AAV, qu'ils testent chez la souris et le primate. Les résultats montrent une bonne efficacité d'expression de FVIII (McIntosh et al., 2013). En 2017, une étude clinique de phase 1-2 utilisant la même construction est réalisée chez l'homme. Elle montre une normalisation durable du taux de FVIII sur une période de 1 an, chez 6 patients sur 7 ayant reçu une forte dose (Rangarajan et al., 2017).

D'autres constructions et vectorisations sont étudiées en phase pré-clinique. En 2011, une équipe utilise un vecteur lentiviral, permettant d'infecter un large éventail de cellules différenciées. Les résultats chez la souris montrent une légère augmentation stable de l'expression de FVIII (Matsui et al., 2011). En 2014, Wang *et al.*, ont co-transfecté deux vecteurs AAV contenant chacun une partie du gène *F8*, et montrent chez la souris une sécrétion de FVIII comparable à l'équipe de McIntosh (Wang et al., 2014). De nombreux essais en cours permettront de mieux stratifier les patients qui pourront bénéficier de ces approches et d'améliorer la correction à long terme de la déficience en FVIII.

b. Traitement non substitutif

Le but des traitements non substitutifs est de restaurer l'hémostase chez les patients hémophiles, en mimant l'effet coagulant du FVIII, ou en agissant sur les inhibiteurs de la coagulation.

Anticorps bi-spécifique nouvelle génération

Mim8 (NNC0365-3769 A) est une nouvelle génération d'anticorps bi-spécifique, actuellement en étude clinique phase 2 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04204408>, 2021). Mim8, comme l'Emicizumab, a pour but de mimer le FVIII dans le complexe tenase FVIIIa / FIXa pour permettre une production de FXa. Mim8 est capable de normaliser la génération de thrombine et la formation du clou plaquettaire avec un effet 15 fois supérieur à l'Emicizumab (Kjellev *et al.*, 2019). Peu d'informations sont actuellement disponibles car l'étude clinique n'a pas encore donné lieu à la publication de données dans la littérature.

Inhibiteur de l'antithrombine :

Le Fitusiran (ALN-AT3SC) est un inhibiteur de l'antithrombine sous forme de siRNA (small interfering RNA). C'est un petit ARN non codant, capable d'entrer dans les hépatocytes et dégrader les ARNm de l'antithrombine (Sehgal *et al.*, 2015). Le Fitusiran inhibe donc la synthèse de l'antithrombine, afin d'augmenter le niveau de la génération de thrombine et ainsi promouvoir l'hémostase chez les patients hémophiles. Ce traitement est actuellement à l'étude en phase 2 chez des patients hémophiles. (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03417102>, 2020; Pasi *et al.*, 2017).

Anti-TFPI

Le concizumab (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03196284>, 2021) et le Marstacimab (PF-06741086) (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03938792>, 2021) sont deux inhibiteurs du TFPI en étude clinique, respectivement en phase 2 et 3. Ces anticorps inhibent spécifiquement le domaine Kunitz-2 du TFPI, domaine de fixation du FXa. Par conséquent, ils empêchent l'inhibition du FXa par le TFPI, permettant alors de restorer la génération de thrombine (Patel-Hett *et al.*, 2019; Waters *et al.*, 2017).

Tableau XI : Récapitulatif des traitements de l'hémophilie A

Therapeutic agents	Mechanism of action	Dosing frequency (prophylaxis)
Plasmatic FVIII concentrates - Pure plasmatic FVIII - Plasmatic FVIII with VWF	Replacement therapy with plasmatic FVIII	1 to 3 times/week (i.v.) 1 to 3 times/week (i.v.)
Recombinant FVIII concentrates) - rFVIII CHO - rFVIII BHK - rFVIII HEK	Replacement therapy with recombinant FVIII from animal or human cells	1 to 3 times/week (i.v.) 1 to 3 times/week (i.v.) 1 to 3 times/week (i.v.)
Extended Half Life FVIII concentrates - rFVIII PEG (rurioctocog alpha pegol, turctoocog alpha pegol, damoctocog alpha pegol) - rFVIII-Fc (efmorotocog alpha) - rFVIII single chain - rFVIII-Fc-VWF-XTEN (SOBI)	Replacement therapy with recombinant modified FVIII (from CHO, BHK or HEK) which shows extended half-life : Fc fusion, single chain factor VIII or PEGylation	1 to 2 times/week (seldom 3 times/week) (i.v.) 1 to 2 times/week (seldom 3 times/week) (i.v.) 1 to 2 times/week (seldom 3 times/week) (i.v.) 1 to 2 times/week (seldom 3 times/week) (i.v.)
Bispecific antibodies - Emticizumab - Mim8 (NovoNordisk)	Bispecific antibodies mimicking the action of FVIII and allowing the activation of FX into FXa	Once a week or 1/2 weeks or once monthly (s.c.) Ongoing clinical trial (s.c.)
RNA inhibitors (si RNA) - RNAi therapeutic targeting antithrombin (Fitusiran) (Sanofi Genzyme)	siRNA targeting the production of the most potent physiological coagulation inhibitor	Once monthly, ongoing clinical trial (s.c.)
Anti-"Tissue Factor Pathway Inhibitor" antibodies - Concizumab (NovoNordisk) - Marstacimab (Pfizer)	Anti-TFPI monoclonal antibody that decreases the inhibition of the FVIIa/tissue factor complex after interaction with FXa and thus partially restores thrombin generation	Ongoing clinical trial (s.c.) Ongoing clinical trial (s.c.)
Gene therapy - ssAAV2/5-hFVIIIco-SQ (Biomarin) - ssAAV2/LKO3-hFVIIIco-SQ (Sparks Therapeutics) - ssAAV2/8-hFVIII-SQ (Shire) - ssAAV2/8-hFVIIIco-V3 (UCL/St Jude)	Adeno-Associated Virus vectors providing the patient liver with a cDNA sequence encoding a functional FVIII	Ongoing clinical trial (i.v.) Ongoing clinical trial (i.v.) Ongoing clinical trial (i.v.) Ongoing clinical trial (i.v.) Ongoing clinical trial (i.v.)

FVIII : Factor VIII, VWF : von Willebrand Factor, BHK cells : Baby Hamster Kidney cells ; CHO cells : Chinese Hamster Ovary cells ; HEK : Human Embryo Kidney cells.
(Cade *et al.*, soumis pour publication)

IV. Cas particulier : l'hémophilie A acquise

L'hémophilie A acquise est une coagulopathie acquise rare, causée par le développement d'auto-anticorps anti-FVIII neutralisants (Collins, 2012; Elezović, 2010). Cette pathologie est diagnostiquée le plus souvent chez les patients de plus de 65 ans, présentant brutalement une symptomatologie hémorragique marquée, survenant chez un sujet indemne de toute pathologie hémorragique antérieure. Elle peut également toucher les femmes entre 20 et 40 ans et les enfants. Chez la moitié des patients, la maladie est associée à une maladie auto-immune, un cancer, une grossesse, une infection ou encore à un médicament. Pour l'autre moitié des patients, elle est idiopathique (Collins et al., 2010; Franchini et al., 2010, 2017). Les symptômes hémorragiques sont proches de l'hémophilie A conventionnelle, à la différence que les hémarthroses sont rares (Elezović, 2010; Franchini et al., 2017; Toschi and Baudo, 2010). Le traitement de cette pathologie a deux objectifs : restaurer l'hémostase, notamment avec des agents by-passants, et éradiquer les inhibiteurs, notamment par des traitements immunosuppresseurs ou une ITI (Charlebois et al., 2018).

Objectifs de la thèse

L'emicizumab constitue à ce jour, un traitement novateur remédiant au problème d'inhibiteur et aux troubles de la coagulation chez les patients hémophiles A. Chez les patients développant des inhibiteurs, il est fréquemment utilisé en prophylaxie (Oldenburg et al., 2017; Young et al., 2019). Par ailleurs, l'étude HAVEN 3 montre qu'un traitement prophylactique avec l'emicizumab, chez les patients hémophiles A sévère n'ayant pas développé d'inhibiteur, diminue les saignements et améliore la qualité de vie des patients (Mahlangu et al., 2018). L'emicizumab est approuvé dans de nombreux pays, incluant les Etats-Unis, le Japon et la France, pour la prophylaxie de routine chez les patients hémophiles A avec ou sans inhibiteur. En France, l'AMM a été étendue le 11 mars 2020, afin d'en permettre l'utilisation pour les patients hémophiles A sévères sans inhibiteur (www.legifrance.gouv.fr/). Par conséquent, chez les cliniciens, la question de l'utilisation systématique de ce traitement se pose, pour les cas sévères en présence ou en absence d'inhibiteur. En plus de l'Emicizumab, de nombreux traitements non substitutifs sont actuellement en essai clinique, amenant un bouleversement dans la prise en charge de l'hémophilie. Or, en dehors du trouble de la coagulation, il est observé chez les hémophiles A une ostéopénie, une sarcopénie, une altération de l'inflammation et du système vasculaire. Des observations à partir d'études cliniques sur l'hémophilie A, ainsi que des études *in vitro* et *in vivo* révèlent de potentiels rôles extra-coagulants du FVIII dans ces différents systèmes (Samuelson Bannow et al., 2019).

L'objectif de ma thèse a été d'étudier les fonctions biologiques du FVIII, sur des cellules endothéliales et des monocytes, dans le but d'avoir une meilleure compréhension de son rôle extra-coagulant, et mieux appréhender le traitement de l'hémophilie A. Une première partie de ma thèse repose sur l'étude de l'effet d'un FVIII recombinant (Advate®, Takeda) sur la cellule endothéliale, et une deuxième partie fait le lien entre le système immunitaire et le système vasculaire. Les points suivants seront abordés :

1. Réponse transcriptomique des cellules endothéliales à l'exposition à du FVIIIr, comparé à l'OPGr et au VWFr,
2. Réponse protéomique des cellules endothéliales à l'exposition à du FVIIIr,
3. Les effets du FVIIIr sur la formation de tubes vasculaires, l'adhérence cellulaire et la perméabilité vasculaire,

4. L'impact du FVIIIr sur l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales et leur transmigration à travers un endothélium constitué.

MATERIELS ET METHODES

I. Culture cellulaire

Deux types de cellules endothéliales ont été utilisés : des cellules ECFC (Endothelial Colony-Forming Cells), et des cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Les cellules ECFC ont été obtenues auprès du Dr Catherine Boisson-Vidal (Faculté de Pharmacie, Paris Descartes, UMRS1140). Les HUVEC ont été obtenues auprès du Dr Catherine Boisson-Vidal et de Lonza (CC-2519, Lonza). Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité, avec 5% de CO₂ et sans ajout d'antibiotique. Le milieu EGM2 (Endothelial Growth Medium 2, Lonza) a été utilisé comme milieu de croissance (Tableau XII). Lors de l'entretien des cellules, la trypsine est utilisée pour les décoller (Gibco).

Pour les expérimentations, la Versene (EDTA-1%, Millipore) a été utilisé pour décoller les cellules HUVEC, et l'Accutase® (Gibco) a été utilisée pour décoller les cellules ECFC. Ces deux produits ont été utilisés dans le but de conserver au mieux l'intégrité des protéines de surface lors du passage des cellules pour les expérimentations. Le milieu EBM2 (Endothelial Basal Medium 2, Lonza) a été utilisé pour les traitements, avec des concentrations différentes de sérum de veau fœtal (SVF) en fonction des expérimentations (Tableau XII). Le SVF (Eurobio, CVFSVF 00-01, lot : 566809-0222/A) utilisé est le même pour chaque expérimentation.

Le FVIII recombinant (FVIIIr, Advate®) et le VWF recombinant (VWFr, VonVendi®) utilisé pour toutes les expériences ont été fournis par l'entreprise pharmaceutique Takeda (USA). La substance active du médicament Advate est la molécule octocog alfa, un FVIIIr à demi-vie classique composé de la protéine complète. Le produit utilisé est le médicament injecté aux patients, il ne contient ni plasma ni albumine, et est présenté sous forme de poudre. La reconstitution a été effectuée en condition stérile à 600 UI/mL, avec de l'eau pure. Le FVIIIr est alors aliquoté et stocké à -80°C. Son activité spécifique est de 4 000 à 10 000 UI/mg de protéine. Du FVIII natif (Creative Biomart) est également utilisé dans certaines expériences, dont l'activité spécifique est de 150 UI/mg de protéine.

EGM2	EBM2
Milieu EBM2	SVF 2% ou 5%
SVF 2%	
Hydrocortisone	
hFGF-B (human fibroblast growth factor basic)	
VEGF	
R3-IGF-1 (recombinant insulin-like growth factor)	
Acide ascorbique	
hEGF (human epidermal growth factor)	
Héparine	

Tableau XII : Différence entre le milieu EGM2 et le milieu EBM2. L'EGM2 est composé du milieu basal EBM2, auquel ont été ajoutés des facteurs de croissance pour favoriser la prolifération des cellules endothéliales.

II. Test d'adhérence via le système xCELLigence

Les tests de prolifération ont été effectués à l'aide du système xCELLigence real time cell analyzer (RTCA) (ACEA Biosciences). Le principe de ce système est de mesurer, en temps réel, les variations d'impédance électrique (c'est-à-dire la résistance au passage du courant alternatif) générées par l'adhérence des cellules sur les électrodes présentes au fond de puits de plaques micro-électriques (E-plate). Ainsi, plus le nombre de cellules adhérentes est important, plus l'impédance sera élevée. L'impédance relative aux cellules est reflétée par la mesure de l'« Index Cellulaire » (IC) (Figure 11).

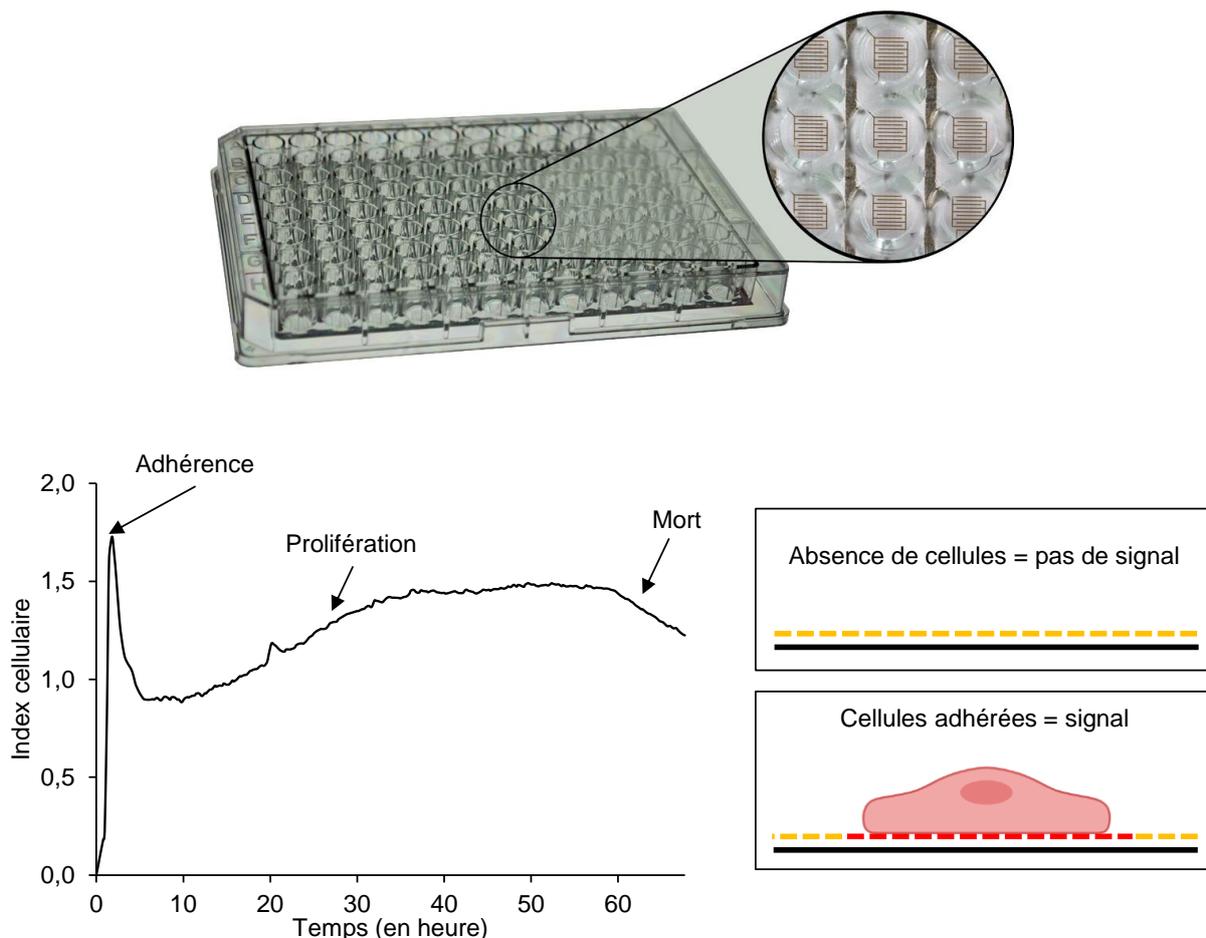


Figure 11 : Le système xCELLigence RTCA. Les cellules ont été déposées dans des plaques 96 puis à fond plat dans lesquelles se trouvent des électrodes en or. Un courant électrique de faible intensité passe dans ces électrodes et les informations ont été collectées par l'appareil xCELLigence. Lorsque qu'une cellule se dépose en fond de la plaque, elle va opposer une résistance au passage de l'intensité. La mesure de cette résistance est l'impédance, qui sera reflétée par l'index cellulaire. Le premier pic de la courbe correspond à l'adhérence des cellules, qui s'étalent avant de reprendre une conformation normale et proliférer.

Deux protocoles ont été utilisés. Dans le premier, les cellules HUVEC ont étéensemencées à 15 000 cellules par puits de l'E-plate, dans du milieu EGM2, avec ou sans FVIII natif ou FVIIIr. Dans le second, les cellules HUVEC ont été déprivées en facteurs de croissance une nuit, dans du milieu EBM2 avec 2% de SVF. Par la suite, 10 000 HUVEC ont étéensemencées dans l'E-plate, en milieu EBM2 avec 5% de SVF, en présence ou non de différentes doses de FVIIIr.

III. Formation de tubes vasculaire *in vitro*

Les cellules ECFC sont déprivées en facteurs de croissance pendant une nuit, dans du milieu EBM2 avec 2% de SVF. 30 000 cellules ont été par la suiteensemencées sur une matrice de Geltrex™ (Gibco) dans du milieu EBM2 avec 5% de SVF en plaque 48 puits, traitées ou non avec du FVIIIr (10 UI/mL). Pour le contrôle positif, le milieu de croissance EGM2 a été utilisé. Après 18h, les tubes vasculaires formés dans le gel ont été fixés avec 1,1 % de glutaraldéhyde et 4 images par puits sont capturées à l'aide du microscope InCellis (Bertin). Les images ont été analysées sur le logiciel FIJI à l'aide du plugin « Angiogenesis Analyzer ».

IV. RNA-sequencing et miRNA microarray

Le RNA-sequencing (RNAseq) est une technique d'analyse transcriptomique, permettant de capturer et d'identifier à un temps donné, l'ensemble des transcrits afin de les quantifier. Les cellules HUVEC ont été déprivées en facteurs de croissances une nuit, dans du milieu EBM2 avec 2% de SVF. Elles ont été par la suiteensemencées en milieu EBM2 avec 5% de SVF, traitées ou non avec du FVIIIr (10 UI/mL), du VWFr (50 ng/mL), ou de l'OPGr (100 ng/mL,) pendant 7h. Les cellules ont été ensuite culotées, et les ARNs isolés à l'aide du kit « Qiagen RNeasy Midi kit ». L'expérience a été réalisée trois fois de manière indépendante.

Le RNAseq a été réalisé avec la technologie Illumina (Active Motif). Après l'isolation des ARNs, une sélection des ARNm est effectuée. Ces ARNm ont alors été fragmentés et leurs brins complémentaires ont été synthétisés à l'aide d'une transcriptase inverse pour obtenir des ADN complémentaire (ADNc). Ce sont ces ADNc, appelés « reads » qui ont été ensuite séquencés. La première étape d'analyse d'un RNAseq est l'alignement de ces « reads » à un génome de référence. Le génome de référence utilisé est le hg38. Selon le nombre de reads constituant chaque ARNm, on peut quantifier ces derniers. Le RNAseq permet donc de comparer des échantillons et d'identifier les ARNs différentiellement exprimés. L'analyse différentielle est effectuée par DESeq2. Pour chaque gène, le nombre de « reads » correspondant est évalué pour toutes les conditions et comparés. Une p-value a été attribuée ainsi qu'un *fold-change*. De par le nombre très important de gènes, la probabilité de trouver une différence liée au

hasard est assez élevée. Pour éviter cela, un ajustement de la p-value en utilisant la procédure de Benjamini-Hochberg a été effectué.

Le miARN microarray a été réalisé avec une puce GeneChip™ miRNA 4.0 Array (Affymetrix), permettant d'analyser 6 631 ARN humain non codants.

Des analyses fonctionnelles visant à déterminer les fonctions biologiques enrichies a été effectué à partir du logiciel Cytoscape. Cytoscape est un logiciel open source, permettant la visualisation de réseaux complexes à partir de différentes bases de données, comme Gene Ontology, String, KEGG ou Reactome, couramment utilisées pour l'analyse fonctionnelle des données transcriptomiques.

V. Transmigration monocyttaire à travers un endothélium de cellules HUVEC

Les cellules HUVEC ont été ensemencées en EGM2 dans un insert de culture perméable ThinCert™ (Greiner bio-one), ayant des pores de 8µm et recouverts au collagène de type I. Dans un premier temps, aucun milieu n'a été ajouté dans le sous-compartiment afin de former une monocouche d'endothélium et éviter les multicouches (Vandehaute *et al.*, 2016). Après 3 jours d'incubation, des monocytes sont obtenus par purification indirecte à l'aide du kit « Classical monocyte isolation » (Milteny Biotec) à partir de sang frais, après isolation des PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) au Ficoll-Paque™ PLUS (GE Health Care). Les PBMC ont été obtenus à partir de tubes de sang total prélevé sur EDTA et anonymisés, fournis par le Centre de Ressource Biologique – Tumorotheque de l'Institut de Cancérologie de l'Ouest, certifié NF S96-900 (référence DC-2018-3321) (Heymann *et al.*, 2020). Les monocytes purifiés ont été ajoutés dans la partie supérieure de l'insert, en présence ou non de FVIIIr à 10 UI/mL, dans de l'EBM2 avec 2% de SVF. Le sous-compartiment contient des chémoattractants monocytaires : 15 ng/mL de MCP1 et 5 ng/mL de RANTES (Peprotech).

VI. Adhérence de monocytes sur un endothélium de cellules HUVEC en condition de flux

Les cellules HUVEC ont étéensemencées à confluence sur une lame pendant 6 jours afin de former un endothélium compact et adhérent. Les monocytes ont été obtenus par purification indirecte à l'aide du kit « Monocyte isolation » (Milteny Biotec) à partir de sang frais de donneur sain, après purification des PBMC au Pancoll. Les monocytes ont été alors marqués à la calcéine pendant 10 min. Trois conditions ont été testées : 1) une condition contrôle, sans traitement au FVIIIr ; 2) une condition où les monocytes sont traités 10 min au FVIIIr à 10 UI/mL ; 3) une condition où l'endothélium est traité 24h au FVIIIr à 10 UI/mL. Pour chaque condition, trois expériences indépendantes sont réalisées. La mise en place ainsi que le matériel nécessaire à l'expérimentation sous flux, réalisée dans l'unité Inserm UMR_S 1140 avec l'aide du Dr Catherine Boisson-Vidal et Madame Anna Lokajczyk, se trouve en Figure 12. Une fois la chambre mise en place et la vérification de l'intégrité de l'endothélium au microscope, celui-ci est activé par une perfusion de tampon d'adhérence (10 mM HEPES, 2 mg/mL Albumine bovine, HBSS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} , 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2), pendant 30 min à un débit de 0,1 mL/min (force de cisaillement de 50 sec^{-1}). Puis, 1 million de monocytes dans 1mL de tampon d'adhérence sont perfusé à un débit de 0,1 mL/min. Afin d'observer la cinétique d'adhérence, le « roulement » et le « tethering », la perfusion des monocytes est filmée à raison d'une image par seconde, sur un champ au centre de la chambre (Objectif 10x). Le « tethering » correspond aux cellules qui adhèrent faiblement et qui se décrochent, et le roulement correspond aux cellules qui adhèrent faiblement, et qui avancent sur l'endothélium grâce à la force de cisaillement. Lorsque la totalité des monocytes a été perfusée, l'endothélium est lavé pendant 20 min à un débit de 0,1 mL/min. Les images de la chambre sont capturées selon le schéma représenté en Figure 12B. Enfin, la force d'adhérence des monocytes a été testée en augmentant graduellement le débit e augmentant graduellement les forces de cisaillement : 50 sec^{-1} , 260 sec^{-1} (0,5mL/min), 515 sec^{-1} (1 mL/min), 1030 sec^{-1} (2 mL/min), 1545 sec^{-1} (3 mL/min) et 2575 sec^{-1} (5 mL/min). Pour chaque force testée, une image est prise, sur un champ au centre de la chambre avant et après la perfusion, et celle-ci est réalisée pendant 1 min.

Concernant les analyses, les monocytes en roulement, en « tethering » et ayant adhéré ont été comptés manuellement à l'aide de l'outil « Cell counter » du logiciel FIJI. Dans un premier

temps, les monocytes en « roulement » ou en « tethering » ont été comptés, sur chaque image pendant 1,5 min, à raison d'une image par seconde sur un champ unique se situant au centre de la chambre. En parallèle, pour l'analyse de la cinétique d'adhérence, les monocytes adhérents ont été comptés toutes les 30 secondes sur ce même champ, pendant 7 min. Puis, suite au lavage, le nombre total de monocytes adhérents à l'endothélium a été compté, sur chacun des 28 champs capturés (suivant le schéma représenté en Figure 12B). Pour finir, pour l'analyse de la force d'adhérence, un champ au centre de la chambre a été choisi, et les monocytes adhérents ont été comptés sur ce champ avant le début du test. Puis la première force de cisaillement a été émise pendant 1 min. A la fin de cette minute, une image du champ est capturée, et les monocytes restés adhérents ont été comptés. Ensuite, la force suivante a été émise, et ainsi de suite jusqu'à 2575 sec^{-1} .

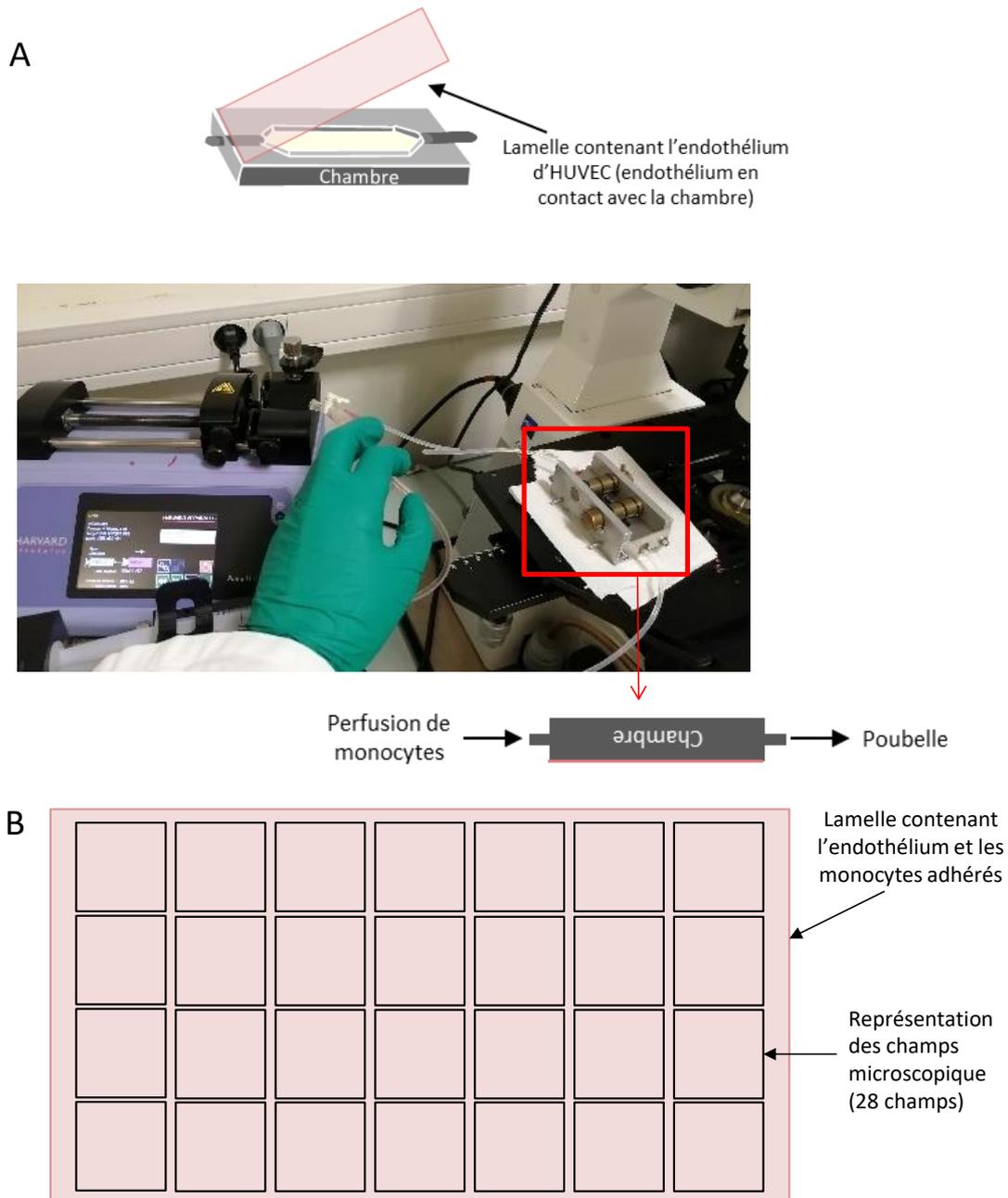


Figure 12 : Montage de la chambre sous flux et champs microscopique. **A)** La lamelle contenant l'endothélium est déposée sur la chambre. Pour maintenir la lamelle et la chambre hermétique et éviter les fuites, la chambre est placée dans un système métallique (en gris et bronze sur la photo), où les vis entourées de caoutchouc permettent de compresser la chambre sur la lamelle (située en dessous) sans la casser. La chambre est volontairement placée à l'envers (endothélium vers le bas), afin que les monocytes soient en contact avec celui-ci. Nous pouvons alors perfuser les monocytes à l'aide d'un pousse seringue adapté, afin d'avoir un flux constant. **B)** Représentation de la partie de l'endothélium en contact avec la chambre. Les cadres noirs correspondent aux différents champs analysés lors du compte des monocytes ayant adhéré.

VII. Profil protéique des cellules HUVEC

L'étude du profil protéique des cellules HUVEC a été réalisée en condition physiologique ou inflammatoire. Pour cela, les cellules HUVEC ont été traitées pendant 48h en présence ou non de 4 concentrations de FVIIIr (20, 10, 5 et 2,5 UI/mL) ; ainsi qu'en présence ou non de 10 ng/mL de TNF α ou de 20 ng/mL d'IFN γ (Milteny Biotec) (conditions inflammatoires). Les cibles analysées par cytométrie en flux sont listées dans le Tableau XIII.

Profil immunitaire			Profil avancé			
Fonctions	Cibles	Condition	Fonctions	Cibles	Condition	
Présentation antigénique	ULBPs	Condition inflammatoire et non inflammatoire	Métabolisme lipidique	LDL-Deg	Condition non inflammatoire uniquement	
	HLA-E			LDL-UP		
	HLA-2			LDLR		
	HLA-1			LOX1		
	CD36					
Inhibiteur de check-point	MICA/B			Cytosquelette / Migration / Adhérence		CD29
	CD137L					c-MET
	HVEM					HER2
	GITRL			Jonctions serrées		CD144
	CD58					JAM-1
PD-L1		ZO-1				
Molécule d'adhésion cellulaire (CAMs)	VCAM-1			Claudin-1		
	ICAM-1		Intégrité vasculaire / perméabilité	MMP14		
	E-Selectin			PAR1		
Médiateur de l'inflammation	TLR4	Condition non inflammatoire uniquement				S1RP1
	TNFR1			CD109		
	TGFBR2			Intégrité vasculaire / angiogenèse	CD31	
	IL1R1				Tie2	
	IFNGR1				VEGFR2	
Agrégation / thrombose / système du complément				CD146		
				FT		
				EPCR		
				CD141		
				CD59		
				CD55		
				CD39		
Toxicité / prolifération				PDGFRb		
				Profil		
				Tox_48h		
				Tox_24h		

Tableau XIII : Listes des cibles analysées pour étudier le profil protéique des cellules HUVEC. Dans les conditions inflammatoires, les cellules HUVEC ont été traitées avec 10 ng/mL de TNF α ou de 20 ng/mL d'IFN γ , avec ou sans FVIII. « Tox_48h », « Tox_24h » et « Prolif » correspondent à des tests de prolifération à 24h et 48h, à différentes doses de FVIII.

VIII. Test de perméabilité d'un endothélium de cellules HUVEC

Afin de mesurer la perméabilité vasculaire, 70 000 cellules HUVEC ont étéensemencées dans un insert de culture (BD, 353097) ayant des pores de 8 μm , recouverts de fibronectine afin de former une monocouche d'endothélium. Après 3h d'incubation, une fois l'endothélium formé, différentes doses de FVIIIr (5 et 10 UI/mL) ont été déposées dans la partie supérieure de l'insert, avec une solution de 250 $\mu\text{g/mL}$ de FITC-Dextran 70 kDa. Le contrôle positif de perméabilisation a été réalisé avec du TNF α à 10 ng/mL. Une cinétique a été réalisée (1h, 2h, 3h, 4h, 5h et 20h). Le sous-compartiment a été collecté tout au long de cette cinétique, et la fluorescence ayant diffusé a été mesurée à l'aide d'un lecteur de fluorescence (Perkin Elmer, Victor3).

IX. Analyses du cytosquelette à l'aide d'une puce Cytoo™ Crossbow

Pour analyser le cytosquelette d'actine et les adhésions focales, les cellules HUVEC ont étéensemencées sur des puces Cytoo™ Crossbow. Ce sont des puces contenant des zones en forme d'arc recouvert de fibronectine humaine, où une cellule endothéliale peut se fixer, et permettant sa polarisation. Les zones analysées dans cette expérience se trouvent en Figure 13. Les cellules HUVEC ont étéensemencées à raison de 12 000 cellules par puits. Après 18h d'incubation avec différentes doses de FVIII (0,62, 5, 10 UI/mL), les cellules ont été fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 4%. Une perméabilisation a été réalisée (PBS, BSA 1%, Triton 0,3%), puis l'immunomarquage des filaments d'actines (F-actine, A12379, ThermoFischer), ou de la paxilline phosphorylée (P-PAX, #2541, Cell Signaling) a été effectué. Acquisition des images par microscopie confocale (Confocal Nikon, objectif 60x).

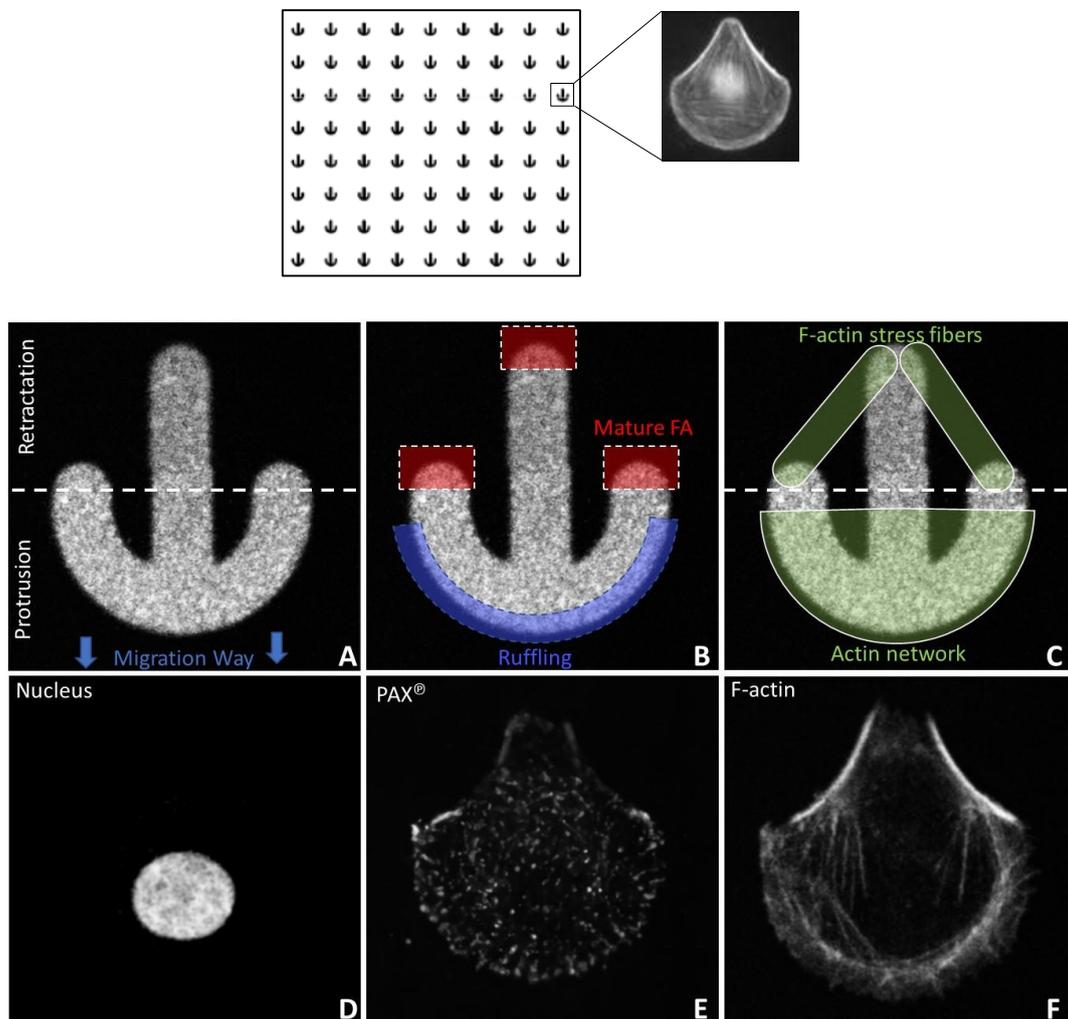


Figure 13 : Analyses effectuées sur la puce Cytoo™ Crossbow. Ces puces servent à confiner dans un ou plusieurs puits, des zones en forme de flèche définies par un « coating » à la fibronectine humaine, où une cellule peut adhérer. Cette conformation permet de polariser des cellules immobiles. **(A)** Aperçu du sens de migration, de la zone de rétractation (arrière de la cellule) et de la zone de protrusion ou lamelipode (front de migration). **(B)** Zone d'étude du marquage de la phospho-Paxilline (P-Pax). Zone des adhérences focales matures (en rouge) et zone de front de migration ou « ruffling » (en bleu). **(C)** Zones d'études du cytosquelette à partir du marquage de la F-actine. Les fibres de stress situées entre les adhésions focales matures dans la zone de rétractation et le réseau d'actine dans la zone de protrusion. **(D)** Exemple de marquage du noyau, **(E)** de la P-Pax et **(F)** de l'actine.

X. Expression de ZO-1 à l'aide d'une puce Cytoo™ Arena

Pour analyser les jonctions serrées, les HUVEC ont été ensemencées sur des puces Cytoo™ Arena. Ce sont des puces contenant des zones en forme de cercle recouvertes de la fibronectine humaine, où plusieurs cellules endothéliales peuvent se fixer, et permettant le confinement d'un endothélium sur une surface adhérente (image en Figure 14). Les cellules HUVEC ont été ensemencées à raison de 12 000 cellules par puits. Après 48h d'incubation avec différentes doses de FVIIIr (5, 2,5, 10 UI/mL), les cellules ont été fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 4%. Un immunomarquage de Zonula occludens -1 (ZO-1, #8193, Cell Signaling) est effectué. Acquisition des images par microscopie confocale (Confocal Nikon, objectif 60x).

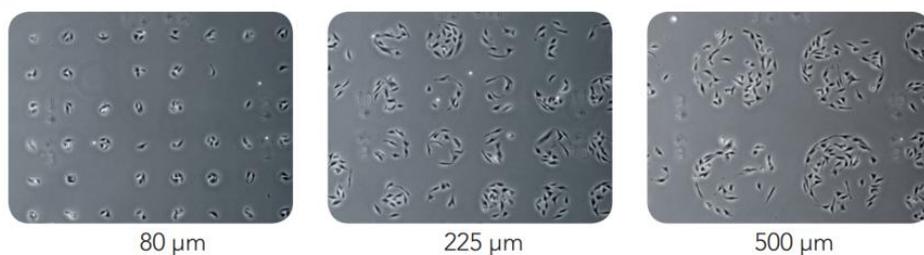
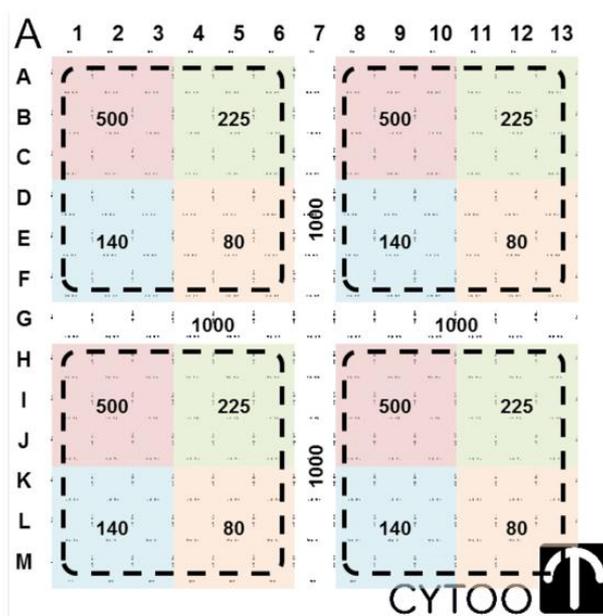


Figure 14 : Puces Cytoo™ Arena. Ces puces servent à confiner dans plusieurs puits, des zones circulaires adhérentes plus ou moins grandes, recouvertes de fibronectine humaine. Le but est de former, sur chaque zone circulaire, des endothéliums sur lesquels nous pourrions analyser les jonctions serrées.

XI. Western Blot

Les cellules HUVEC ont été déprivées en facteurs de croissance une nuit, dans du milieu EBM2 avec 1% de SVF. Elles ont ensuite été traitées avec différentes doses de FVIIIr pendant 2h, en EBM2 avec 0% de SVF. Les protéines sont extraites avec du tampon RIPA supplémenté avec de l'inhibiteur de phosphatase (Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermofischer). Un Western Blot a été réalisé en condition dénaturante. La protéine FAK (focal adhésion kinase) phosphorylée a été révélée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-phospho-FAK Y397 (#3283S, Cell Signalling). Pour révéler la protéine totale FAK, une deshybridation a été nécessaire (SDS, Glycine, Tween, pH 2). Puis, après vérification de l'efficacité de la deshybridation, FAK totale et l'actine ont été révélées à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-FAK total (#3285S, Cell Signalling), et de l'anticorps monoclonal anti-actine (MAB1501R, Millipore). La révélation a été effectuée à l'aide du ChemiDoc™ MP (Bio-rad).

XII. Cytométrie en flux : mesure de l'expression d'ICAM-1

Les cellules HUVEC ont été déprivées en facteurs de croissance une nuit, dans du milieu EBM2 avec 2% de SVF. Elles ont ensuite été traitées avec 10 UI/mL de FVIIIr pendant 24h, en EBM2 avec 5% de SVF. Puis, les cellules ont été marquées 30 min avec un anticorps primaire monoclonal anti-ICAM1 (ab2213, Abcam) ou le contrôle isotypique IgG2a (ab18415, Abcam), ainsi qu'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488 (4412S, Cell Signaling). L'intensité de fluorescence a été mesurée avec le cytomètre en flux BD Accury C6. La moyenne de fluorescence corrigée est calculée en soustrayant la moyenne de fluorescence du contrôle isotypique de la moyenne de fluorescence du marquage ICAM1.

XIII. Test de migration

Les cellules HUVEC ont été marquées avec 5 µM de Vybrant™ DiD (Thermofischer) pendant 20 min, puis ensemencées en milieu EGM2 à raison de 100 000 cellules par puits d'une plaque 12 puits. Une fois les cellules à confluence, une blessure a été créée au centre du puits à l'aide

d'un cône de pipetage. Le milieu a alors été changé pour un milieu EBM2 à 5% de SVF, contenant 3,5 μ M de mitomycine inhibant la prolifération cellulaire, avec ou sans FVIIIr aux concentrations 0,62 et 10 UI/mL. Toutes les 12h pendant 60h, des images de la blessure ont été capturées par microscopie (Operetta CLS). La distance entre les deux bords de la blessure (largeur de la plaie) a été mesurée à l'aide du logiciel FIJI.

XIV. Méthodes d'analyses et tests statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 6. Les valeurs de p-value inférieures à 0.05 sont considérées comme significatives.

Test d'adhérence via le système xCELLigence

Deux types d'expériences ont été réalisés avec le premier protocole, soit avec du FVIII natif soit avec du FVIIIr. Trois expériences indépendantes ont été effectuées avec le FVIII natif pour chaque concentration testée (1, 2 ou 5 UI/mL), deux ont été réalisées en trois répliques, et une en deux répliques. Quatre expériences indépendantes ont été effectuées avec le FVIIIr pour les concentrations 1, 2 et 5 UI/mL, trois ont été réalisées en trois répliques, et une en deux répliques. Trois expériences indépendantes ont été effectuées avec la concentration 10 UI/mL de FVIIIr, chacune a été réalisée en trois répliques. Les résultats sont exposés sous forme de graphiques, représentant la moyenne \pm SEM de l'index cellulaire. Un test Mann-Whitney est effectué pour chaque condition testée, comparée au contrôle sans FVIII.

Concernant le deuxième protocole, deux expériences indépendantes ont été réalisées en deux répliques par chaque concentration (1, 2, 5, 10 et 15 UI/mL). Les résultats sont exposés sous forme de graphiques, représentant la moyenne \pm SEM de l'index cellulaire. Un test Mann-Whitney est effectué pour chaque condition testée, comparée au contrôle sans FVIII.

Formation de tubes vasculaire *in vitro*

Deux expériences indépendantes ont été réalisées, une en un réplica, et une en 2 réplicas. Pour chaque puits (trois par condition), 4 champs ont été capturés pour l'analyse (plugin « Angiogenesis Analyzer » du logiciel FIJI). Les résultats représentent la longueur moyenne des tubes par champs \pm SEM. Un test Mann-Whitney est effectué.

RNA-sequencing et miRNA microarray

Trois expériences indépendantes ont été réalisées, en un réplica. L'analyse différentielle est effectuée par DESeq2. Pour chaque gène, le nombre de « reads » correspondant est évalué pour toutes les conditions et comparés. Une p-value a été attribuée ainsi qu'un taux de modification (*fold-change*). Un ajustement de la p-value en utilisant la procédure de Benjamini-Hochberg a été effectué.

Transmigration monocyttaire

Six expériences indépendantes ont été réalisées en simplicat, utilisant le sang de 6 donneurs différents. Les résultats sont exposés sous forme de graphique, représentant le nombre total de monocytes ayant transmigré par expérience (en fonction des différents donneurs).

Adhérence de monocytes sur un endothélium de cellules HUVEC en condition de flux

Neuf expériences ont été réalisées de manière indépendante : trois dans la condition contrôle ; trois dans la condition où les monocytes sont traités 10 min au FVIIIr à 10 UI/mL ; et trois dans la condition où l'endothélium est traité 24h au FVIIIr à 10 UI/mL. Cela signifie qu'une expérience correspond à une condition : soit contrôle, soit monocytes traités, soit endothélium traité.

« Roulement » et « tethering »

Pour l'analyse du « roulement », les monocytes en « roulement » ont été comptés, sur chaque image pendant 1,5 min, à raison d'une image par seconde sur un champ unique se situant au centre de la chambre (environ 90 images par expérience, soit ≥ 257 images par condition). Les résultats sont exposés sous forme de graphique, représentant la moyenne \pm SEM du nombre de monocyte en « roulement » par seconde. Un test ANOVA une voie couplé au test de Holm-Sidak (comparaison des conditions traitées par rapport au contrôle) a été réalisé.

Pour l'analyse du « tethering », les monocytes en « tethering » ont été comptés, sur chaque image pendant 1,5 min, à raison d'une image par seconde sur un champ unique se situant au centre de la chambre. Les résultats sont exposés sous forme de graphique, représentant la moyenne \pm SEM du nombre total de monocyte en « tethering » sur 1,5 min.

Cinétique d'adhérence

Pour l'analyse de la cinétique d'adhérence, les monocytes adhérents ont été comptés toutes les 30 secondes sur un champ unique se situant au centre de la chambre, pendant 7 min. Pour simplifier la lecture du graphique, seulement 8 points temporels sont représentés. Les résultats sont exposés sous forme de graphique, représentant la moyenne \pm SEM du nombre total de monocytes adhérents à chaque temps. Un test de Kruskal-Wallis couplé au test de Dunn (comparaison des conditions traitées par rapport au contrôle) est effectué pour chaque temps.

Pour l'analyse de la vitesse d'adhérence, la pente de la courbe représentant la cinétique de chaque expérience (trois par condition) est calculée. Les résultats sont exposés sous forme de graphique, représentant la moyenne \pm SEM des pentes. Un test de Kruskal-Wallis couplé au test de Dunn (comparaison des conditions traitées par rapport au contrôle) est effectué pour chaque temps.

Adhérence des monocytes

Pour l'analyse de l'adhérence des monocytes à l'endothélium, le nombre total de monocytes adhérents à l'endothélium a été compté, ce qui correspond à 28 champs par expérience (soit 84 images par condition). Les résultats sont exposés sous forme de graphique, représentant le nombre moyen de monocytes par champ \pm SEM. Un test ANOVA une voie couplé au test de Holm-Sidak (comparaison des conditions traitées par rapport au contrôle) a été réalisé.

Résistance aux forces de cisaillement

Pour l'analyse de la résistance aux forces de cisaillement, un champ au centre de la chambre a été choisi, et les monocytes adhérents ont été comptés avant le début du test. Ce nombre est rapporté à 100%. Puis, une image du champ est capturée après chaque force de cisaillement testée et les monocytes restés adhérents ont été comptés. Le pourcentage de monocytes restant est calculé par rapport au nombre initial. Les résultats sont exposés sous forme de graphique, représentant la moyenne \pm SEM de ces pourcentages.

Analyse du profil protéique

Le seuil de significativité a été arbitrairement fixé à 15%.

Perméabilité endothélium

Une expérience a été réalisée en six répliques. Les résultats sont exposés sous forme de graphique, représentant les moyennes de la concentration en Dextran-FITC par condition \pm SEM. Un test de Kruskal-Wallis couplé au test de Dunn (comparaison des conditions traitées par rapport au contrôle) est effectué pour chaque temps et pour chaque concentration.

Analyse du cytosquelette (puce Cytoo™ Crossbow)

Cytosquelette d'actine

Pour l'analyse du cytosquelette d'actine, une expérience a été réalisée. Pour chaque condition, au moins 23 cellules HUVEC ont été prise en compte dans les analyses. Les fibres d'actines ont été délimitées à l'aide du logiciel FIJI, après un seuillage. L'aire de marquage totale par cellule correspond à la surface totale de l'ensemble des fibres d'actines de cette cellule. L'aire de marquage moyenne correspond à la surface moyenne d'une fibre d'actine de cette cellule. Ces analyses ont été réalisées dans la zone de rétractation et dans la zone de protrusion séparément. Les résultats sont exposés sous forme de graphique, représentant la moyenne de ces aires \pm SEM. Un test ANOVA une voie couplé au test de Holm-Sidak (comparaison des conditions traitées par rapport au contrôle) a été réalisé.

Phosphorylation de la Paxilline

Pour l'analyse de la phosphorylation de la Paxilline, une expérience a été réalisée. Pour chaque condition, au moins 65 cellules HUVEC ont été prises en compte. Les adhérences focales ont été délimitées à l'aide du logiciel FIJI, après un seuillage. L'aire de marquage totale par cellule correspond à la surface totale de l'ensemble des points d'adhérences focale de cette cellule. L'aire de marquage moyenne correspond à la surface moyenne d'une adhérence focale d'une cellule. Le nombre d'évènements correspond au nombre de points d'adhérence focale d'une cellule, et le périmètre des évènements correspond au périmètre de ces points. Ces analyses ont été réalisées dans la zone de rétractation et dans la zone de protrusion. Les résultats sont exposés sous forme de graphique, représentant soit la moyenne des aires \pm SEM, soit la moyenne du nombre d'évènement \pm SEM, soit la moyenne des périmètres \pm SEM. Un test ANOVA une voie couplé au test de Holm-Sidak (comparaison des conditions traitées par rapport au contrôle) a été réalisé.

Expression de la protéine ZO-1 (puce CytoTM Arena)

Pour l'analyse de l'expression de la protéine ZO-1, une expérience a été réalisée. Pour chaque condition, 24 endothéliums de cellules HUVEC ont été pris en compte. Les jonctions marquées par ZO-1 ont été délimitées à l'aide du logiciel FIJI, après un seuillage. L'aire de marquage totale par cellule correspond à la surface totale de l'ensemble des jonctions marquées par ZO-1 de cette cellule. L'aire de marquage moyenne correspond à la surface moyenne d'une jonction marquée par ZO-1 de cette cellule. Le nombre d'évènement correspond au nombre de jonctions marquées par ZO-1 dans une cellule. Les résultats sont exposés sous forme de graphique, représentant soit la moyenne des aires \pm SEM, soit la moyenne du nombre d'évènement \pm SEM. Un test de Kruskal-Wallis couplé au test de Dunn (comparaison des conditions traitées par rapport au contrôle) a été réalisé.

Western blot

Tous les Western blots ont été répétés trois fois à partir d'expériences indépendantes. Les résultats présentés sont représentatifs des données obtenues.

Expression ICAM1 par cytométrie en flux

Quatre expériences ont été réalisées en un réplica. La moyenne de fluorescence corrigée est calculée en soustrayant la moyenne de fluorescence du contrôle isotypique de la moyenne de fluorescence du marquage ICAM1. Puis, l'expression d'ICAM1 est exprimée en pourcentage de fluorescence par rapport au contrôle. Les résultats sont exposés sous forme de graphique, représentant la moyenne de ces pourcentages \pm SEM. Un test de Kruskal-Wallis couplé au test de Dunn (comparaison des conditions traitées par rapport au contrôle) est effectué pour chaque temps.

Test de migration

Pour chaque puits et pour chaque temps, 3 mesures ont été relevées pour mesurer la distance entre les deux bords de la plaie (largeur de la plaie), et une moyenne est mesurée. Au temps 0h, cette moyenne est rapportée à 100%. Puis, la largeur de la plaie a été mesurée toutes les 12h pendant 60h, et le pourcentage de la distance parcourue pour refermer la plaie ainsi que la vitesse de migration en $\mu\text{m}/\text{h}$ ont été calculés. Après 48h d'incubation, l'ensemble de la plaie a été recouverte, par conséquent les résultats sont montrés sur 36h. Les résultats sont exposés sous forme des graphiques. Le premier représente le pourcentage de fermeture de la blessure par rapport à la largeur au temps 0h \pm SEM, le deuxième représente la vitesse de migration pour chaque condition, en $\mu\text{m}/\text{h} \pm$ SEM.

RESULTATS

Chapitre 1 : Effets du FVIIIr sur les cellules endothéliales

I. Effet du FVIII sur l'adhérence des cellules endothéliales

A partir d'observations cliniques, et d'études *in vivo* et *in vitro*, des effets potentiels du FVIII sur les cellules endothéliales sont suspectés (Samuelson Bannow *et al.*, 2019). L'effet du FVIIIr sur l'adhérence des cellules HUVEC a été étudié à l'aide du système xCELLigence RTCA (voir Matériel et Méthode). Différentes conditions ont été testées, en utilisant du FVIII natif ou recombinant. Dans un premier temps, les cellules HUVEC ont été traitées avec différentes concentrations de FVIII natif ou FVIIIr, dans du milieu EGM2 contenant des facteurs de croissance (Figure 15A et B). Les résultats obtenus en Figure 15A montre que le FVIII natif augmente significativement ($p < 0,05$, $p < 0,01$) l'index cellulaire, reflétant l'adhérence des cellules HUVEC à l'E-plate, quel que soit la concentration testée. Cette augmentation est approximativement la même en fonction des concentrations, puisque pour une dose de 1 UI/mL on observe un index cellulaire supérieur de $3,22 (\pm 0,2)$; pour une dose de 2 UI/mL, celui-ci est supérieur de $3,85 (\pm 0,08)$; et pour 5 UI/mL il est augmenté de $3,14 (\pm 0,96)$. De façon surprenante, le FVIIIr aux mêmes concentrations n'a pas d'effet sur l'adhérence des cellules HUVEC (Figure 15B). A la concentration 10 UI/mL de FVIIIr, l'impédance des cellules HUVEC est significativement ($p < 0,05$) diminuée de $1,01 (\pm 0,11)$ (Figure 15B).

Toutefois, le milieu EGM2 n'étant pas optimal afin de voir l'effet du FVIII seul (en raison de la présence des facteurs de croissance), nous avons modifié le protocole. Les cellules HUVEC sont déprivées en facteur de croissance une nuit en milieu basal (EBM2) avec 2% de SVF, puis les cellules sontensemencées et traitées en EBM2 avec 5% de SVF. Dans ces conditions et à chaque concentration testée, le FVIIIr induit une diminution significative ($p < 0,05$) de l'impédance des cellules HUVEC. Pour la doses 1 UI/mL, on observe une diminution de $0,28 (\pm 0,03)$; pour les doses 2 et 5 UI/mL on observe une diminution de $0,27 (\pm 0,019)$ et $0,027$ respectivement) ; pour la dose 10 UI/mL on observe une diminution de $0,33 (\pm 0,013)$; et pour la dose 15 UI/mL on observe une diminution de $0,34 (\pm 0,02)$ (Figure 15C).

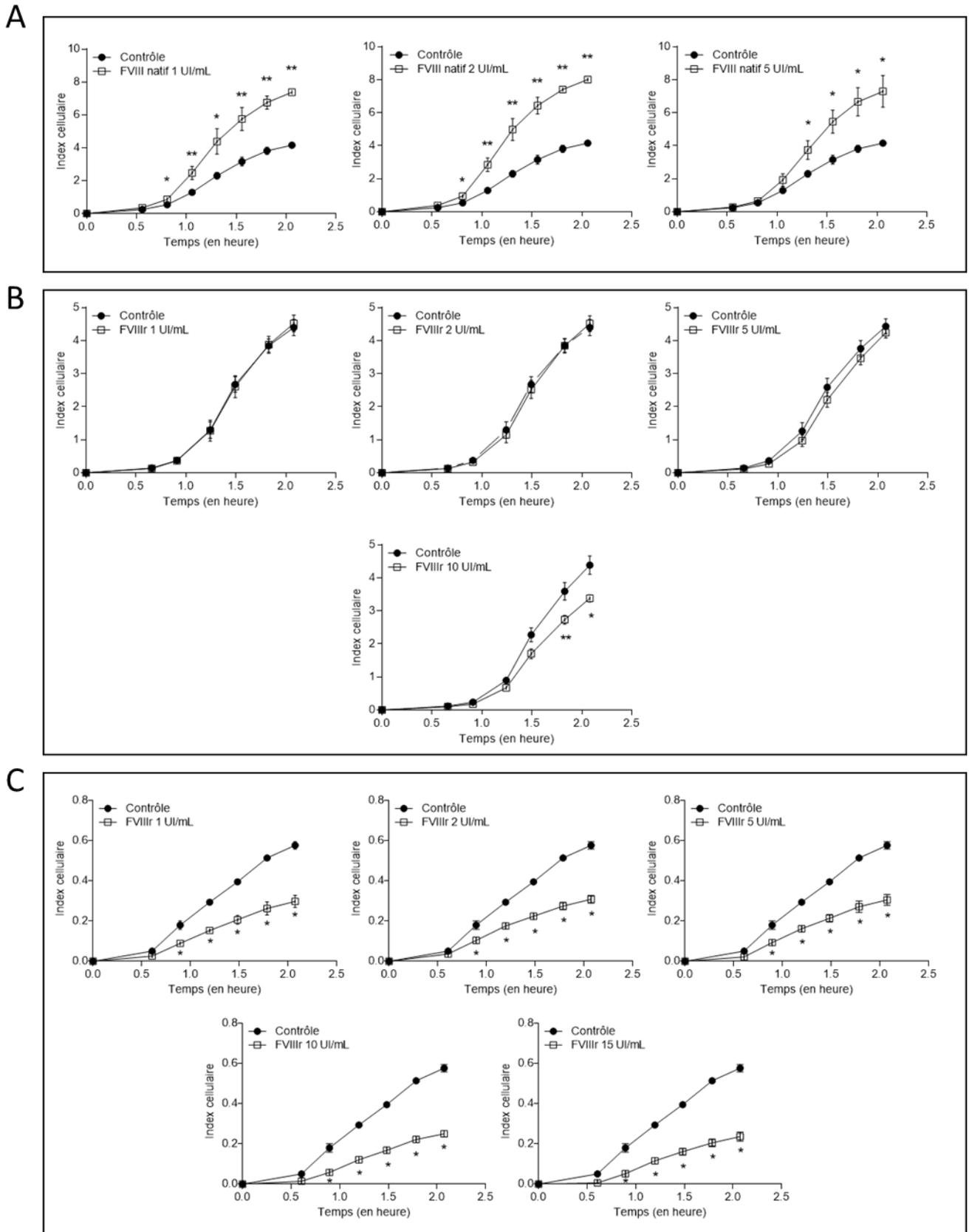


Figure 15 : Effet du FVIIIr ou natif sur l'adhérence des cellules HUVEC via le système xCELLigence. A) et B) 15 000 cellules HUVEC ont été ensemencées en EGM2, en présence ou non de différentes concentrations de FVIII natif (A) ou FVIIIr (B). Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM de l'index cellulaire de 3 ou 4 expériences indépendantes. Test Mann-Whitney * < 0,05, ** < 0,01. C) 10 000 HUVEC ont été ensemencées en EBM2 avec 5% de SVF, en présence ou non de différentes concentrations de FVIIIr. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM de l'index cellulaire de 4 puits indépendants). Test Mann-Whitney * < 0,05.

Ces résultats montrent que la dose 10 UI/mL modifie l'impédance des cellules HUVEC en condition basale et en présence de facteur de croissance, contrairement aux doses plus faibles (Figure 15 B et C). Un effet maximal du FVIII a été observé à 10 UI/mL (Figure 15 C). Pour la suite des expériences, la dose 10 UI/mL sera systématiquement testée, avec ou sans concentration supplémentaire en fonction des expérimentations. Par ailleurs, la pureté du FVIII natif n'étant pas maîtrisée, nous avons étudié l'effet du FVIII recombinant.

II. Le FVIIIr modifie le transcriptome des cellules HUVEC, mais pas le miRome

L'étude de la réponse transcriptomique des cellules HUVEC à l'exposition à du FVIIIr a été réalisée afin d'avoir une vue d'ensemble de ces effets potentiels. Une comparaison a été faite avec le VWF, partenaire majeur du FVIII étant impliqué dans l'angiogenèse ; ainsi qu'avec l'OPG, partenaire du complexe FVIII/VWF, également impliqué dans l'angiogenèse (Benslimane-Ahmim *et al.*, 2011; Starke *et al.*, 2011). Après 7h de traitement des cellules HUVEC avec 10 UI/mL de FVIIIr, 100 ng/mL d'OPGr ou 50 ng/mL de VWFr, le transcriptome a été analysé par RNAseq. Les concentrations d'OPGr et de VWFr, ainsi que le temps de traitement, ont été choisis après des expériences de RTqPCR (résultats non montrés) sur des gènes impliqués dans l'angiogenèse.

Les données obtenues montrent que le FVIIIr modifie de manière significative le profil d'expression génique des cellules HUVEC contrairement à l'OPGr et au VWFr (Figure 16). Il est important de noter qu'il existe une variabilité inter-expérimentation qui reflète la variabilité des lots de cellules HUVEC utilisées. Cette variabilité inter-expérimentation pourrait potentiellement masquer un faible effet du VWFr et de l'OPGr sur ces cellules. Néanmoins, l'analyse par composante principale (PCA plot) montre une modulation significative du transcriptome des cellules HUVEC par le FVIIIr dans les conditions expérimentales utilisées.

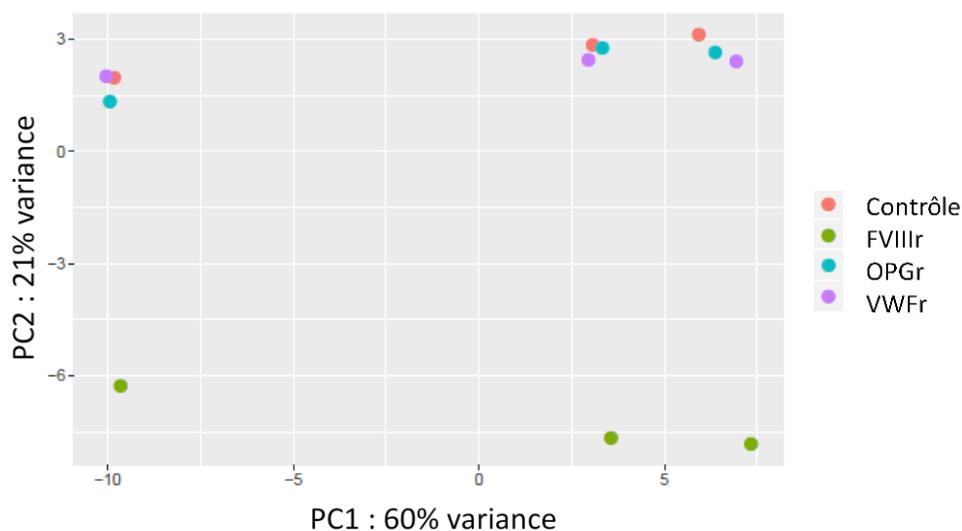


Figure 16 : Le FVIIIr, mais pas l'OPGr et le VWFr, modifie le transcriptome des cellules HUVEC. APC plot des conditions contrôle versus les différentes conditions testées. Les points rouges représentent les conditions contrôles, les points verts représentent les conditions traitées avec 10 UI/mL de FVIIIr, les points bleus représentent les conditions traitées avec 100 ng/mL d'OPGr, et les points violets représentent les conditions traitées avec 50 ng/mL de VWFr. Ce PCA plot montre les résultats de 3 expériences réalisées indépendamment.

Après l'analyse différentielle par la méthode DESeq2, on observe 563 gènes significativement régulés par le FVIIIr, dont 395 sont sur-exprimés, et 168 sont sous-exprimés (Figure 17A). Le volcano plot représente en vert et rouge, les gènes au moins 2 fois plus ou moins exprimés (taux d'augmentation de 2). Cette représentation permet de visualiser les gènes ayant la plus grande modulation d'expression, tels qu'*ICAM1* (Figure 17B). Ces gènes sont résumés dans le Tableau XVI. Parmi les 28 gènes les plus sur-exprimés en présence de FVIIIr, on retrouve des gènes impliqués dans le recrutement leucocytaire comme *ICAM1*, *VCAM1* et *SELE* (E-selectine) codant pour des molécules d'adhérence des leucocytes sur l'endothélium (Greenwood *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 2015; Lehmann *et al.*, 2003) ; *CCL2* (MCP-1) et *CXCL8* (IL-8) codant pour deux chemoattractants leucocytaires (Siddiqui and Partridge, 2017; Waugh and Wilson, 2008) ; *ESM1* codant pour l'Endecan, induisant l'expression d'*ICAM1* et *VCAM1* (Leite *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2019) ; et *SERPINE1* codant pour PAI-1, qui joue un rôle dans la migration des monocytes (Yasar Yildiz *et al.*, 2014). On retrouve également des gènes codant pour des protéines impliquées dans la voie NFκB comme *TRAF1*, *IL32* et *BIRC3* régulant positivement cette voie (Conti *et al.*, 2007; Edilova *et al.*, 2018; Saleem *et al.*, 2013) et *TNFAIP3* (A20) la régulant

négativement (Soni *et al.*, 2018) ; *RELB* et *NFKB2* codant pour des facteurs de transcription de cette voie (De Leo *et al.*, 2020; Millet *et al.*, 2013). Tous ces gènes codent pour des protéines impliquées dans l'immunité innée ou adaptative, ainsi que le gène *IL4I1* impliqué dans la réponse immunitaire adaptative et dont l'induction dépend de la voie NFκB (Molinier-Frenkel *et al.*, 2019). Parmi ces gènes, certains sont également décrits comme codant pour des facteurs pro-angiogènes, comme *ESM1* (via le VEGF-A), *TNFAIP3* et *SERPINE1* (Leite *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2016; McCann *et al.*, 2019). Par ailleurs, d'autres gènes sur-exprimés codent pour des protéines impliquées dans ce processus, comme *CTHRC1* codant pour un facteur pro-angiogène (Lee *et al.*, 2016) ; *CXCL8* codant pour IL-8, qui induit une néoangiogenèse via la signalisation de son récepteur CXCR2 (Waugh and Wilson, 2008) ; *ITGAV* dont la protéine est sur-exprimée pendant l'angiogenèse, afin de promouvoir la croissance et la survie des cellules endothéliales (Weis and Cheresh, 2011); ou encore *SPOCD1* codant pour une protéine induisant l'expression de VEGF-A (facteur pro-angiogénique) (Liang *et al.*, 2018). Ce RNAseq montre également une surexpression de gènes dont les protéines sont impliquées dans la perméabilité de l'endothélium, comme *ESM1* (Leite *et al.*, 2020) ; *CXCL8* via la signalisation de son récepteur CXCR2 (Waugh and Wilson, 2008) ; *TNFAIP3* dont la protéine régule l'expression de la VE-cadhérine (protéine de jonctions serrées) (Soni *et al.*, 2018) ; *NEDD4L* codant pour une protéine dégradant l'occludine (protéine de jonctions serrées) (Goel *et al.*, 2015) ; *CTSS* codant pour la Cathepsine S, qui dégrade JAM-B et la E-cadhérine (protéines de jonctions serrées) ainsi que par l'activation du récepteur PAR2 (Kumar Vr *et al.*, 2016; Wilkinson *et al.*, 2015). A ces facteurs, le FVIIIr induit la sur-expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette et les adhérences focales, comme *AKAP12* codant pour une protéine d'échafaudage pour l'actine (Gelman, 2010) ; *CXCL8* (IL-8) activant des protéines d'adhérences focales comme la paxilline ou les FAK via la signalisation de CXCR2 (Waugh and Wilson, 2008) ; *TAGLN* codant pour la Transgelin, stabilisant les filaments de stress d'actine (Assinder *et al.*, 2009) ; *NEDD9*, codant pour une protéine d'ancrage stabilisant les adhérences focales (Bradbury *et al.*, 2014) ; ou l'*ITGAV* dont la protéine régule l'adhérence cellulaire (Weis and Cheresh, 2011).

Le gène le plus sous-exprimé est le gène *METTL7A* (methyltransferase 7A), codant pour une protéine impliquée dans le métabolisme lipidique (Zhou *et al.*, 2017). Le gène *ADGRG6* (adhesion G protein-coupled receptor, GPR126) codant pour un récepteur suspecté comme

étant impliqué dans la signalisation mécano-dépendante. Toutefois, il est majoritairement étudié dans les cellules de Schwann (Musa *et al.*, 2019). Pour finir, le gène *NOS3* (ou eNOS, endothelial nitric oxydase) codant pour une enzyme ayant pour rôle la synthèse de NO. Elle est impliquée dans le contrôle du tonus vasculaire, dans l'agrégation plaquettaire, mais aussi dans l'adhérence des leucocytes à l'endothélium (Siragusa and Fleming, 2016).

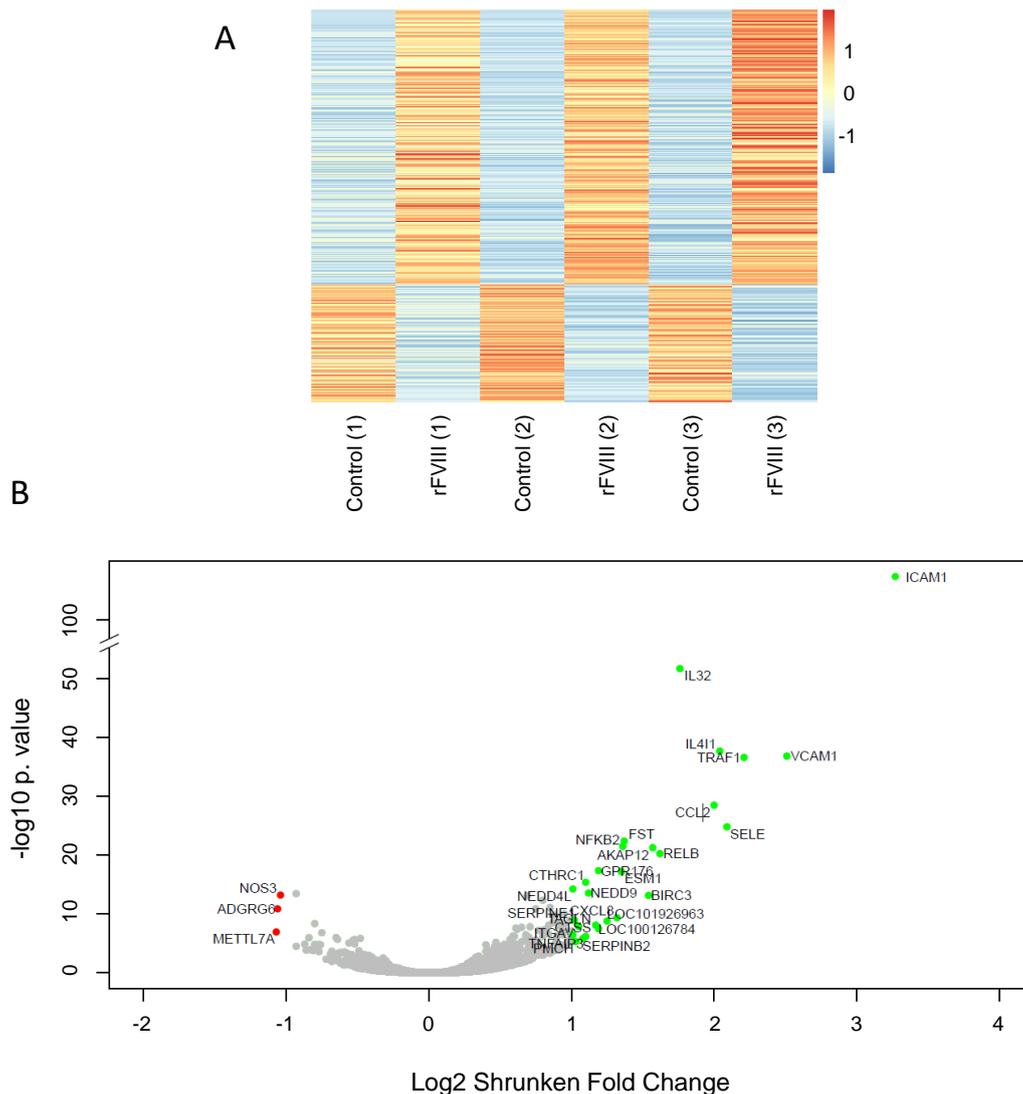


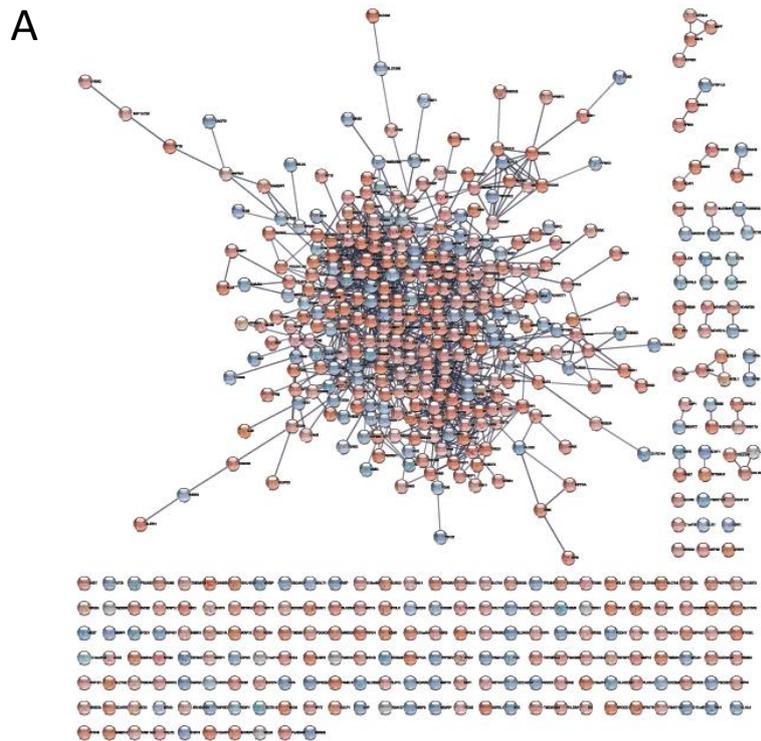
Figure 17 : Le FVIIIr modifie l'expression de 563 gènes des cellules HUVEC. (A) Heat map des conditions contrôles versus les conditions traitées au FVIIIr, représentant les 563 gènes différentiellement exprimés. En rouge sont représentés les gènes sur-exprimés après un traitement au FVIIIr, en bleu sont représentés les gènes sous-exprimés après un traitement au FVIIIr. **(B)** Volcano plot de tous les gènes exprimés, comparant les conditions contrôles et les conditions traitées au FVIIIr. En abscisse est décrit le log fold change corrigé, et en ordonné la p-value ajustée en $-\log_{10}$. Les gènes colorés représentent les gènes différentiellement exprimés avec un fold change de 2 ($\log_2(2) = 1$). En rouge sont représentés les gènes au moins 2 fois moins exprimés et en vert les gènes au moins deux fois plus exprimés.

Tableau XIV : Liste des gènes sur-exprimés et sous-exprimés après traitement au FVIIIr avec un taux de modification d'au moins 2.

Gènes sur-exprimés	<i>Fold change</i>
ICAM1	9,6
VCAM1	5,6
TRAF1	4,6
SELE	4,2
IL4I1	4,1
CCL2	4
IL32	3,4
RELB	3,1
AKAP12	3
BIRC3	2,9
FST	2,6
NFKB2	2,6
ESM1	2,5
CXCL8	2,5
LOC101926963	2,4
GPR176	2,3
LOC100126784	2,3
TAGLN	2,2
NEDD9	2,2
CTHRC1	2,1
TNFAIP3	2,1
SERPINB2	2,1
ITGAV	2,1
PMCH	2
SERPINE1	2
NEDD4L	2
CTSS	2
SPOCD1	2

Gènes sous-exprimés	<i>Fold change</i>
NOS3	-2
ADGRG6	-2,1
METTL7A	-2,1

Des analyses fonctionnelles visant à déterminer les fonctions biologiques enrichies ont été effectuées à partir du logiciel Cytoscape. L'analyse de l'ensemble des 563 gènes différentiellement exprimés a été réalisée, afin d'avoir une vue d'ensemble des fonctions enrichies par ces gènes après un traitement au FVIIIr. Les fonctions enrichies correspondent à la formation de tubes vasculaires (contenant des gènes comme *SERPINE1*, *ITGAV*, *CXCL8*, *CTHRC1* ou *ESM1*), au cytosquelette d'actine ainsi qu'à la migration (dont des gènes comme *ICAM1*, *VCAM1*, *SERPINE1*, *CCL2*, *ITGAV* ou *CXCL8*), impliquant un rôle potentiel du FVIIIr sur la migration et l'angiogenèse. Les fonctions « réponse à un stimulus », « réponse à une substance organique », ainsi que la « fixation protéique » sont également observées (contenant des gènes comme *RELB*, *CCL2*, *ITGAV*, *CXCL8*, *SELE* ou *CTSS*), impliquant la fixation potentielle du FVIIIr à un récepteur de surface, pouvant induire une signalisation intracellulaire. La fonction « système immunitaire » est également enrichie, contenant des gènes comme *CCL2*, *IL32*, *FST*, *ICAM1*, *VCAM1* ou *SELE* (Figure 18).



B

Nombre de gènes impliqués	Base de donnée	Fonctions enrichies	p.value
68	GO Process	Tube morphogenesis	4.45E-17
286	GO Function	Protein binding	2.78E-16
74	GO Process	Tube development	2.76E-15
405	GO Component	Cytoplasm	5.95E-14
314	GO Process	Response to stimulus	1.46E-13
68	GO Process	Regulation of cell migration	1.92E-13
71	GO Process	Anatomical structure formation involved in morphogenesis	4.42E-13
48	GO Component	Actin cytoskeleton	1.55E-12
150	GO Process	Response to organic substance	2.35E-12
133	GO Process	Immune system process	2.87E-12

Figure 18 : Analyse fonctionnelle de l'impact du FVIIIr sur les cellules HUVEC. (A) Vue du réseau protéique correspondant aux gènes 563 différentiellement exprimés après traitement des HUVEC au FVIIIr, générée par Cytoscape. Chaque point correspond à une protéine, et les lignes correspondent aux interactions entre les protéines. En rouge sont représentées les protéines correspondant aux gènes sur-exprimés et en bleu sont représentées les protéines correspondant aux gènes sous-exprimés **(B)** Tableau résumant les 10 premières fonctions ou voies métabolique enrichies après un traitement au FVIIIr. Analyses générées par Cytoscape, réalisées avec les 563 gènes différentiellement exprimés.

Une analyse des clusters, représentant le plus souvent des complexes protéiques, a également été réalisée (Figure 19, 20, 21, 22, 23). Les fonctions enrichies par ces clusters correspondent à l'ubiquitination (Figure 19), au système immunitaire (TNF, NFκB, Interferon, Interleukine 4 et 13) (Figure 21, 22, 23), les adhésions focales ou encore les jonctions adhérentes (Figure 20).

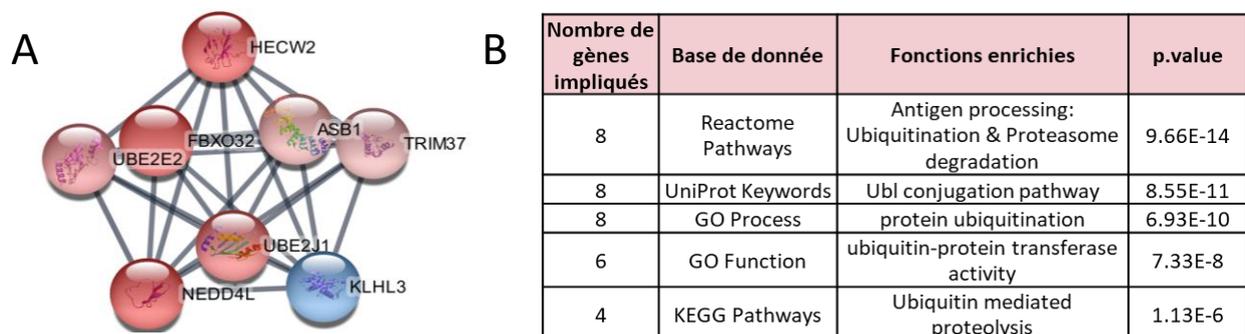


Figure 19 : Analyse fonctionnelle du cluster 1. (A) Vue du cluster n°1 isolé. En rouge sont représentées les protéines correspondant aux gènes surexprimés et en bleu sont représentées les protéines correspondant aux gènes sous-exprimés. **(B)** Tableau résumant les 5 premières fonctions ou voies métaboliques enrichies après un traitement au FVIIIr, associé à ce cluster.

L'ubiquitination est un système de modification protéique induisant la dégradation, la stabilisation ou la relocalisation de la protéine ciblée (Rieser *et al.*, 2013). Dans le cluster 1 (Figure 19) on retrouve notamment le gène codant pour la protéine NEDD4L (taux d'augmentation de 2 en présence de FVIIIr), une ubiquitin protein ligase se fixant à de nombreuses protéines membranaires pour aider à leur internalisation, comme des canaux sodique voltage dépendant (Na_v s) essentiels à la génération de potentiels d'actions de cellules excitables comme les neurones ganglionnaires (Cachemaille *et al.*, 2012). Dans les cellules endothéliales, il est décrit que la protéine c-Src activée par le récepteur PAR1, active NEDD4L qui va induire l'activation de p38, entraînant alors une augmentation de la perméabilité de l'endothélium (Goel *et al.*, 2015; Grimsey *et al.*, 2018).

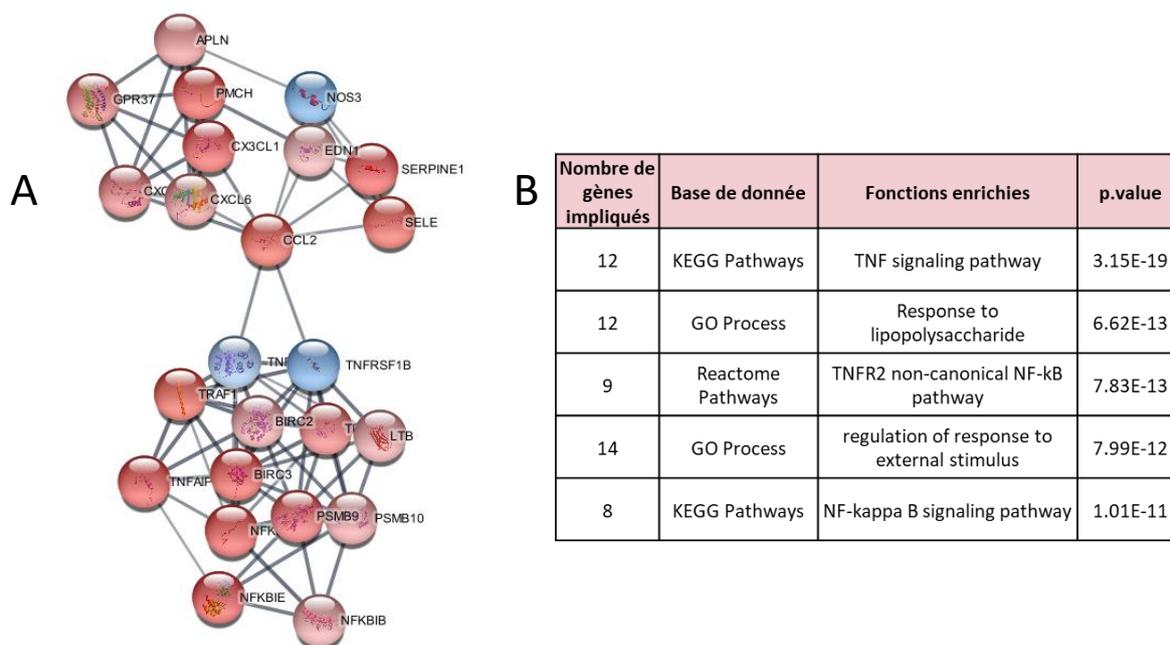


Figure 20 : Analyse fonctionnelle du cluster 2. (A) Vue du cluster n°2 isolé. En rouge sont représentées les protéines correspondant aux gènes surexprimés et en bleu sont représentées les protéines correspondant aux gènes sous-exprimés. **(B)** Tableau résumant les 5 premières fonctions ou voies métaboliques enrichies associées à ce cluster après un traitement au FVIIIr.

La signalisation TNF a un impact majeur dans la cellule endothéliale pendant l'inflammation, conduisant à l'expression de protéines impliquées dans l'adhérence leucocytaire (via ICAM1, VCAM1 et l'E-selectine notamment), l'activation leucocytaire (via IL-8 ou MCP1 notamment) et la coagulation (via le facteur tissulaire ou PAI-1). La voie TNF peut aussi inhiber l'expression de protéine comme eNOS, et est médiée par différentes voies, dont la voie NFκB (Madge and Pober, 2001). Dans le cluster 2 (Figure 20), on retrouve une sur-expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la voie du TNF : *TRAF1* (taux d'augmentation de 4,6), *TNFAIP3* (taux d'augmentation de 2,1) ou *TRAF3* (taux d'augmentation de 1,5). Toutefois, il est intéressant de constater une sous-expression des gènes *TNFRSF1A* (taux de diminution de -1,3) et *TNFRSF1B* (taux de diminution de -1,5), codant pour les récepteurs TNFR1 et TNFR2. La protéine TRAF1, activée par le TNF (dont le récepteur TNFR2), est décrite comme activant la voie NFκB, et JNK (Edilova *et al.*, 2018). Toutefois, la protéine TNFAIP3 inhibe la voie NFκB (Soni *et al.*, 2018). On retrouve également une sur-expression de gènes codant pour des protéines de la voie NFκB dont *NFKB2* (taux d'augmentation de 2,6) codant pour un facteur de transcription de la voie NFκB ; mais aussi *NFKBIB* (taux d'augmentation de 1,3) et *NFKBIE* (taux d'augmentation de 1,7) codant pour des inhibiteurs de NFκB (Hayden and Ghosh, 2008).

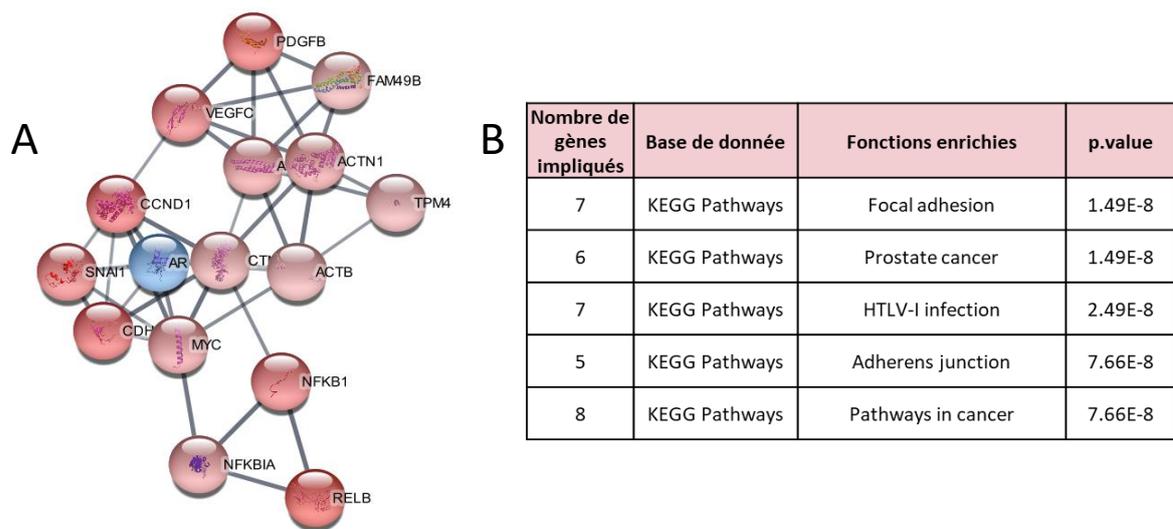


Figure 21 : Analyse fonctionnelle du cluster 3. (A) Vue du cluster n°3 isolé. En rouge sont représentées les protéines correspondant aux gènes surexprimés et en bleu sont représentées les protéines correspondant aux gènes sous-exprimés. **(B)** Tableau résumant les 5 premières fonctions ou voies métaboliques enrichies associées au cluster 3 après un traitement au FVIIIr.

Dans le cluster 3 (Figure 21), on retrouve des gènes codant pour des protéines du cytosquelette d'actine comme *ACTN1* et *ACTN4* (taux d'augmentation de 1,4), ou *ACTB* (taux d'augmentation de 1,3). *ACTB* code pour la β -actine, une isoforme de l'actine présente dans les cellules non musculaires ; *ACTN1* et 4 codent pour les protéines α -actinine 1 et 4 également présentes dans les cellules non musculaires, étant impliquées dans la formation des fibres de stress d'actine (structures contractiles retrouvées dans des types cellulaires non musculaires). Les fibres de stress sont ancrées à la membrane plasmique au niveau des adhérences focales, liées à la matrice extracellulaire (impactant la morphologie cellulaire), ainsi qu'aux jonctions adhérentes, impliquées dans l'adhérence cellules-cellules (importante au contrôle de la perméabilité de l'endothélium) (Natale *et al.*, 2019; Pollard, 2016; Sjöblom *et al.*, 2008; Svitkina, 2018).

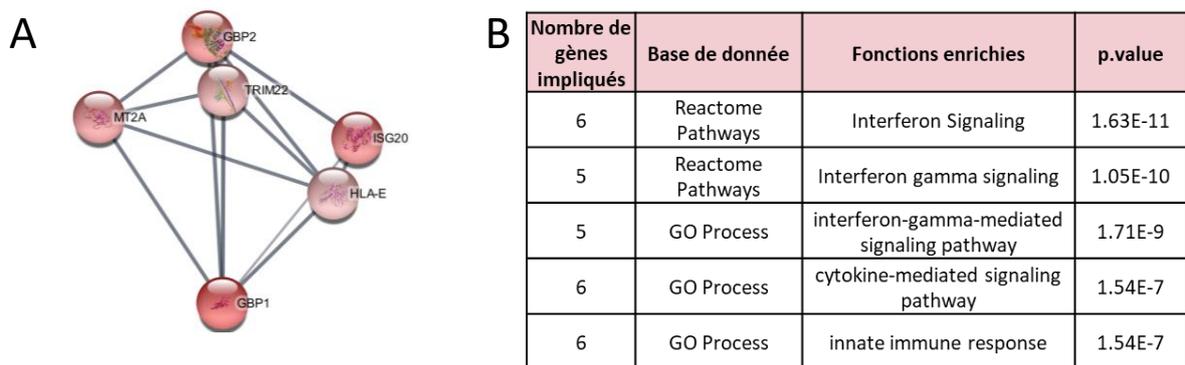


Figure 22 : Analyse fonctionnelle du cluster 4. (A) Vue du cluster n°4 isolé. En rouge sont représentées les protéines correspondant aux gènes surexprimés et en bleu sont représentées les protéines correspondant aux gènes sous-exprimés. **(B)** Tableau résumant les 5 premières fonctions ou voies métaboliques enrichies associées à ce cluster après un traitement au FVIIIr.

Le cluster 4 montre une sur-expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la signalisation interféron en présence de FVIIIr, comme *GBP1* et *GBP2* (taux d'augmentation de 1,9 et 1,5) (Guanylate binding protein 1 et 2) (Figure 22). La signalisation interféron, et notamment l'interféron- γ , a un impact important sur la cellule endothéliale dans un contexte inflammatoire. L'activation de cette voie, via notamment l'interféron- γ , induit une augmentation de l'expression de protéines du complexe majeur d'histocompatibilité comme HLA-E, dont le gène est retrouvé sur-exprimé en présence de FVIIIr (taux d'augmentation de 1,2). La signalisation interféron dans les cellules endothéliales induit également le recrutement de cellules immunitaires, et diminue l'expression de protéines de jonctions comme la VE-cadhérine ou l'occludine (Chrobak *et al.*, 2013; Minagar *et al.*, 2003; Tellides George and Pober Jordan S., 2007).

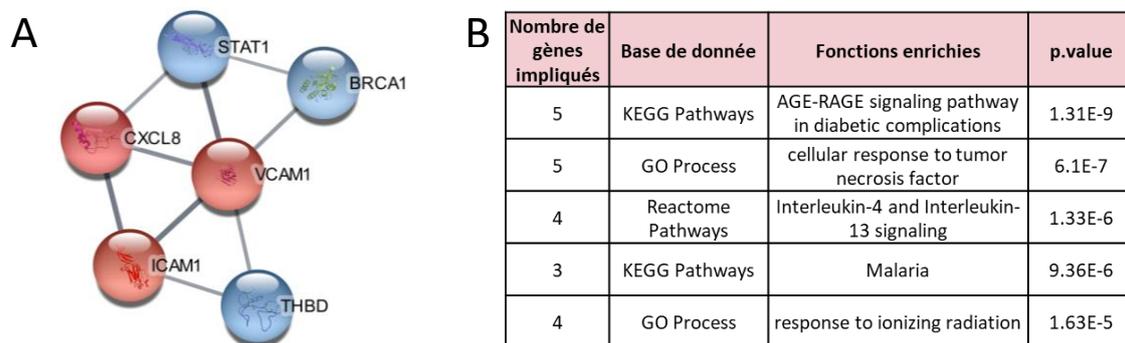


Figure 23 : Analyse fonctionnelle du cluster 5. (A) Vue du cluster n°5 isolé. En rouge sont représentées les protéines correspondant aux gènes surexprimés et en bleu sont représentées les protéines correspondant aux gènes sous-exprimés. **(B)** Tableau résumant les 5 premières fonctions ou voies métaboliques enrichies associées à ce cluster après un traitement au FVIIIr.

Dans le cluster 5, on retrouve des gènes fortement sur-exprimés comme *ICAM1*, *VCAM1* et *CXCL8* (Tableau XIV et Figure 23). Comme décrit précédemment, ces gènes sont décrits comme codant pour des protéines sur-exprimées en réponse au TNF (Madge and Pober, 2001), mais également en réponse à l'interleukine-4 et 13, augmentant le recrutement leucocytaire ainsi que l'angiogenèse (Berger *et al.*, 2002; Fukushi *et al.*, 2000; May and Fung, 2015). La voie AGE-RAGE est impliquée dans la calcification vasculaire dans un contexte diabétique, à travers différentes protéines de signalisation dont le NFκB, et induit l'expression de VCAM1 et ICAM1 (Nonaka *et al.*, 2018; Schmidt *et al.*, 1995). Toutefois, on observe une sous-expression *STAT1* (taux de diminution de -1,4), codant pour un facteur de transcription décrit comme étant activé par l'interleukine-4 et 13 (Wang *et al.*, 2004) ; ainsi qu'une sous-expression de *THBD* codant pour la thrombomoduline (taux de baisse de -1,7). La thrombomoduline est un co-facteur de la thrombine exprimée à la surface des cellules endothéliales et ayant un rôle anti-coagulant. Elle est sous-exprimée par le TNFα, mais cette sous-expression est contrebalancée par l'interleukine-4 et 13 (Herbert *et al.*, 1993)

Suite aux résultats du RNAseq, nous avons analysé l'expression des miARN des cellules HUVEC traitées ou non par 10 UI/mL de FVIIIr pendant 7h. Pour cela, le logiciel Transcriptome Analyses Software (TAC) d'Affymetrix a été utilisé. Contrairement au RNAseq, le PCA plot ne montre pas de modulation du miRome par le traitement au FVIIIr (Figure 24). Toutefois, les conditions cinétiques ne sont probablement pas optimales pour observer une modification du miRome, différents temps de traitement mériteraient d'être testés.

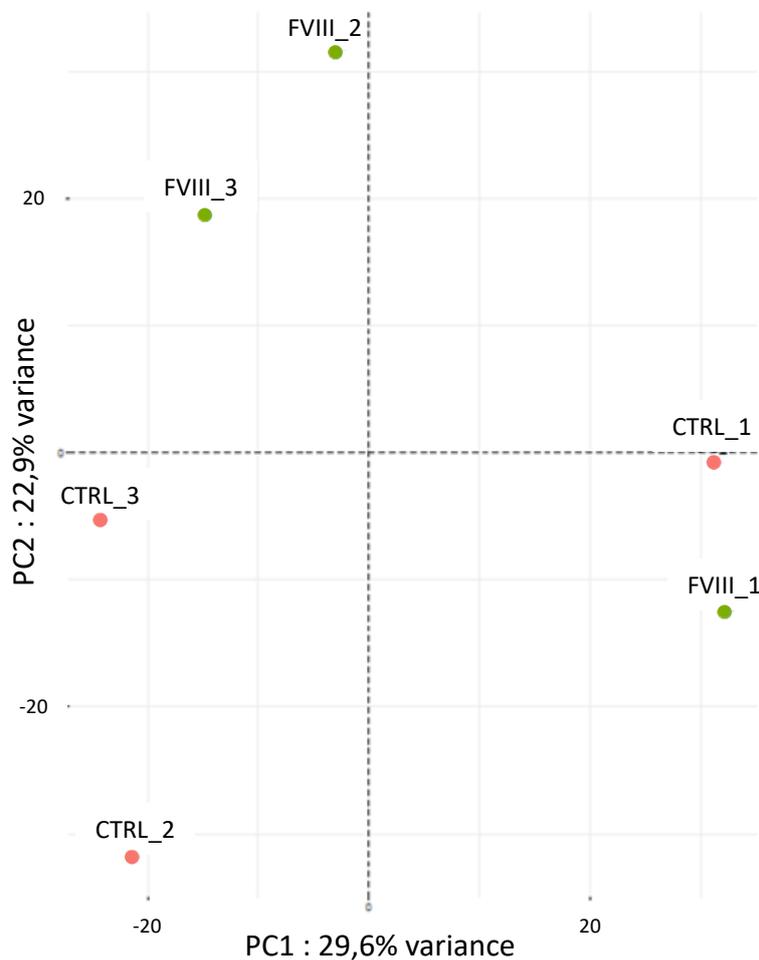


Figure 24 : Le FVIII ne modifie pas le miRome sur les cellules HUVEC. Analyse par composante principale (PCA plot) des conditions contrôles versus les conditions traitées avec 10 UI/mL de FVIIIr. Les points rouges représentent les conditions contrôles et les points verts représentent les conditions traitées au FVIIIr.

III. Le FVIIIr modifie profil protéique des cellules HUVEC

ICAM1 étant le gène le plus sur-exprimé par les cellules HUVEC en présence du FVIIIr à 10 UI/mL, une analyse de son expression au niveau protéique a été réalisée par cytométrie en flux après 24h de traitement à 10 UI/mL de FVIIIr. L'analyse par cytométrie en flux montre une augmentation significative ($p < 0,05$) de 86,7% ($\pm 12,6\%$) de son expression après 24h de traitement, confirmant les résultats au niveau protéique du RNAseq (Figure 25B).

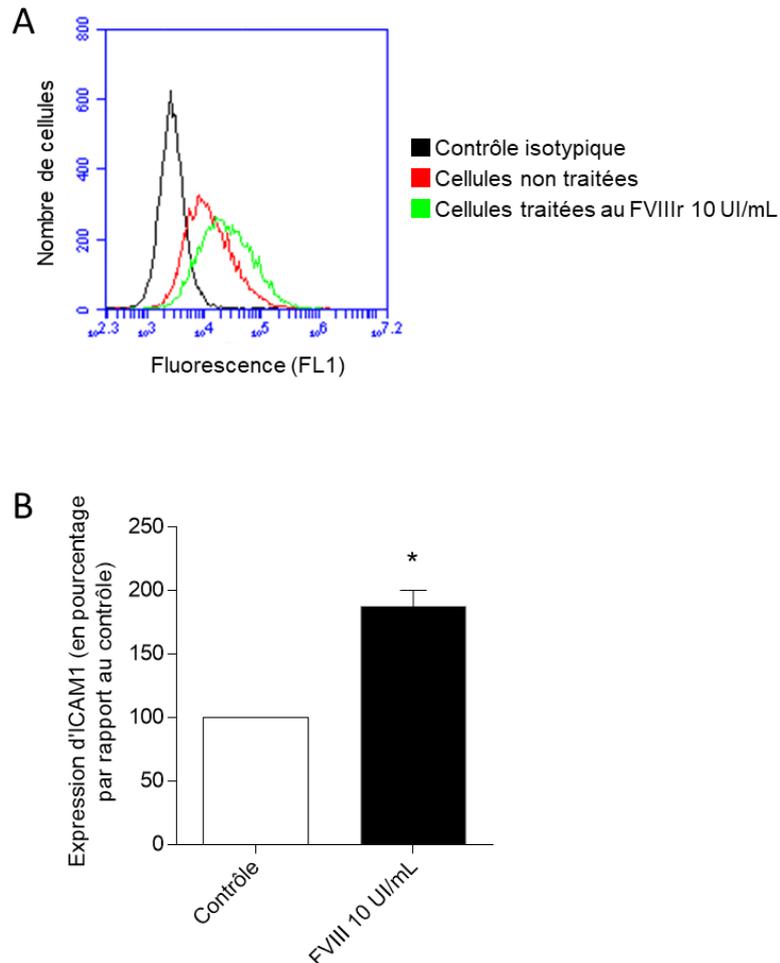


Figure 25 : Le FVIIIr augmente l'expression d'ICAM1 à la surface des cellules HUVECs. Après 24h de traitement avec 10 UI/mL de FVIIIr, la présence d'ICAM1 à la surface des cellules HUVEC a été mesurée par cytométrie en flux. **A)** Histogramme représentant la fluorescence du contrôle isotypique (noir), des marquages ICAM1 de la condition cellules non traitées (rouge) et de la condition cellules traitées au FVIIIr (vert). **B)** L'expression d'ICAM1 des cellules traitées a été exprimée en pourcentage de fluorescence par rapport au contrôle non traité. Le graphique représente la moyenne de ces pourcentages \pm SEM de 4 expériences réalisées indépendamment. Un test Mann-Whitney a été réalisé, * $p < 0,05$.

Pour compléter ces résultats, une étude du profil protéique des cellules HUVEC a été réalisée en condition physiologique ou inflammatoire, par cytométrie en flux. Les cellules HUVEC ont été traitées pendant 48h en présence ou non de 4 concentrations de FVIIIr (20, 10, 5 et 2,5 UI/mL) ; ainsi qu'en présence ou non de 10 ng/mL de TNF α ou de 20 ng/mL d'IFN γ (conditions inflammatoires) (Madge and Pober, 2001; Tellides George and Pober Jordan S., 2007). Les cibles analysées par cytométrie en flux sont listées dans le Tableau XIII (voir Matériel et Méthode), et le schéma explicatif pour la lecture des résultats se trouve en Figure 26.

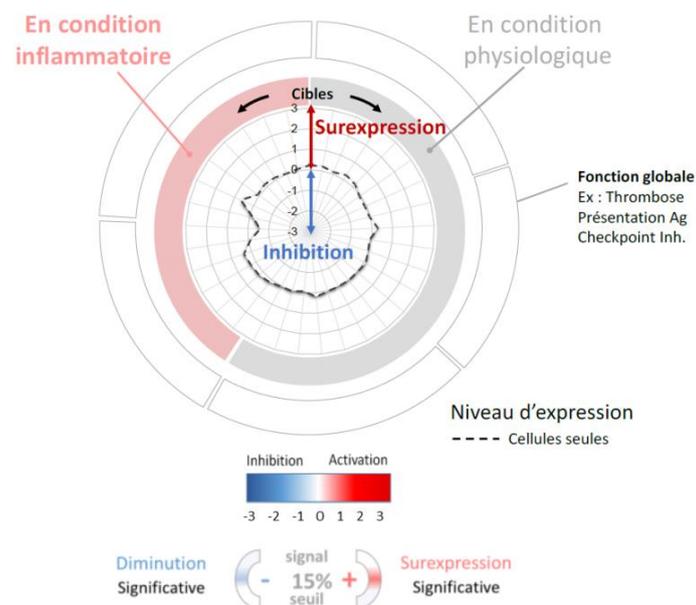


Figure 26 : Schéma expliquant la lecture des résultats obtenus lors de l'analyse du profil protéique. L'échelle est logarithmique. Seules les cibles dont les variations sont les plus significatives ont été écrites en gras, le seuil de significativité ayant été arbitrairement fixé à 15%. En rouge sont représentées les cibles testées en condition inflammatoire, et en gris celles testées en condition physiologique.

FVIII 20 UI/mL

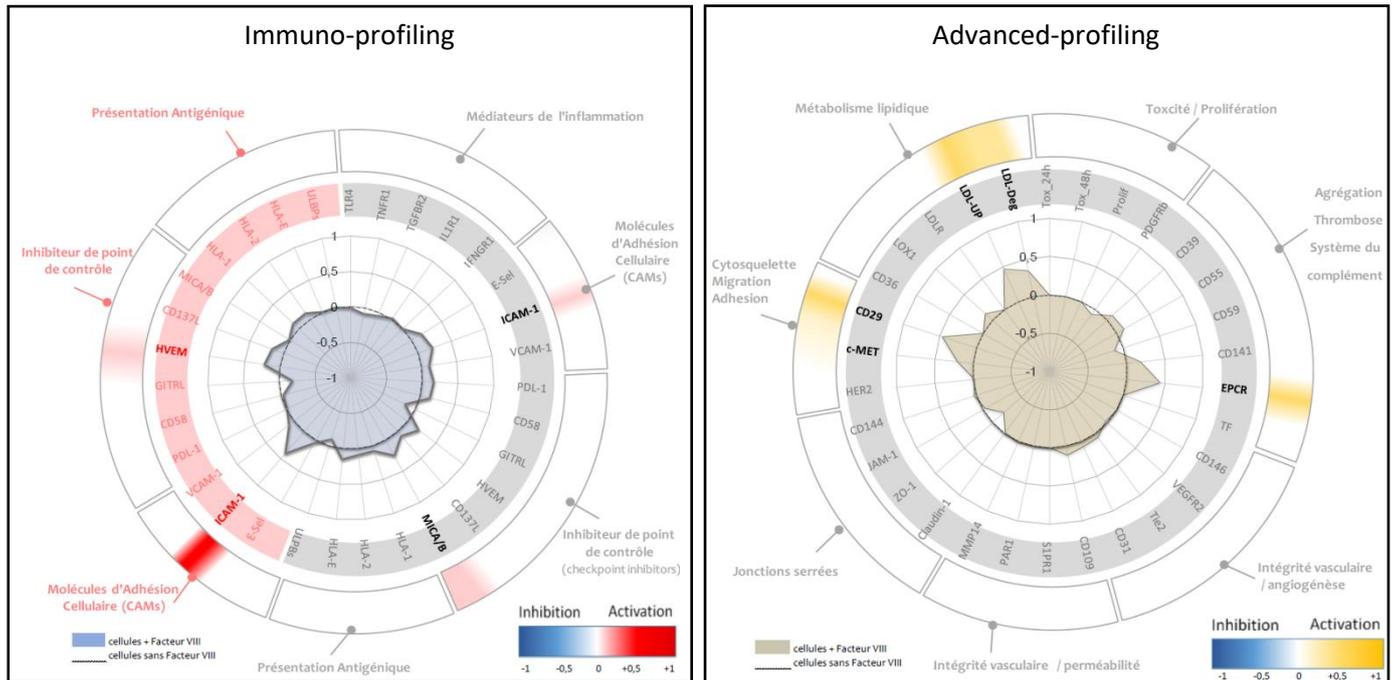


Figure 27 : Le FVIII à 20 UI/mL modifie le profil protéique des cellules HUVEC.

Le FVIIIr, à la concentration 20 IU/ml, démontre une activité sur les inhibiteurs de point de contrôle (immune check point) en condition basale, avec une augmentation de 19,2% de l'expression membranaire de MICA/B ; ainsi qu'en condition inflammatoire, avec une augmentation de 16,4% d'HVEM. En conditions inflammatoire et basale, on observe une augmentation respective de 32% et 16,2% de l'expression d'ICAM1. Le FVIIIr à 20 UI/mL montre également une modulation des protéines c-MET (augmentation de 15,2%) et CD29 (augmentation de 38,3%), impliquées dans la réorganisation du cytosquelette, de la migration ou de la prolifération cellulaire. Une augmentation de 36,1% de l'EPCR, ayant un rôle anti-coagulant, à la surface de l'endothélium est observée. Enfin, le FVIIIr pourrait jouer un rôle dans la régulation du métabolisme lipidique, en augmentant la récupération des LDL par la cellule endothéliale (LDL uptake augmenté de 37,9%, LDL degradation augmenté de 26,9%) (Figure 27).

FVIII 5 UI/mL

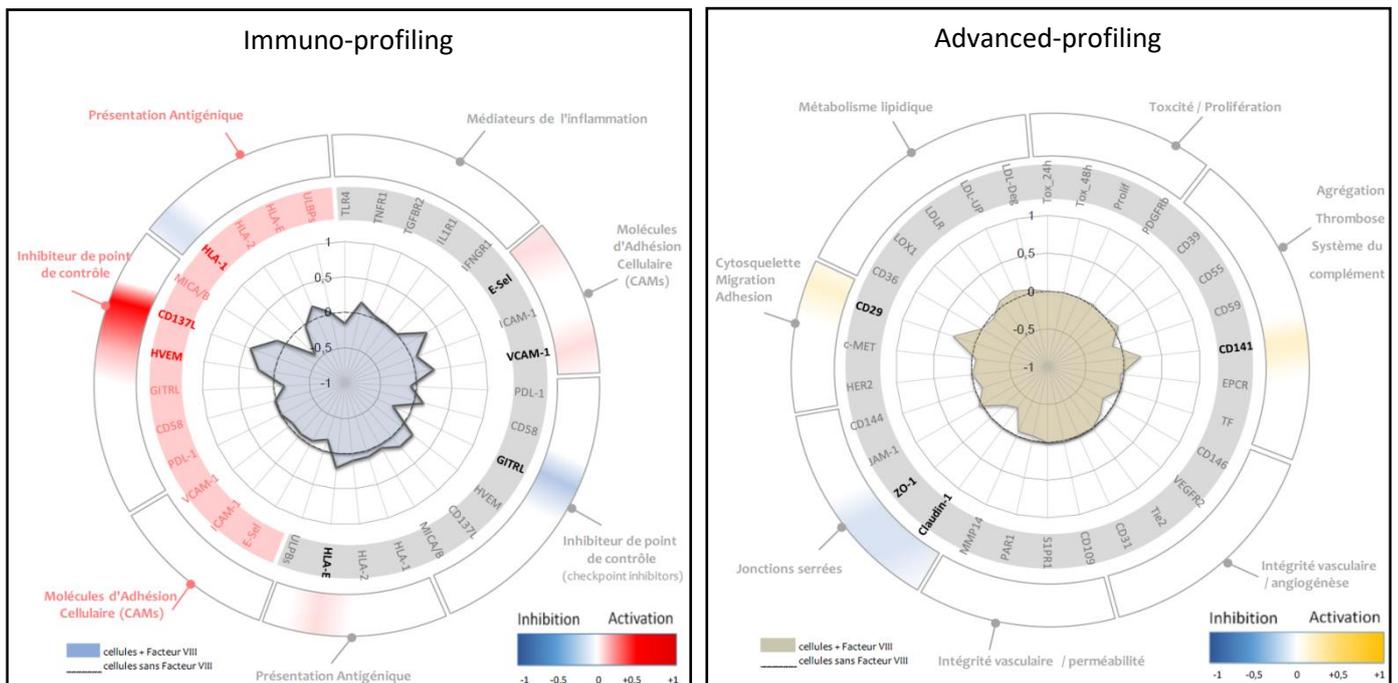


Figure 29 : Le FVIII à 5 UI/mL modifie le profil protéique des cellules HUVEC.

A une concentration à 5 IU/ml de FVIIIr, les effets obtenus sur les molécules d'adhérence cellulaire à la concentration 10 IU/ml se confirment, avec une augmentation de 26,9% de l'E-selectine et 20,3% de VCAM1 en condition basale. La modulation de CD29 est également conservée, avec une augmentation de 24%. Toutefois, quelques différences sur les inhibiteurs de point de contrôle et la présentation antigénique sont observées. En effet, à cette concentration les récepteurs impliqués dans la présentation antigénique reste augmentée via l'augmentation de 15,5% d'HLA-E en condition basale ; mais diminue en condition inflammatoire via une baisse de 24,8% de l'expression d'HLA-1. Concernant les inhibiteurs de point de contrôle, ils restent surexprimés en condition inflammatoire (augmentation de 33,4% de l'expression de CD137, et de HVEM de 17,4%), mais pas en condition basale (GITRL diminué de 16,3%). Par ailleurs, le FVIIIr à 5 IU/ml diminue l'expression de protéines de jonctions serrées (ZO-1 diminué de 15,7%, Claudin-1 diminué de 20,8%), pouvant probablement augmenter la perméabilité vasculaire. La coagulation se retrouve aussi impactée avec une augmentation de 17% de CD141 connu pour avoir une activité anti-coagulante (Figure 29).

FVIII 2,5 UI/mL

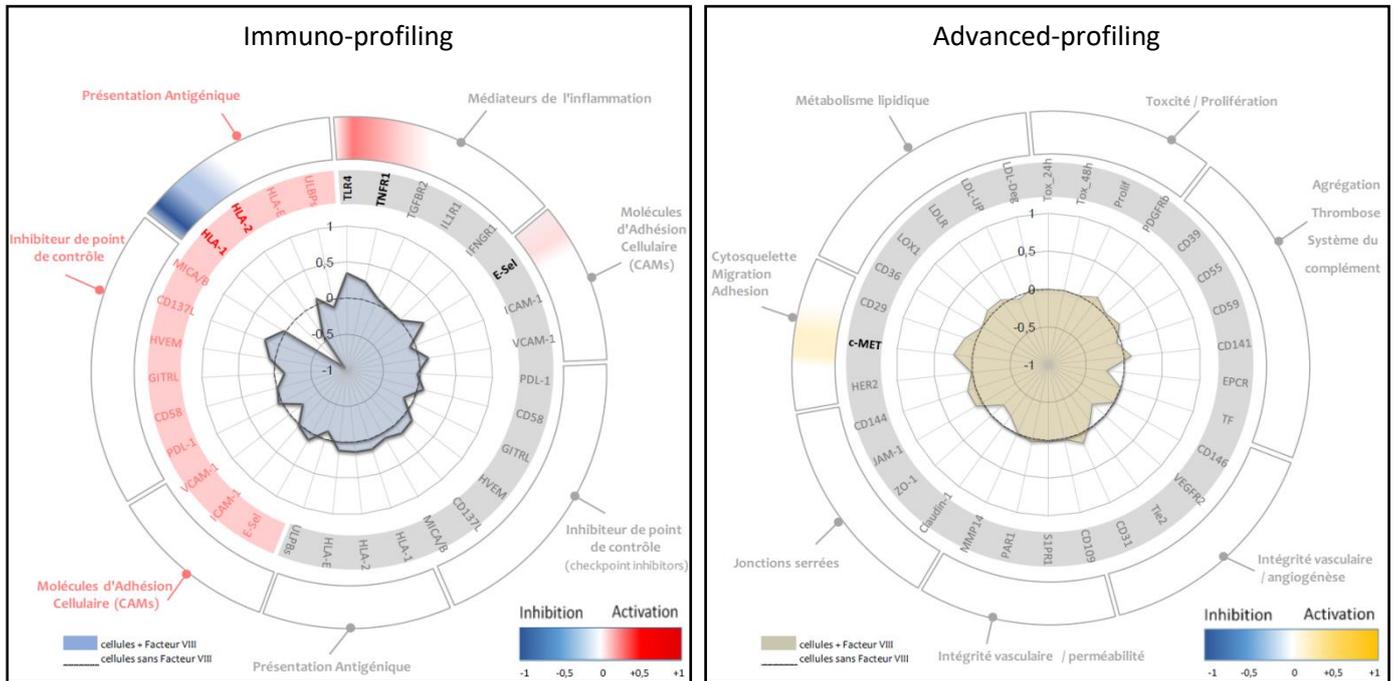


Figure 30 : Le FVIII à 2,5 UI/mL modifie le profil protéique des cellules HUVEC.

L'effet sur les molécules d'adhérence cellulaire persiste à une dose en FVIIIr à 2,5 IU/ml via une augmentation de 18,2% de l'E-selectine en condition basale. On constate également une surexpression du TNFR1 et du TLR4 (respectivement 27,3% et 18,8%), propre à renforcer l'immunité innée. L'effet d'une diminution de la présentation antigénique est accentué en condition inflammatoire via une diminution de 48,3% de l'expression d'HLA-1 et de 25,4% d'HLA-2. On observe également une augmentation de 18,5% de c-MET, qui pourrait être associée ici à son rôle anti-inflammatoire plutôt qu'à son rôle dans la migration et la prolifération cellulaire (Figure 30).

Sur les 4 concentrations testées, le rôle indirect du FVIIIr sur le système immunitaire via l'endothélium peut être suspecté, notamment via :

- l'augmentation du niveau d'expression des molécules d'adhérence cellulaire (ICAM1, VCAM1, E-selectine) impliquées dans le recrutement leucocytaire,
- la modulation d'inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (HVEM, CD137L) impliqués dans le signal de co-stimulation des cellules immunitaires,
- la modulation des récepteurs de la présentation antigénique en condition basale ou inflammatoire (HLA-1, HLA-2, HLA-E),
- le renforcement de l'immunité innée via l'augmentation de médiateurs de l'inflammation (TLR4 et TNFR1).

Le FVIIIr présente également d'autres effets potentiels à la surface de l'endothélium, notamment avec la modulation des jonctions serrées (Claudin-1 et ZO-1) et du cytosquelette (CD29), pouvant impacter la perméabilité de la barrière endothéliale. Un effet potentiel sur le métabolisme lipidique est également observé, en captant et dégradant davantage de LDL (LDL-Deg, LDL-UP) ; ainsi que sur les protéines endothéliales impliquées dans la modulation du thrombus, pouvant alors contrebalancer l'effet pro-coagulant du FVIIIr (EPCR, CD141).

Chapitre 2 : Impact fonctionnel du FVIIIr sur les cellules endothéliales

IV. Le FVIIIr induit la tubulogénèse des ECFC

Les données RNAseq montrent un impact du FVIIIr sur 73 gènes codant pour des protéines impliquées dans la tubulogénèse, dont *ESM1* (autrement nommé Endecan), *CTHRC1* (collagen triple-helix repeat-containing 1), ou encore *SERPINE1*, respectivement 2,5, 2,1 et 2 fois plus exprimés après traitement au FVIIIr (Lee *et al.*, 2016; Leite *et al.*, 2020; McCann *et al.*, 2019). Nous avons alors analysé la capacité des progéniteurs endothéliaux ECFCs (endothelial colony forming cells) à former des tubes vasculaires *in vitro* sur une matrice Geltrex™. Après 18h de traitement avec ou sans FVIIIr, la taille moyenne des tubules formés par les ECFC dans la matrice est significativement ($p < 0,01$) augmenté de 34,64 % en présence de FVIIIr ($54\,418 \pm 1939 \mu\text{m}$ en présence de FVIIIr, contre $40\,418 \pm 5\,509 \mu\text{m}$ sans traitement) (Figure 31).

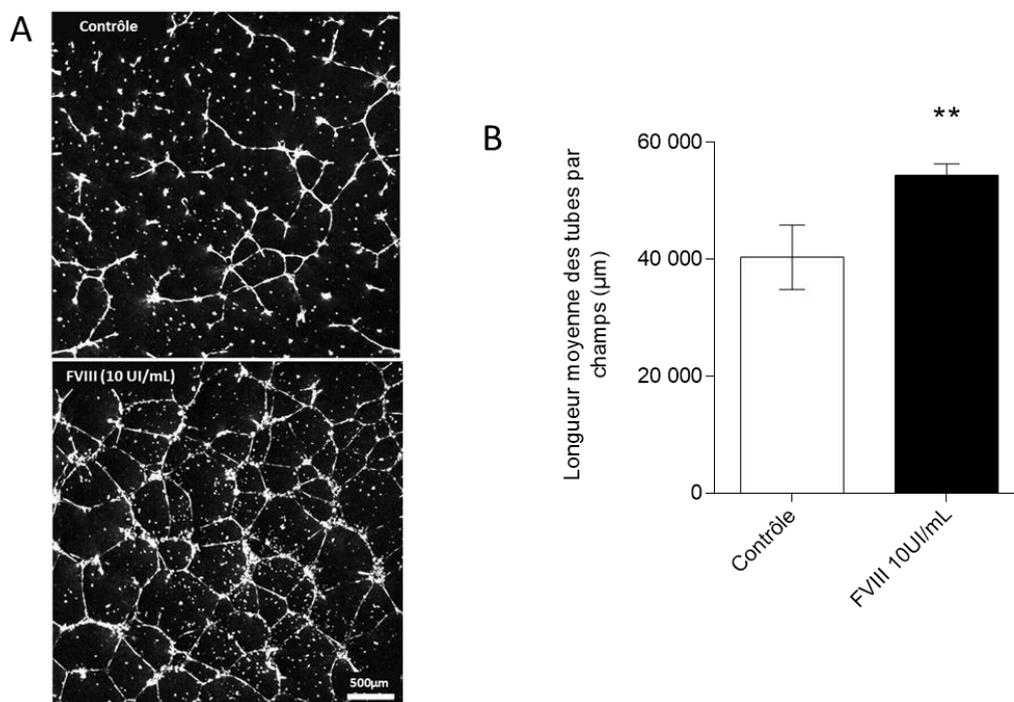


Figure 31 : Le FVIIIr induit la tubulogénèse des ECFC *in vitro*. Après avoir déprivé les ECFC en facteurs de croissance pendant une nuit, celles-ci sontensemencées sur une matrice Geltrex™ dans du milieu EBM2 avec 5% de SVF, traitées ou non 10 UI/mL deFVIIIr. **A)** Images de microscopie des réseaux de tubules formés par les ECFC dans le Geltrex™ en présence ou non de FVIIIr. **B)** La taille des réseaux de tubules est mesurée sur le logiciel Fiji, à l'aide du plugin « Angiogenesis Analyzer ». Les résultats représentent la longueur moyenne des tubes par champs \pm SEM. $n = 12$ champs par condition, test Mann-Whitney $** < 0,01$.

V. Effet du FVIIIr sur la migration des cellules endothéliales

La migration des cellules endothéliales est nécessaire dans le processus de néo-angiogenèse. Afin d'étudier l'impact du FVIIIr sur les cellules HUVEC, un test de migration a été effectué, en présence ou non de 0,62 ou 10 UI/mL de FVIIIr. Après 12h d'incubation, aucune différence de migration n'est observée en présence de FVIIIr par rapport au contrôle sans traitement ($22,57 \pm 2,54$ % de la blessure ont été refermé sans traitement, contre $28,85 \pm 4,71$ % et $22,89 \pm 3,72$ % en présence de 0,62 et 10 UI/mL de FVIIIr) (Figure 32B). Après 24h d'incubation, la blessure est 1,46 fois plus refermée en présence de 0,62 UI/mL de FVIIIr par rapport au contrôle sans traitement ($31,43 \pm 1,09$ % de fermeture sans traitement, contre $45,63 \pm 0,52$ % avec 0,62 UI/mL de FVIIIr). Une faible augmentation de la migration est observée en présence de 10 UI/mL de FVIIIr, avec une fermeture de $37,79 \pm 4,43$ %. Enfin, après 36h d'incubation, la fermeture de la blessure est plus importante en présence de 0,62 et 10 UI/mL de FVIIIr, avec respectivement $49,33 \pm 0,7$ % et $44,33 \pm 2,13$ % de fermeture, contre $32,14 \pm 1,8$ % en l'absence de traitement. La vitesse de migration des cellules HUVEC est augmentée de 52,3 % en présence de 0,62 UI/mL de FVIIIr, et de 30,1 % en présence de 10 UI/mL par rapport au contrôle. En effet, avec un traitement à 0,62 et 10 UI/mL, la vitesse de migration est de respectivement $15,43 \pm 0,16$ $\mu\text{m/h}$ et $13,18 \pm 0,18$ $\mu\text{m/h}$, contre $10,13 \pm 0,85$ $\mu\text{m/h}$ sans traitement (Figure 32B).

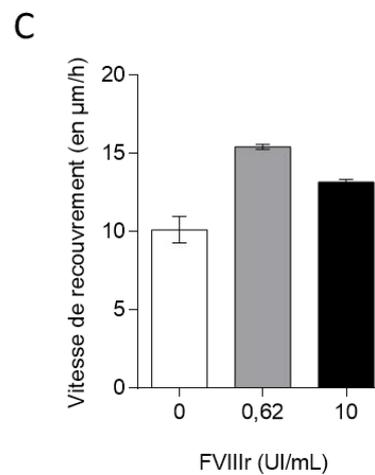
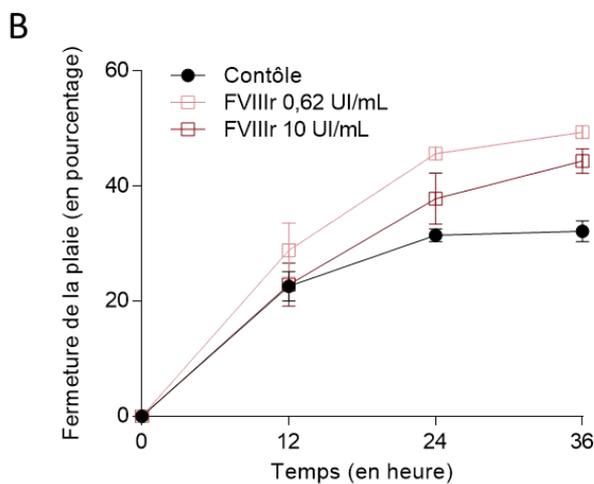
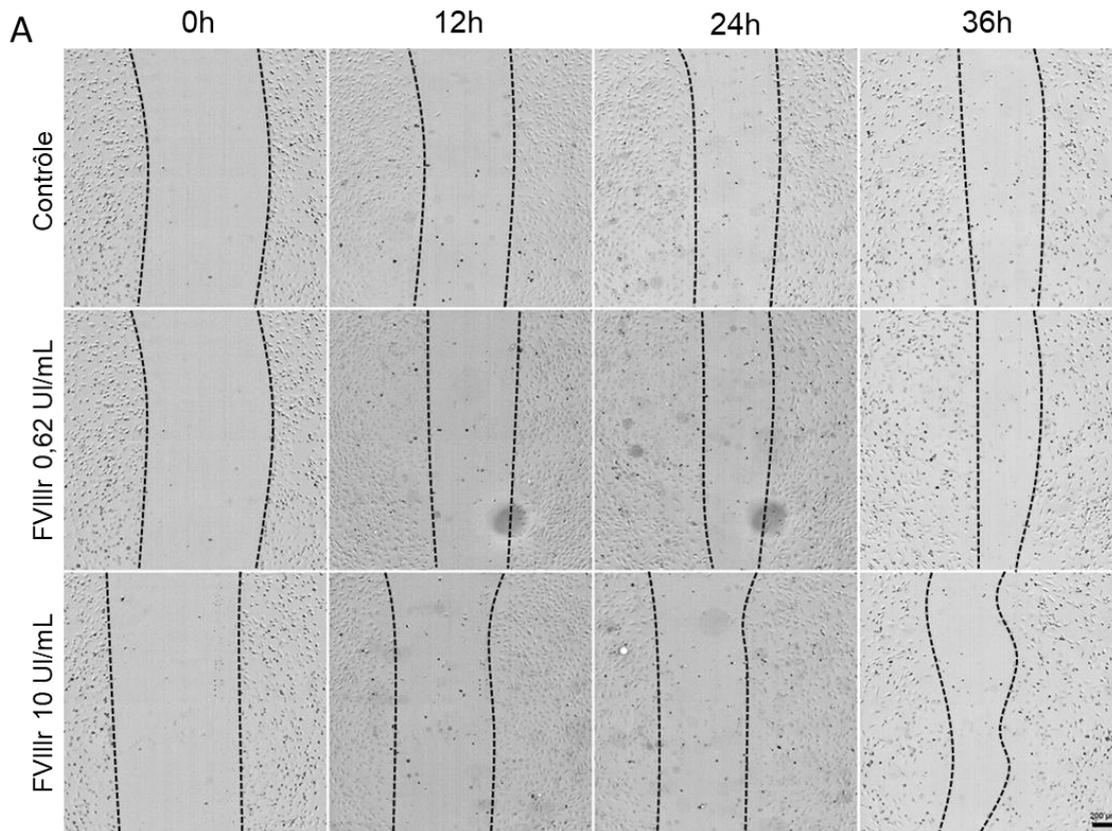


Figure 32 : Effet du FVIIIr sur la migration des cellules HUVEC. Les cellules HUVEC ont été marquées au Dil et ensemencées dans une plaque. Une fois la confluence obtenue, une blessure a été créée au centre du puits et le milieu EBM2 avec 5 % de SVF contenant 3,5 µM de mitomycine, avec ou sans 0,62 ou 10 UI/mL de FVIIIr a été ajouté. **A)** Une image est capturée toutes les 12h pendant 36h pour chaque condition. **B)** Le pourcentage de fermeture de la blessure a été calculé pour chaque condition, par rapport au temps 0h. Le graphique représente la moyenne de la fermeture des blessures en pourcentage ± SEM de deux répliques d'une expérience. **C)** La vitesse de migration en µm/h a été calculée pour chaque condition, à partir de la distance parcourue par les cellules HUVEC en 36h. Le graphique représente la moyenne des vitesses de migration ± SEM de deux répliques d'une expérience.

VI. Effets du FVIIIr sur le cytosquelette

Les filaments ou fibres d'actine (F-actine) sont un réseau dynamique dont le mouvement est souvent comparé à un tapis roulant (dépolymérisation à l'extrémité négative et polymérisation à l'extrémité positive). Ce réseau est situé sous la membrane plasmique, il définit la forme globale de la cellule et sa plasticité, gérant notamment les mécanismes de migration, d'endocytose, de division et de phagocytose (Pollard and Borisy, 2003; Svitkina, 2018). Ce cytosquelette est relié à la matrice extracellulaire par les adhérences focales, complexes protéiques permettant la signalisation et l'adhérence cellulaire. Ces structures sont souvent composées d'intégrines faisant le lien entre la matrice extracellulaire et le compartiment intracellulaire, composé de protéines comme la PAX (paxilline) ou les FAK (focal adhesion kinase). Les FAK sont des protéines intracellulaires à activité tyrosine-kinase, impliquées dans la signalisation médiée par les intégrines, et dont l'activation se caractérise notamment par la phosphorylation de sa tyrosine 397 (Quadri, 2012). Les PAX et les FAK sont étroitement liées dans les adhésions focales, puisque les PAX sont activées par les FAK. Comme les FAK, l'activation des PAX se caractérise par une phosphorylation (Bellis *et al.*, 1995).

Dans un premier temps, pour analyser l'activité des FAK, les cellules HUVEC ont été traitées 2h avec deux doses de FVIIIr (5 et 10 UI/mL) et une analyse par Western Blot a été réalisée, ciblant la phosphorylation Y397 des FAK (FAK-Y397). Après 2h de traitement, le FVIIIr induit une phosphorylation de la protéine FAK sur sa tyrosine 397, de manière dépendante de la dose (Figure 33).

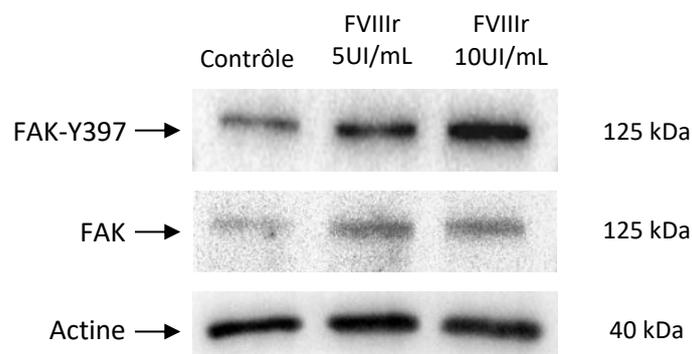


Figure 33 : Le FVIIIr induit la phosphorylation de FAK des cellules HUVEC. Les cellules HUVEC ont été déprivées en facteur de croissance une nuit en EBM2 1% de SVF, puis traitées 2h avec 5 ou 10 UI/mL de FVIIIr. Présentation d'une expérience représentative de trois, réalisées de manière indépendante.

Dans un deuxième temps, pour analyser le cytosquelette d'actine et l'activité des PAX, les cellules HUVEC ont étéensemencées sur des puces Cytoo™ Crossbow, permettant la polarisation des cellules (voir Matériel et Méthode). Après 18h d'incubation avec différentes doses de FVIIIr (0,62, 2,5 et 10 UI/mL), les cellules ont été fixées et un marquage des filaments d'actines (F-actine) et de la PAX phosphorylée (P-PAX) a été effectué.

Concernant le cytosquelette d'actine, nous observons une diminution significative de l'aire totale de marquage de la F-actine par cellule, au niveau de la zone de rétractation (fibres de stress). Cette diminution est de l'ordre de 20 % pour les doses 0,62 et 10 UI/mL de FVIIIr ($p < 0,01$), avec une aire de marquage totale de $737,8 \pm 53 \mu\text{m}^2$ et $721,6 \pm 32,6 \mu\text{m}^2$ respectivement, contre $930,8 \pm 55,7 \mu\text{m}^2$ sans traitement. A la dose 2,5 UI/mL, une diminution significative ($p < 0,05$) de 15,6 % est également observée ($785,5 \pm 29,8 \mu\text{m}^2$ après traitement) (Figure 34B graphique de gauche). Un effet plus marqué est constaté pour cette même concentration lorsque l'on observe l'aire de marquage moyenne par fibre. En effet, on constate une diminution de la surface moyenne d'une fibre de F-actine de 63,5 % après traitement à 2,5 UI/mL ($p < 0,001$) ($81,8 \pm 6,7 \mu\text{m}^2$ après traitement, contre $224,4 \pm 41,1 \mu\text{m}^2$ sans traitement). Concernant les doses 0,62 et 10 UI/mL, une baisse de l'ordre de 45 % est observée après traitement, avec une aire de marquage de $126,2 \pm 28,7 \mu\text{m}^2$ et $122,7 \pm 21,6 \mu\text{m}^2$ respectivement ($p < 0,05$) (Figure 34B, graphique de droite).

Au niveau de la zone de protrusion où se forment les lamellipodes, l'aire totale de marquage de la F-actine par cellule est significativement diminuée, de manière plus importante à la concentration à 0,62 UI/mL de FVIIIr ($p < 0,001$). En effet, la dose 0,62 UI/mL induit une diminution significative de 33,7% ($885,4 \pm 97 \mu\text{m}^2$ après traitement, contre $1335,8 \pm 101 \mu\text{m}^2$ sans traitement), tandis que les doses 2,5 et 10 UI/mL induisent une diminution significative ($p < 0,05$) d'environ 18 %, ($1119,8 \pm 50,9 \mu\text{m}^2$ et $1071,7 \pm 54,7 \mu\text{m}^2$ respectivement) (Figure 34C, graphique de gauche). Lorsque l'on s'intéresse à l'aire de marquage moyenne par fibre de cette zone, on observe une diminution significative ($p < 0,01$, et $p < 0,001$) de la surface d'une fibre d'actine d'environ 60% quel que soit la concentration testée, avec une aire de marquage de $155,9 \pm 49,9 \mu\text{m}^2$ sans traitement, contre de $57,9 \pm 9,7 \mu\text{m}^2$, $60,2 \pm 11,1$ et $63,7 \pm 11,8$ après traitement par respectivement 0,62, 2,5 et 10 UI/mL de FVIIIr (Figure 34C, graphique de droite).

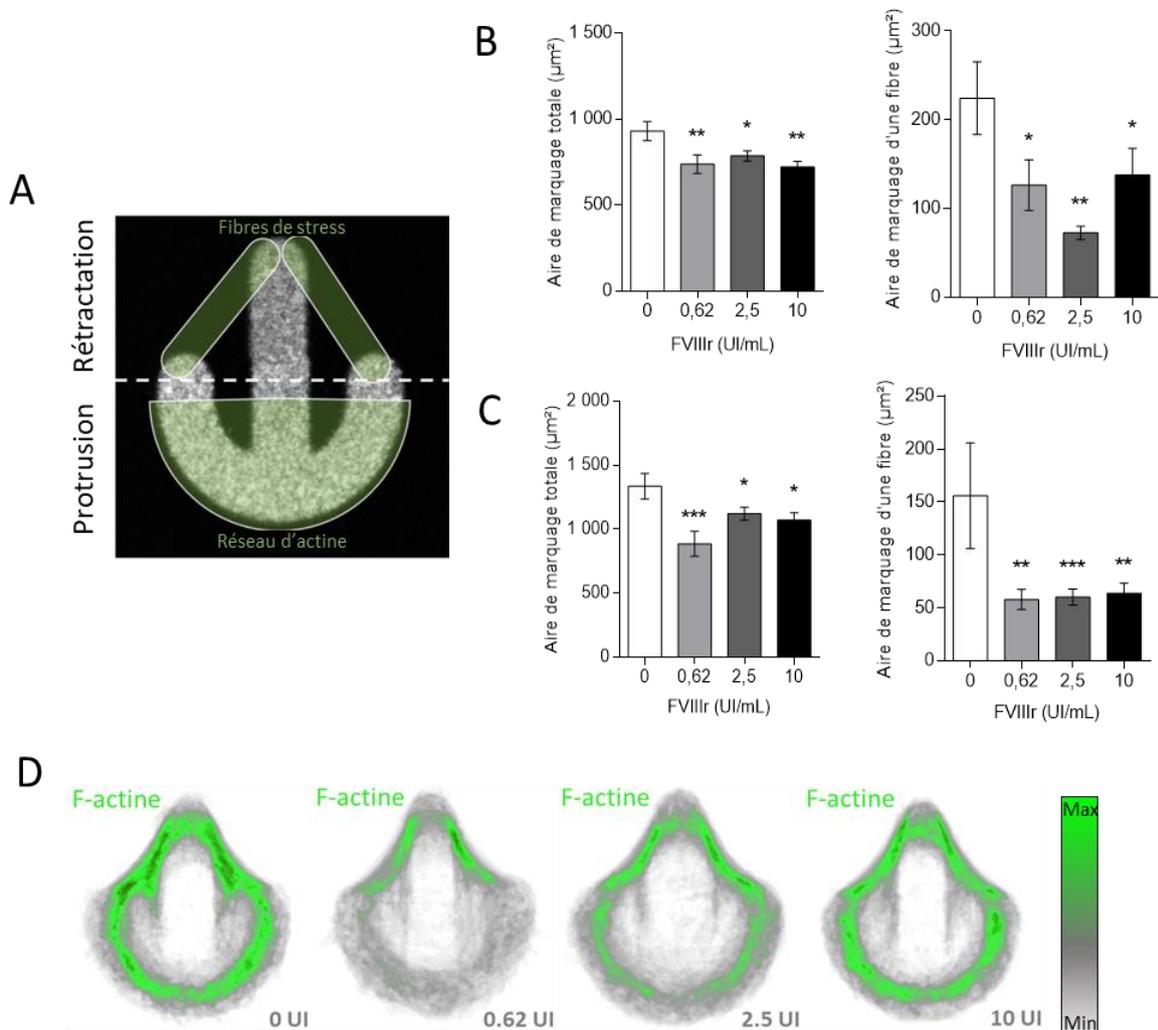


Figure 34 : Le FVIIIr modifie l'organisation du cytosquelette d'actine. **A)** Schéma explicatif des zones analysées. **B)** Graphiques correspondant à l'analyse de la zone de rétractation, où se forment les fibres de stress et **C)** graphiques correspondant à l'analyse de la zone de rétractation, où se forment les lamellipodes. Quantification de l'aire de marquage des F-actines par cellule : aire de l'ensemble des fibres mesurées par cellules (aire totale), et aire par fibre en μm^2 . Les graphiques représentent les moyennes de ces aires \pm SEM. $n \geq 23$ cellules par condition, ANOVA une voie * $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$. **D)** Images normalisées du marquage des fibres d'actine en fonction des différentes doses de FVIIIr, visualisation de l'intensité de marquage moyenne.

Concernant la phosphorylation de la PAX, nous remarquons une diminution significative ($p < 0,01$) de 26,2 % de l'aire totale de P-PAX dans la zone de rétractation, après traitement avec 10 UI/mL de FVIIIr (aire totale de P-PAX de $89,7 \pm 4,8 \mu\text{m}^2$ sans traitement, contre $66,2 \pm 3,6 \mu\text{m}^2$ après traitement par 10 UI/mL de FVIIIr). L'aire moyenne, le nombre et le périmètre de P-PAX diminue légèrement (de manière non significative) après traitement à cette concentration, ce qui contribue à diminuer significativement l'aire totale (Figure 35B). A la concentration 0,62 UI/mL, le nombre d'évènements phosphorylés est significativement ($p < 0,05$) diminué de 20,6 % (nombre d'évènement de $32 \pm 1,6$ sans traitement, contre $25,4 \pm 1,4$ après traitement par 0,62 UI/mL de FVIIIr) (Figure 35B).

Dans la zone de protrusion, à l'inverse de la zone de rétractation, nous remarquons une augmentation significative ($p < 0,0001$) de 141 % du nombre d'évènements phosphorylés pour la condition 0,62 UI/mL FVIIIr en comparaison au contrôle sans FVIIIr (nombre d'évènement de $35,3 \pm 1,9$ sans traitement, contre $85,2 \pm 5$ après traitement par 0,62 UI/mL de FVIIIr) (Figure 35C). Cette augmentation est associée à une baisse significative ($p < 0,05$) de 62,5% de l'aire moyenne des évènements phosphorylés ($12 \pm 1,7 \mu\text{m}^2$ sans traitement, contre $4,5 \pm 0,5 \mu\text{m}^2$ après traitement à 0,62 UI/mL de FVIIIr) (Figure 35C), ce qui rend difficile la mise en évidence de l'effet sur l'image de référence associée en Figure 35E. Pour les autres concentrations testées, aucune différence significative n'est observée.

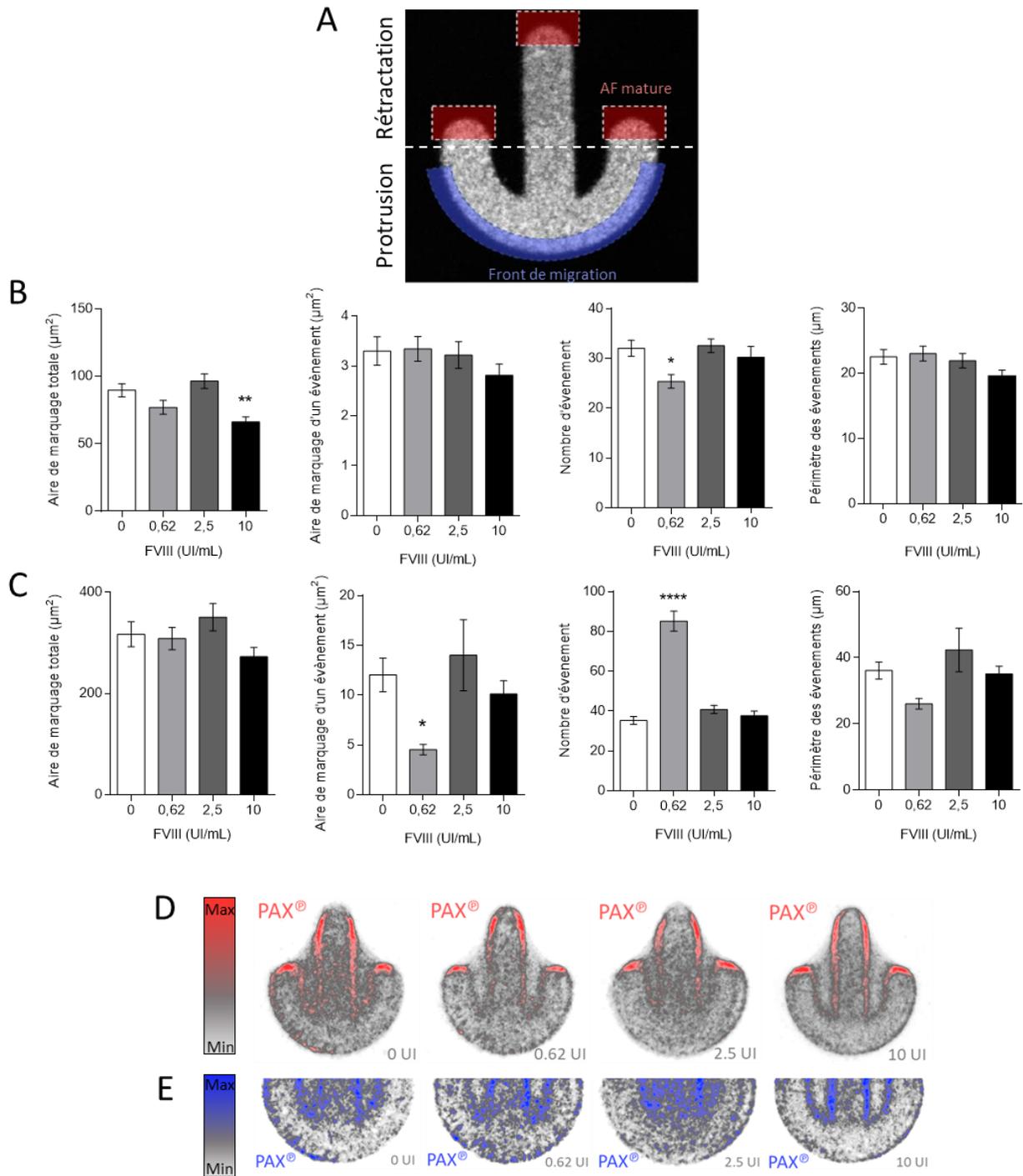


Figure 35 : Le FVIIIr modifie la phosphorylation de la paxilline. **A)** Schéma explicatif des zones analysées. **B)** Graphiques correspondant à l'analyse de la zone de rétractation, où se forment les adhésions focales matures et **C)** graphiques correspondant à l'analyse de la zone de protrusion. Quantification de l'aire du marquage P-PAX par cellules : aire de l'ensemble des événements phosphorylés par cellules (aire totale), aire par événement en μm^2 , nombre d'évènement comptés, et leur périmètre en μm . Quantification de l'aire du marquage P-PAX (aire totale et aire moyenne en μm^2), du nombre d'évènement comptés, et leur périmètre en μm . Les graphiques représentent les moyennes de ces aires \pm SEM. $n \geq 65$ cellules par condition, ANOVA une voie * $< 0,05$, ** $< 0,01$, **** $< 0,0001$. **D)** et **E)** Images normalisées du marquage de la P-PAX en fonction des différentes doses de FVIIIr et de la zone analysée (rétractation en rouge, protrusion en bleu). Visualisation de l'intensité de marquage moyenne.

Chapitre 3 : Effets du FVIIIr sur le système immunitaire (via l'endothélium)

L'analyse du RNAseq et du profil protéique montre que le FVIIIr augmente l'expression de molécule d'adhérence cellulaire comme ICAM1, VCAM1 et l'E-selectine, impliquées dans la transmigration leucocytaire. L'E-selectine est impliquée dans les processus de « roulement » et « tethering », c'est-à-dire qu'elle permet de ralentir la vitesse des leucocytes à la surface des cellules endothéliales et d'augmenter leur adhérence (Jones *et al.*, 2015). ICAM1 et VCAM1 vont permettre aux leucocytes activés d'adhérer fortement à l'endothélium, et favorisent leur transmigration paracellulaire (Greenwood *et al.*, 1995; Lehmann *et al.*, 2003).

Afin d'étudier le phénomène de transmigration, nous avons analysé les effets du FVIIIr sur l'adhérence de monocytes à un endothélium d'HUVEC en condition de flux, la transmigration des monocytes à travers un endothélium d'HUVEC en condition statique et la perméabilité de cet endothélium.

I. Le FVIIIr augmente le « roulement » et l'adhérence des monocytes sur un endothélium de cellules HUVEC en condition de flux

Dans ces expériences sous flux physiologique, trois conditions ont été testées : 1) une condition contrôle, sans traitement au FVIIIr ; 2) une condition où les monocytes ont été traités au FVIIIr à 10 UI/mL ; 3) une condition où l'endothélium a été traité au FVIIIr à 10 UI/mL.

Dans un premier temps, nous avons analysé le phénomène de « roulement » et de « tethering » de monocytes sur un endothélium d'HUVEC. Cette analyse a été effectuée lors de la première minute et demi de perfusion des monocytes, et sur un champ au centre de la chambre. Après 24h de traitement de l'endothélium avec 10 UI/mL de FVIIIr, une augmentation significative ($p < 0,0001$) de 125 % du nombre de monocytes en « roulement » sur un champ par seconde est observée ($6,8 \pm 0,2$ monocytes / sec en l'absence de traitement, contre $15,3 \pm 0,24$ après traitement de l'endothélium). Une augmentation significative ($p < 0,0001$) de 108,8 % est également observée après 10min de traitement des monocytes au FVIIIr ($14,2 \pm 0,22$ monocytes / sec) (Figure 36A). Concernant le phénomène de « tethering », le FVIIIr a tendance

à augmenter ce phénomène bien que les analyses statistiques ne montrent pas de significativité (Figure 36A).

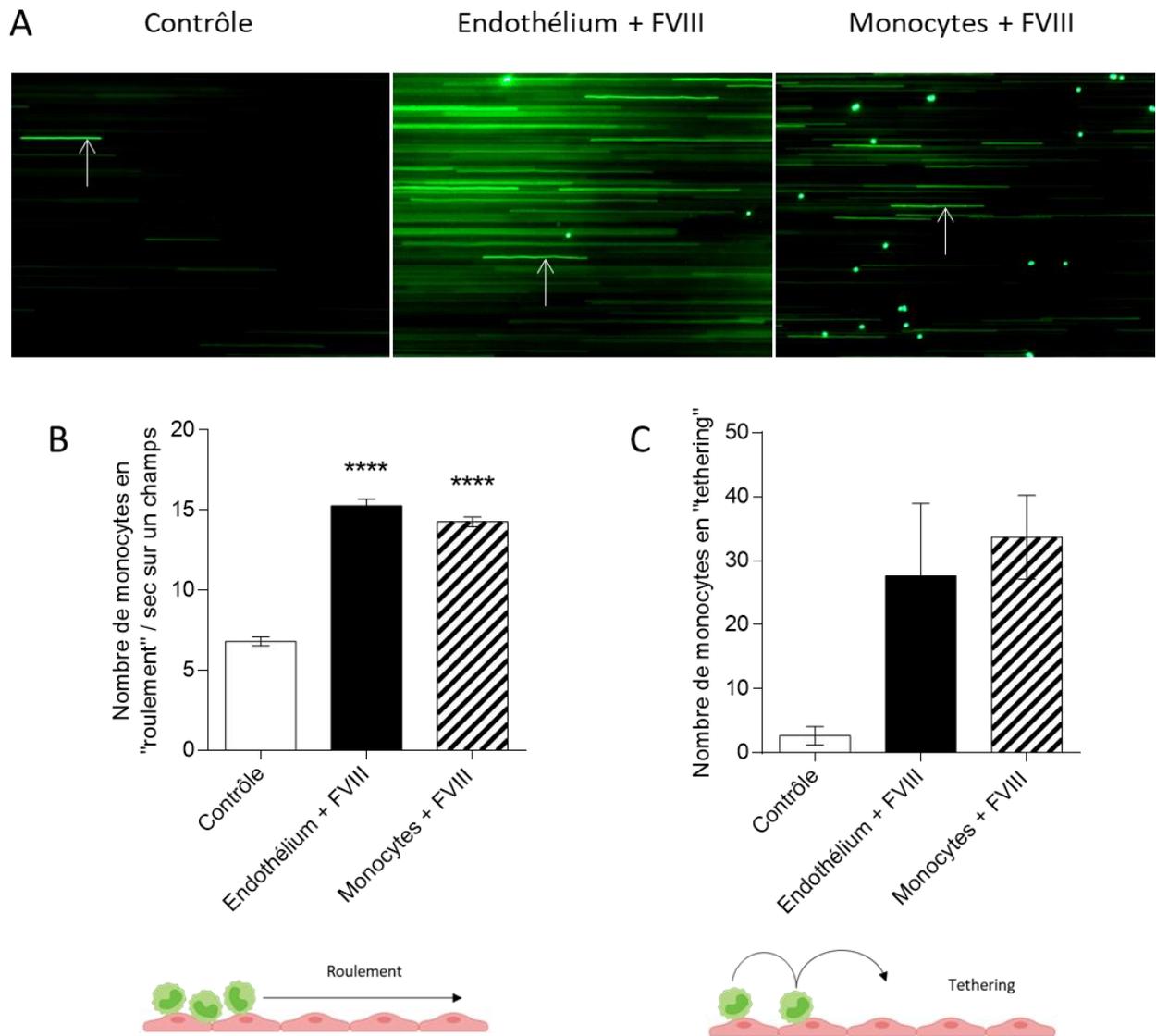


Figure 36 : Le FVIIIr augmente le « roulement » des monocytes sur un endothélium de cellules HUVEC. Après traitement ou non des monocytes ou de l'endothélium de cellules HUVEC, les monocytes ont été perfusés sur l'endothélium à 0,1mL/min. Une image par seconde a été capturée pendant 1,5min sur un champ central. **A)** Images des monocytes en « roulement » après 45 sec de perfusion dans les différentes conditions. Les flèches montrent les monocytes en « roulement ». **B)** Le nombre de monocytes adhérents par seconde sur ce champ a été compté. Le graphique représente la moyenne \pm SEM de ≥ 257 images par condition. Test ANOVA une voie, **** $< 0,0001$. **C)** Le nombre total de monocytes en « tethering » sur ce champ pendant 1,5min a été compté. Ce graphique représente la moyenne \pm SEM.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé l'adhérence des monocytes pendant 8min de perfusion sur l'endothélium, et sur un champ au centre de la chambre. L'endothélium traité 24h avec 10 UI/mL de FVIIIr ne permet pas d'augmenter significativement l'adhérence des monocytes pendant la cinétique (Figure 37A), ni la vitesse d'adhérence (Figure 37B). L'adhérence des monocytes à la fin de la cinétique est 4,5 fois plus importante ($p < 0,05$) après leur traitement au FVIIIr, par rapport à la condition sans traitement ($486,7 \pm 36,5$ monocytes adhérents après traitement, contre $109 \pm 51,8$ en l'absence de FVIIIr) (Figure 37A). De même, la vitesse d'adhérence est 4,2 fois plus importante ($p < 0,05$) après traitement des monocytes au FVIIIr (pente de $84,5 \pm 6,6$ après traitement, contre $20,1 \pm 9,1$ sans traitement) (Figure 37B).

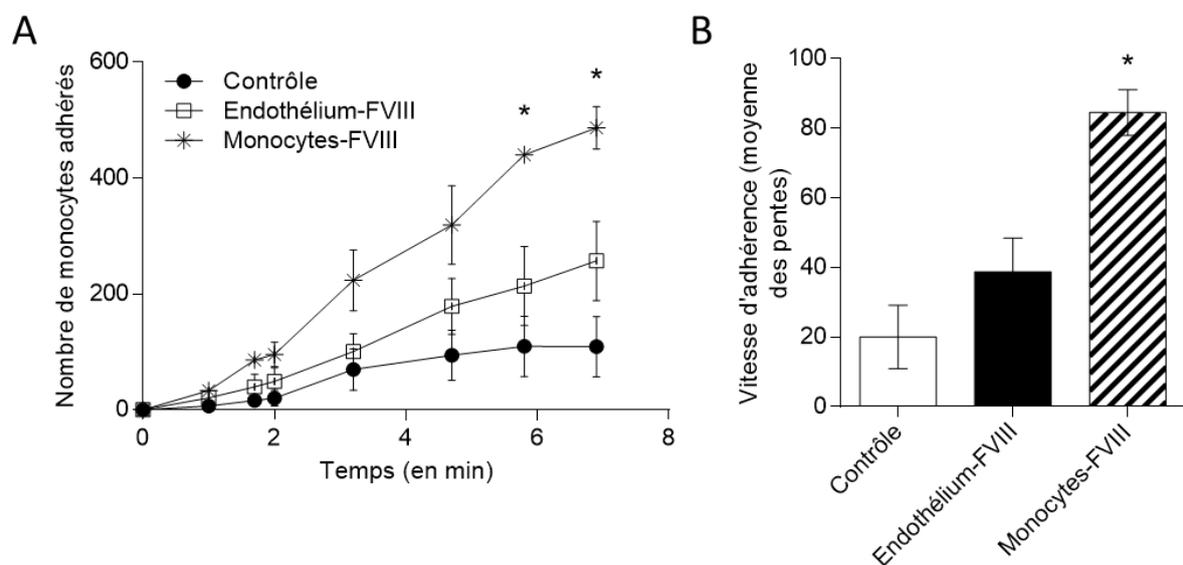


Figure 37 : Le FVIIIr augmente l'adhérence et la vitesse d'adhérence des monocytes sur un endothélium de cellules HUVEC. Après traitement ou non des monocytes ou de l'endothélium d'HUVEC, les monocytes ont été perfusés sur l'endothélium à 0,1mL/min. Des images ont été régulièrement capturées pendant 7 min sur un champ central. **A)** Le nombre total de monocytes adhérents sur ce champ est compté à chaque temps. Ce graphique expose la cinétique d'adhérence, représenté par la moyenne \pm SEM du nombre de monocytes adhérents. Un test de Kruskal-Wallis est effectué pour chaque temps, $* < 0,05$. **B)** La pente correspondant à la cinétique d'adhérence est calculée pour chaque expérience réalisée. Ce graphique représente la moyenne \pm SEM des pentes.

Une fois la perfusion terminée, 28 images ont été capturées, représentant l'ensemble de la chambre (voir Matériel et Méthode, Figure 12). Le nombre de monocytes ayant adhéré a été compté. Le FVIIIr induit une augmentation significative ($p < 0,0001$) de l'adhérence des monocytes par champ (Figure 38B). En effet, après 24h de traitement de l'endothélium au FVIIIr, 1,8 fois plus de monocytes ont adhéré à cette endothélium ($279,2 \pm 17,9$ monocytes adhérents par champ après traitement, contre $151,5 \pm 10,5$ sans traitement). Dans une plus grande mesure, 3,5 fois plus de monocytes ont adhéré à l'endothélium lorsque ceux-ci ont été traités au FVIIIr ($535,9 \pm 26,8$ monocytes adhérents par champ après traitement).

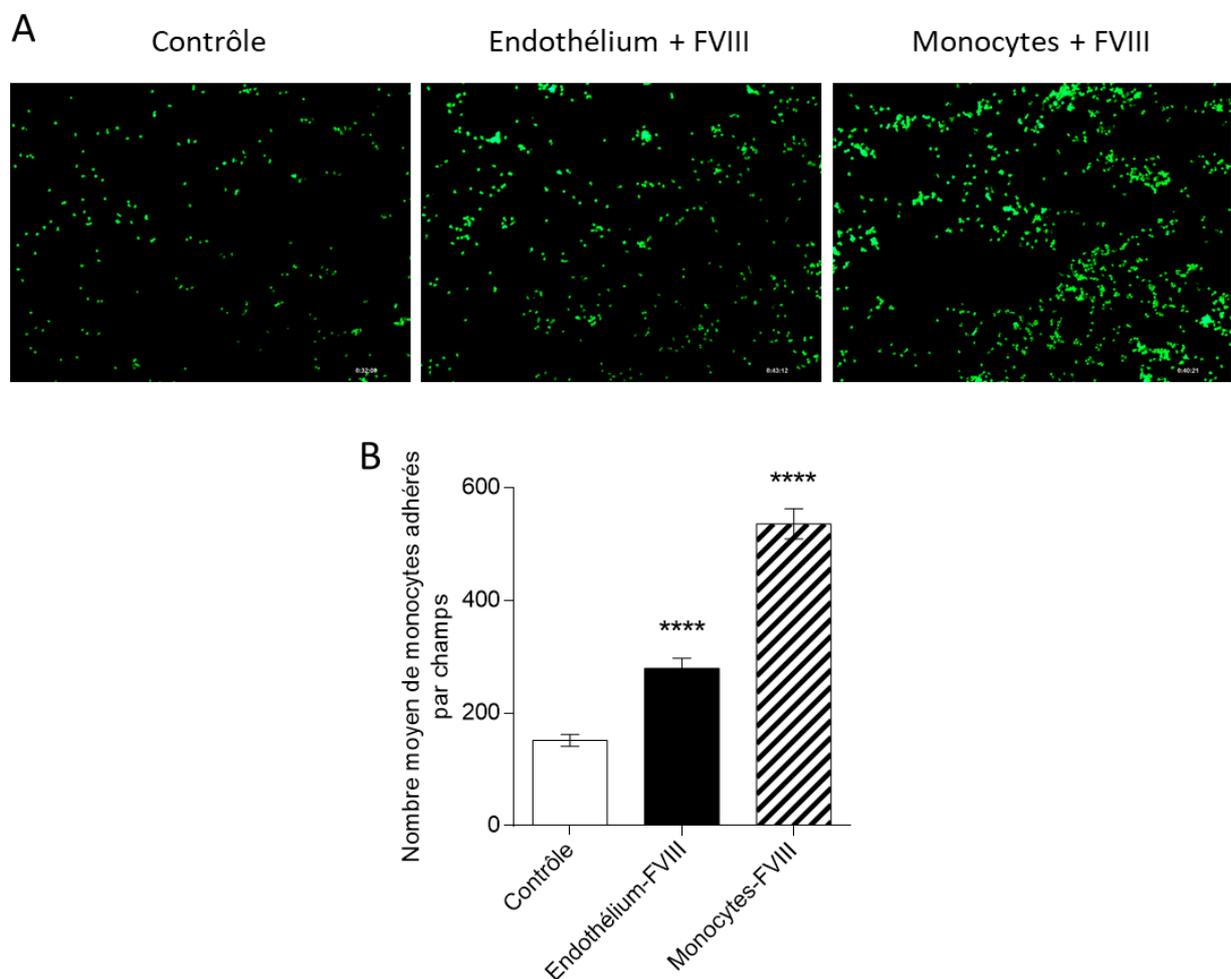


Figure 38 : Le FVIIIr augmente l'adhérence des monocytes sur un endothélium de cellules HUVEC. Après la perfusion des monocytes traités ou non au FVIIIr, sur un endothélium traité ou non au FVIIIr, des images ont été capturées sur l'ensemble de la chambre (28 champs). **A)** Image des monocytes adhérents sur l'endothélium dans les différentes conditions, au centre de la chambre. **B)** Le nombre de monocytes adhérents sur chaque champ a été compté (84 champs par condition). Ce graphique représente le nombre moyen de monocytes adhérents par champs \pm SEM. Un test ANOVA une voie est effectué **** $< 0,0001$.

Pour finir, la force d'adhérence des monocytes a été testée par augmentation du débit, et donc des forces de cisaillement. Une image a été capturée avant le début de l'expérience, au centre de la chambre (même positionnement que pour la cinétique d'adhérence). Puis un débit a été généré pendant une minute, et une image a été capturée avant de passer au débit suivant. Les résultats ne montrent pas de différence significative dans la résistance aux forces de cisaillement, après traitement de l'endothélium ou des monocytes avec 10 UI/mL de FVIIIr (Figure 39).

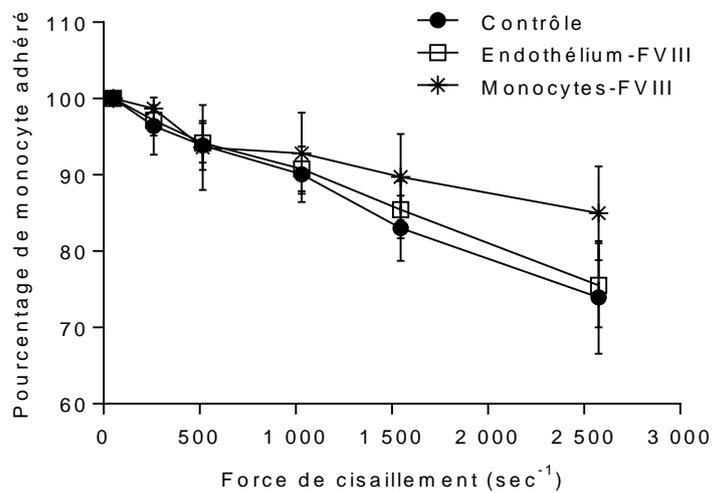


Figure 39 : Le FVIIIr ne modifie pas la force d'adhérence des monocytes sur un endothélium de cellules HUVEC. Résistance aux forces de cisaillement, représenté par le pourcentage de monocytes restés adhérents sur l'endothélium après 1 min sous flux à différentes forces de cisaillement. Le nombre de monocytes adhérents sur un champ au centre de la chambre, avant le test de résistance, correspond à 100%. Après chaque débit testé, le nombre de monocytes adhérents restant a été compté, et le pourcentage a été calculé par rapport au nombre initial. Le graphique représente la moyenne \pm SEM de ces pourcentages.

II. Le FVIIIr semble augmenter la perméabilité vasculaire

Afin de mesurer la perméabilité vasculaire, nous avons analysé la diffusion du Dextran-FITC à travers un endothélium d'HUVEC, traité ou non avec 4 concentrations de FVIIIr (2,5, 5, 10 et 20 UI/mL) ou 10 ng/mL de TNF α (contrôle positif). Aux concentrations 2,5 et 5 UI/mL, nous n'observons pas de différence de la perméabilité vasculaire par rapport au contrôle sans traitement (Figure 40A et B). Aux concentrations 10 et 20 UI/mL, le FVIIIr augmente d'environ 75 % la perméabilité vasculaire par rapport au contrôle sans traitement, de manière équivalente au contrôle positif (10 ng/mL de TNF α). En effet, après 20h de traitement aux doses 10 et 20 UI/mL, la concentration de Dextran-FITC dans le sous-compartiment est respectivement de $93,1 \pm 9,5$ μ g/mL et $99,1 \pm 7,1$ μ g/mL ; lorsque cette concentration est de $54,4 \pm 10,1$ μ g/mL sans traitement et $109,1 \pm 16,4$ μ g/mL après un traitement au TNF α (Figure 40C et D).

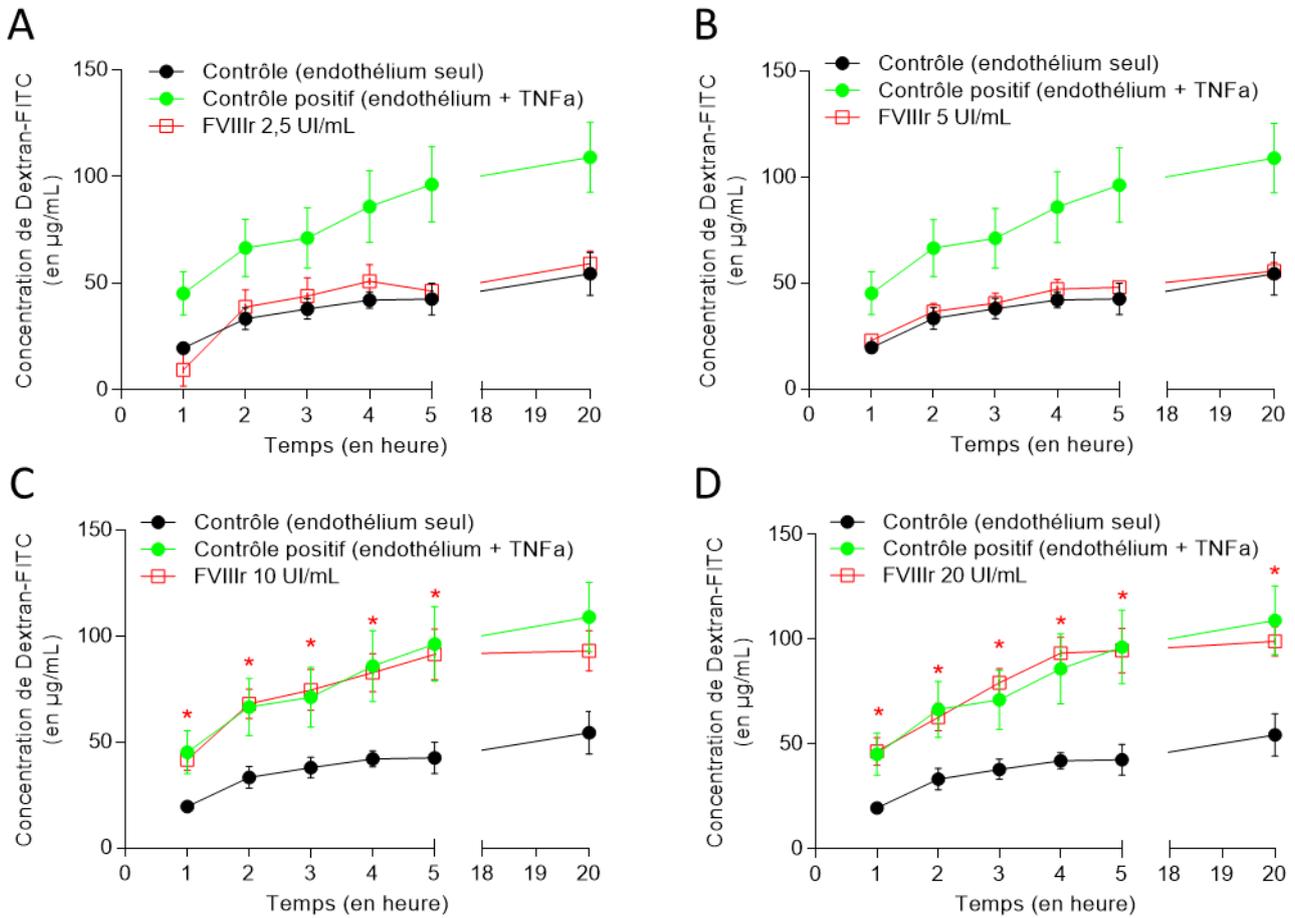


Figure 40 : Le FVIIIr augmente la perméabilité d'un endothélium d'HUVEC. Les cellules HUVEC ont été ensemencées sur un insert préalable recouvert de fibronectine. Une fois l'endothélium formé, les différentes doses de FVIIIr **A)** 2,5 UI/mL, **B)** 5 UI/mL, **C)** 10 UI/mL, **D)** 20 UI/mL ou 10 ng/mL de TNF α ont été déposés dans la partie supérieure de l'insert, avec une solution de 250 μ g/mL de FITC-Dextran 70 kDa. Le sous-compartiment a été récupéré toutes les heures pendant 5h, puis après une nuit (20h). La fluorescence a été mesurée et la concentration en Dextran-FITC a été calculée. Les courbes représentent les moyennes de la concentration en Dextran-FITC \pm SEM d'une expérience réalisée en 6 réplicats. Test Kruskal-Wallis, * < 0,05

La perméabilité vasculaire est contrôlée notamment par les jonctions serrées, permettant le maintien des cellules endothéliales entre elles, assurant ainsi leur rôle de barrière, essentiel à l'entrée et la sortie des molécules, des ions et des cellules immunitaires. Plusieurs protéines de jonctions sont impliquées dans le maintien de la barrière endothéliale, dont les protéines ZO (Zonula occludens). Nous avons alors analysé l'expression de la protéine ZO-1 à la jonction des cellules endothéliales. Pour cela, les cellules HUVEC ont été ensemencées sur une puce Cytoo® Arena (voir Matériel et Méthode) afin de former un endothélium. Après 48h de traitement à 5 UI/mL de FVIIIr, les résultats montrent une diminution significative ($p < 0,0001$) de 62,4 % de l'aire de marquage totale de ZO-1 par disque d'endothélium comparativement au contrôle (aire de $394,16 \pm 20,35 \mu\text{m}^2$ après traitement, contre $1049,14 \pm 43,29 \mu\text{m}^2$ sans traitement) (Figure 41B). Pour cette même concentration, l'aire de marquage par évènement est significativement ($p < 0,05$) diminuée de 14,1 % ($0,461 \pm 0,011 \mu\text{m}^2$ après traitement, contre $0,537 \pm 0,016 \mu\text{m}^2$ sans traitement) (Figure 41C). Ces résultats confirment ceux de l'analyse du profil protéique (Figure 28). Le nombre d'évènement est également diminué en présence de 2,5 ($p < 0,001$) et 5 UI/mL ($p < 0,0001$) de FVIIIr, de 26,5 % et 57,2% respectivement ($1465,5 \pm 85,02$ et $853,67 \pm 37,28$ évènements après 2,5 et 5 UI/mL de traitement respectivement, contre $1994,79 \pm 98$ évènements sans traitement) (Figure 41D). Le FVIIIr à 10 UI/mL ne modifie pas l'expression de ZO-1 dans ces conditions.

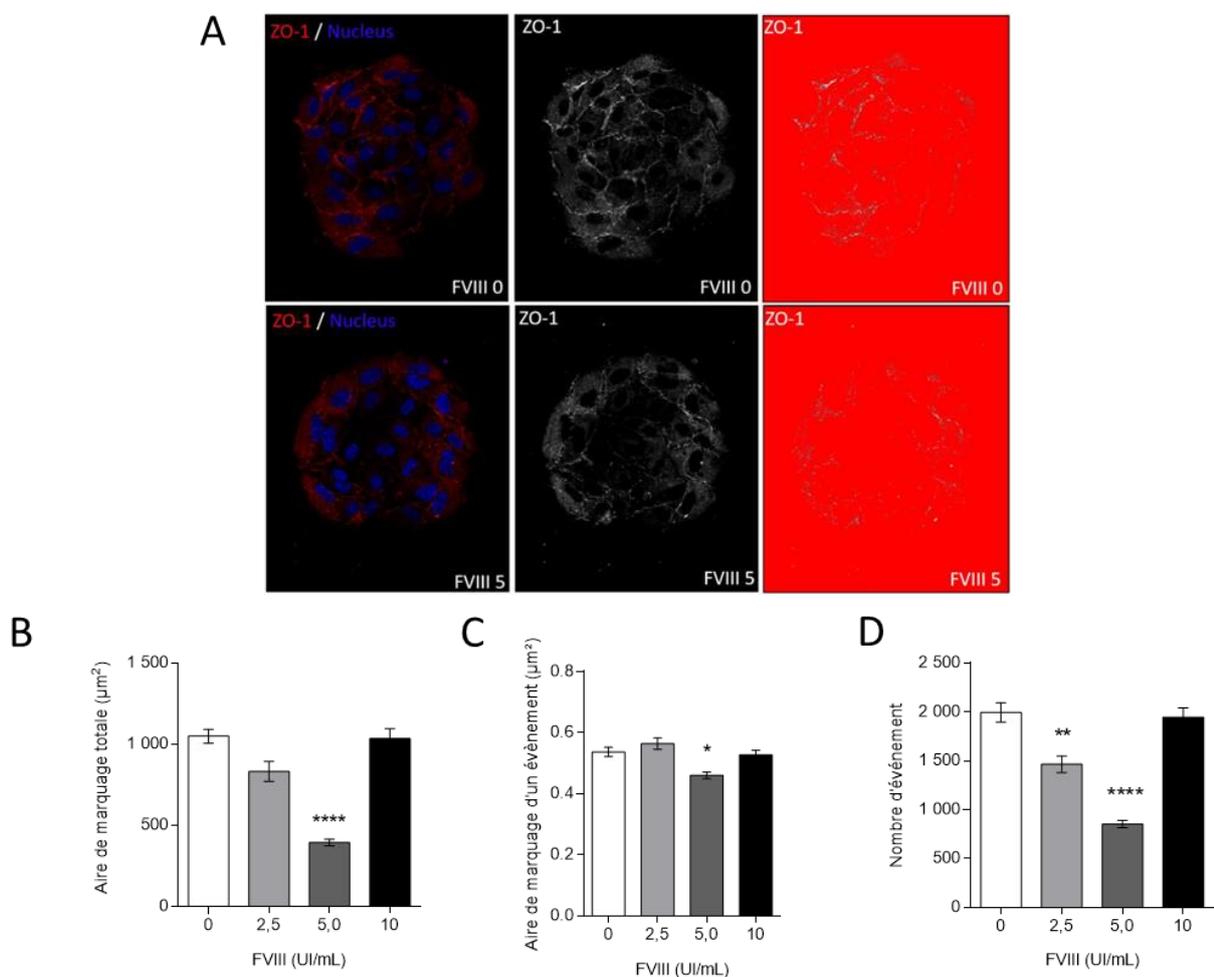


Figure 41 : Le FVIIIr diminue l'expression de ZO-1 à la surface d'HUVEC formant un endothélium. A) Marquage ZO-1 dans les cellules endothéliales traitées ou non au FVIIIr, ZO-1 / noyau à gauche, ZO-1 seul au milieu, aperçu du seuillage pour la quantification de la surface de ZO-1, en niveau de gris sur fond rouge à droite. **B)** Quantification de l'aire de marquage totale de ZO-1 par disque (μm^2), **C)** l'aire de marquage par événement (μm^2) et **D)** nombre d'évènements. $n = 24$ disques par condition, test de Kruskal-Wallis * $< 0,05$, ** $< 0,01$ et **** $< 0,0001$.

III. Le FVIIIr augmente la transmigration des monocytes à travers un endothélium d'HUVEC

La transmigration des monocytes à travers un endothélium de cellule HUVEC a été étudiée en présence ou non de 10 UI/mL de FVIIIr, après 4,5h ou 20h d'incubation. Les résultats sont représentés par donneur, et seuls les monocytes du donneur 4 ont été testés au deux temps d'incubation (Figure 42). Une hétérogénéité entre les donneurs est observée. Après 4,5h de traitement à la dose 0,62 UI/mL, on constate soit une augmentation de la transmigration des monocytes par rapport au contrôle sans traitement (de 58 % et 14 % pour les donneurs 1 et 2 respectivement) ; soit une absence d'effet (taux d'augmentation de 1,08 et 0,96 pour les donneurs 3 et 4). De la même manière, après 4,5h de traitement à la dose 10 UI/mL, on observe soit une augmentation de la transmigration des monocytes par rapport au contrôle (35 % et 34 % pour les donneur 2 et 4), soit une absence d'effet (taux modification de 0,93 et 1,05 pour le donneur 1 et 3) (Figure 42A).

Après 20h d'incubation des monocytes du donneur 4 en présence de 0,62 UI/mL de FVIIIr, leur transmigration augmente 16,7 % par rapport à un temps d'incubation plus court (taux d'augmentation de 0,96 après 4,5h de traitement, et 1,12 après 20h). A cette même dose, les monocytes du donneur 5 transmigrent 2,8 fois plus par rapport au contrôle ; et ceux du donneur 6 transmigrent 1,16 fois plus par rapport contrôle. Après 20h d'incubation à la dose 10 UI/mL, on constate une légère augmentation de la transmigration des monocytes chez chaque donneur : taux d'augmentation de 1,38 pour le donneur 4 ; 1,25 pour le donneur 5 et 1,13 pour le donneur 6 (Figure 42B).

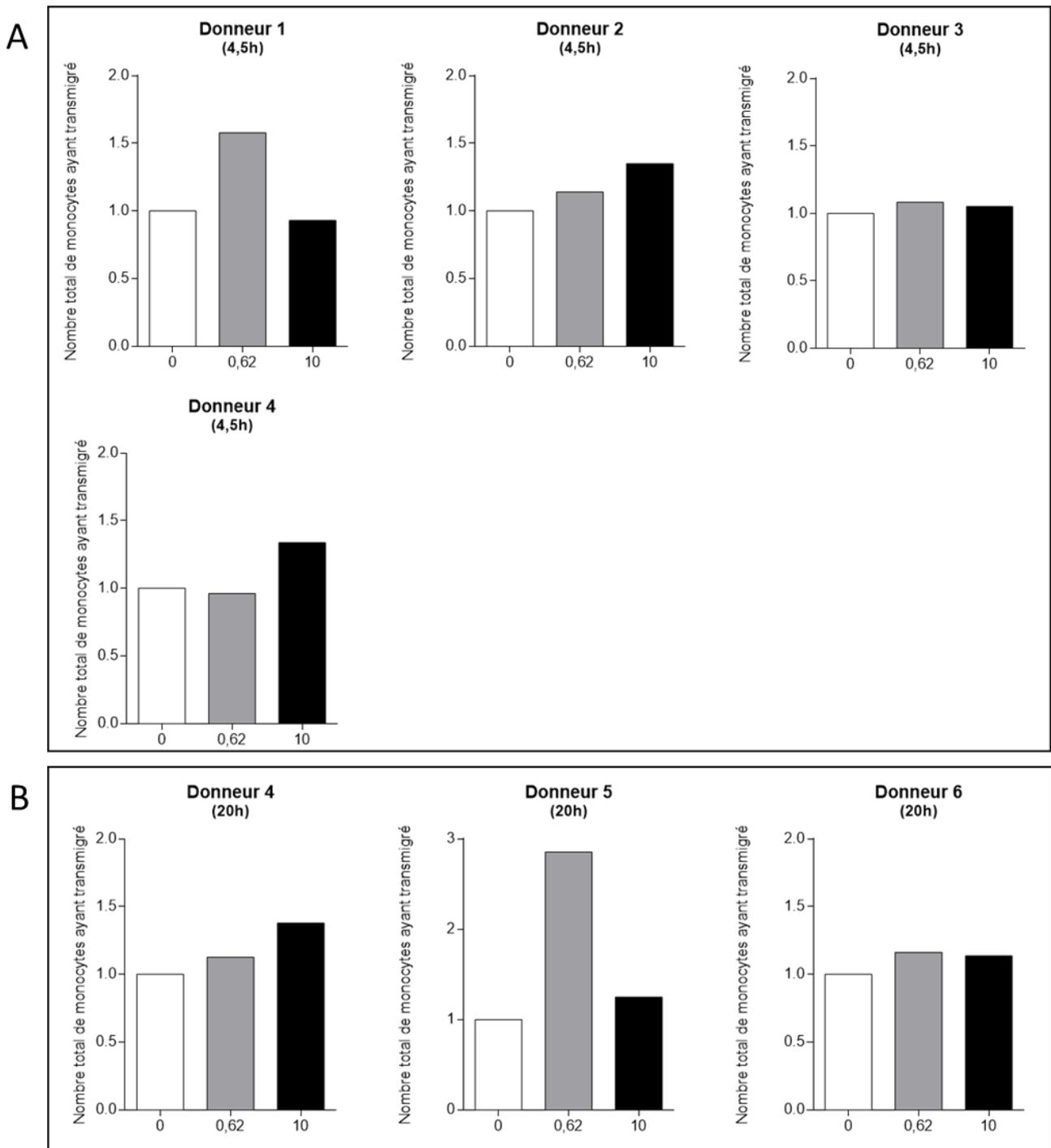


Figure 42 : Le FVIII augmente la transmigration monocyttaire à travers un endothélium d'HUVEC. Les cellules HUVEC ont été ensemencées sur un insert recouvert de collagène. Une fois l'endothélium formé, le FVIIIr à 10 UI/mL ainsi que les monocytes ont été ajoutés dans le compartiment supérieur. Après 4h30 (A) ou 20h (B) d'incubation, le sous compartiment contenant les monocytes ayant transmigré a été récupéré et les monocytes ont été comptés par cytométrie en flux. Le nombre de monocyte ayant transmigré est exprimé en taux de modification par rapport au contrôle. Les graphiques représentent ces taux par expérience, en fonction des différents donneurs de monocytes

DISCUSSION

L'objectif de ma thèse a été d'étudier les fonctions biologiques du FVIII, sur des cellules endothéliales et des monocytes, dans le but de mieux comprendre ses activités extra-coagulantes.

Angiogenèse, migration et adhérence cellulaire

L'analyse transcriptomique des cellules HUVEC par RNAseq montre une modulation de ce transcriptome par le FVIIIr *in vitro*. L'analyse fonctionnelle de cette expérience révèle un enrichissement d'un certain nombre de fonctions biologiques : « morphogenèse tubulaire » ou « développement tubulaire », associées à un rôle potentiel du FVIIIr dans la formation de tubes vasculaires ; « régulation de la migration cellulaire », en lien avec un rôle possible du FVIIIr dans la migration des cellules endothéliales ; ainsi que « cytosquelette d'actine » et « adhérence focale ». Toutes ces fonctions apparaissent liées entre elles, puisque la migration, nécessaire à la néo-angiogenèse, est dépendante de la formation des adhérences focales et du remaniement du cytosquelette d'actine (Hu et al., 2014; Yang et al., 2004).

Angiogenèse et migration

Nous avons montré que le FVIIIr induit la formation de tubes vasculaires des cellules ECFC, ainsi que la migration des cellules HUVEC.

Chez les patients hémophiles A souffrant d'arthropathie hémophilique, une augmentation de l'angiogenèse a été observée au niveau des membranes synoviales. Cette néo-angiogenèse a été associée à une augmentation de facteurs pro-angiogènes, comme le VEGF-A, la MMP-9 (matrix metallopeptidase 9) et le SDF-1 (Acharya *et al.*, 2011; Zetterberg *et al.*, 2014). Acharya *et al.*, montrent également que les patients hémophiles n'ayant pas d'antécédents d'hémarthrose ne présentent pas d'augmentation des taux sériques de VEGF-A, MMP-9 et SDF-1, contrairement aux patients ayant des antécédents d'hémarthrose (Acharya *et al.*, 2011). Cette néo-angiogenèse synoviale observée chez les patients hémophiles peut paraître contraire aux effets du FVIIIr que nous avons observés en faveur d'un effet pro-angiogène. Cependant, les conditions expérimentales que nous avons utilisées ne miment pas le contexte inflammatoire présent des articulations atteintes. Par ailleurs, les patients hémophiles

présentent un déficit fonctionnel et/ou quantitatif de FVIII en lien avec des taux variables de FVIII circulant qui sont en adéquation avec nos observations *in vitro*. Nos analyses montrent une vitesse de migration plus importante à une concentration faible de FVIIIr (0,62 UI/mL). La migration étant nécessaire à la néo-angiogenèse (Yang *et al.*, 2004), il serait intéressant d'analyser l'effet de doses plus faibles de FVIIIr sur celle-ci. Le FVIIIr pourrait également renforcer l'effet pro-angiogène dépendant du VEGF. Le plasma de patients hémophiles souffrant d'hémarthrose induit une migration des cellules endothéliales, inhibée partiellement par un anticorps bloquant dirigé contre le VEGF et/ou le SDF-1, indiquant que d'autres facteurs sont impliqués dans cette migration cellulaire (Acharya *et al.*, 2011).

Une néo-angiogenèse synoviale est également observée chez les souris déficientes en FVIII. Cette néo-angiogenèse est associée à un remodelage vasculaire anormal, caractérisé par des vaisseaux larges et irréguliers, retrouvés également chez les patients hémophiles (Bhat *et al.*, 2015; Kidder *et al.*, 2016b). L'absence de FVIII pourrait donc être responsable d'une néo-angiogenèse anormale, ce qui renforce l'hypothèse d'une implication du FVIII dans la bonne structuration des vaisseaux.

Adhérence cellulaire

L'adhérence cellulaire, comme la migration, est le résultat de la coopération des différents acteurs permettant la formation des structures d'adhérence. La mise en place, le maintien et la dynamique de ces structures au cours des étapes d'étalement ou de la migration cellulaire sont extrêmement régulés. L'étude de l'adhérence des cellules HUVEC par la technique xCelligence apporte des informations sur la surface de contact entre les cellules et un support lors de l'étalement cellulaire. L'étalement cellulaire s'effectue en plusieurs phases : la phase initiale, la phase intermédiaire, et la phase de stabilisation (Giannone *et al.*, 2004). Lors de la phase initiale, la cellule entre en contact avec la matrice et une protrusion globale de la membrane va se produire à un rythme rapide et constant. Cela se caractérise par un fort dynamisme de la membrane plasmique, associé à une forte polymérisation de l'actine. Lors de la phase intermédiaire, la vitesse d'expansion de la membrane ralentit. Les intégrines interagissent avec les fibres de stress d'actine ventrale, générant des forces contractiles. Lors de la phase de stabilisation, la cellule développe des adhérences plus fortes avec la matrice, et teste la rigidité du microenvironnement par l'intermédiaire de cycles de contraction du

cytosquelette au niveau des adhérences en cours de maturation. Elle va ensuite reprendre sa forme normale avant de débiter sa migration puis proliférer (Döbereiner et al., 2004; Giannone et al., 2004, 2007).

L'analyse de l'adhérence cellulaire par xCelligence révèle plusieurs informations :

1. En milieu de croissance (EGM2), le FVIII natif augmente l'étalement des cellules HUVEC, quelles que soient les concentrations testées (1, 2 et 5 UI/mL).
2. En milieu de croissance, le FVIIIr ne modifie pas l'étalement des cellules HUVEC à ces mêmes concentrations. A une concentration plus élevée (10 UI/mL), le FVIIIr diminue l'adhérence cellulaire.
3. En milieu basal (EBM2 avec 5% de SVF), le FVIIIr diminue l'adhérence cellulaire, quelles que soient les concentrations testées.

Il est intéressant de constater un effet opposé entre le FVIIIr et le FVIII natif. Cette différence fonctionnelle pourrait s'expliquer par la pureté des deux composés. En effet, le FVIII natif peut être purifié sous la forme de complexe avec le VWF, la thrombine, le FIX ou le FX. Il peut également être retrouvé sous forme active ou inactive. Par conséquent, il est impossible de déterminer si l'effet observé est dépendant de la forme active ou inactive du FVIII, ou s'il est dépendant de ses partenaires. A l'inverse, le FVIIIr utilisé est un produit recombinant, sous une forme pure. Il correspond à la molécule complète du FVIII (2332 acides aminés) et se présente sous une forme inactive. En présence de facteurs de croissance, le FVIIIr n'a pas d'effet sur l'étalement, et à plus forte dose il diminue la surface d'étalement. Il est possible que dans ces conditions, l'effet du FVIIIr soit masqué par l'effet des facteurs de croissance, puisqu'en condition basale, chaque dose de FVIIIr testée montre une diminution de l'étalement cellulaire.

Adhérence focale et cytosquelette d'actine

L'intégrine $\beta 1$, dont l'expression protéique est augmentée par le FVIIIr, est constitutivement exprimée à la surface des cellules endothéliales, et permet de faire le lien entre les protéines du cytosquelette et la MEC. Les protéines cytoplasmiques se fixant à cette intégrine sont nombreuses. On recense notamment les α -actinines, impliquées dans la formation des fibres de stress d'actine ; ou encore les facteurs PAX et les FAK, impliqués dans les adhérences focales (AF) (van der Flier and Sonnenberg, 2001; Legate and Fässler, 2009; Quadri, 2012). La fixation

d'une intégrine à la MEC résulte en la phosphorylation de PAX et de FAK, en la formation d'AF, et en l'assemblage des fibres d'actines requises pour stabiliser et renforcer l'interaction entre la cellule et la MEC. La régulation de l'attachement entre la F-actine et les intégrines, via les protéines des AF, est critique dans le contrôle de la motilité cellulaire (Hu *et al.*, 2014). Les AF sont des complexes protéiques permettant l'adhérence cellulaire à la MEC, notamment via les intégrines (Quadri, 2012). La maturation de ces AF s'effectue en plusieurs étapes. Tout d'abord, il y a formation des adhérences naissantes, de petite taille (< 1 µm de diamètre) et très dynamiques (durée de vie d'environ 60 seconde), pouvant maturer en complexes focaux. Les complexes focaux sont de taille plus importante (1 à 2 µm de diamètre) et moins dynamiques (durée de vie de quelques minutes), pouvant maturer en AF. Les AF sont des structures d'environ 2 µm de large et de 3 à 10 µm de long, prolongées par des fibres de stress d'actomyosine, et dont la durée de vie est longue (30 à 90 minutes) (Figure 43) (Choi *et al.*, 2008; Parsons *et al.*, 2010). La dynamique d'assemblage / désassemblage des AF est un processus complexe essentiel à la migration cellulaire, impliqué dans la coordination entre le cytosquelette d'actine et les AF (Hu *et al.*, 2014). Selon les résultats obtenus, le FVIIIr augmente l'expression génique de la β-actine, ainsi que des α-actinines 1 et 4 impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine.

Nous avons montré différents effets du FVIIIr sur le cytosquelette d'actine et l'adhérence. D'après nos résultats, le FVIIIr augmente la phosphorylation des FAK, protéines intracellulaires à activité tyrosine-kinase, impliquées dans la signalisation médiée par les intégrines (Quadri, 2012). FAK est une protéine kinase régulatrice de l'assemblage / désassemblage des AF. Son activité promeut la migration cellulaire par différents mécanismes : activation de différentes voies de signalisation impliquant des kinases ; phosphorylation d'autres protéines composant les AF, comme la PAX ; réarrangement du cytosquelette d'actine (Hu *et al.*, 2014; Sieg *et al.*, 2000). PAX est une autre protéine composant les AF, n'ayant pas d'activité enzymatique. Elle est recrutée dans la zone de protrusion de la cellule au niveau des adhérences naissantes pour l'assemblage des AF, mais également à l'arrière de la cellule (zone de rétractation) pour le désassemblage des AF, induisant alors la migration. Toutefois, les mécanismes précis contrôlant l'assemblage / désassemblage des AF sont relativement mal connus (German *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2014; López-Colomé *et al.*, 2017).

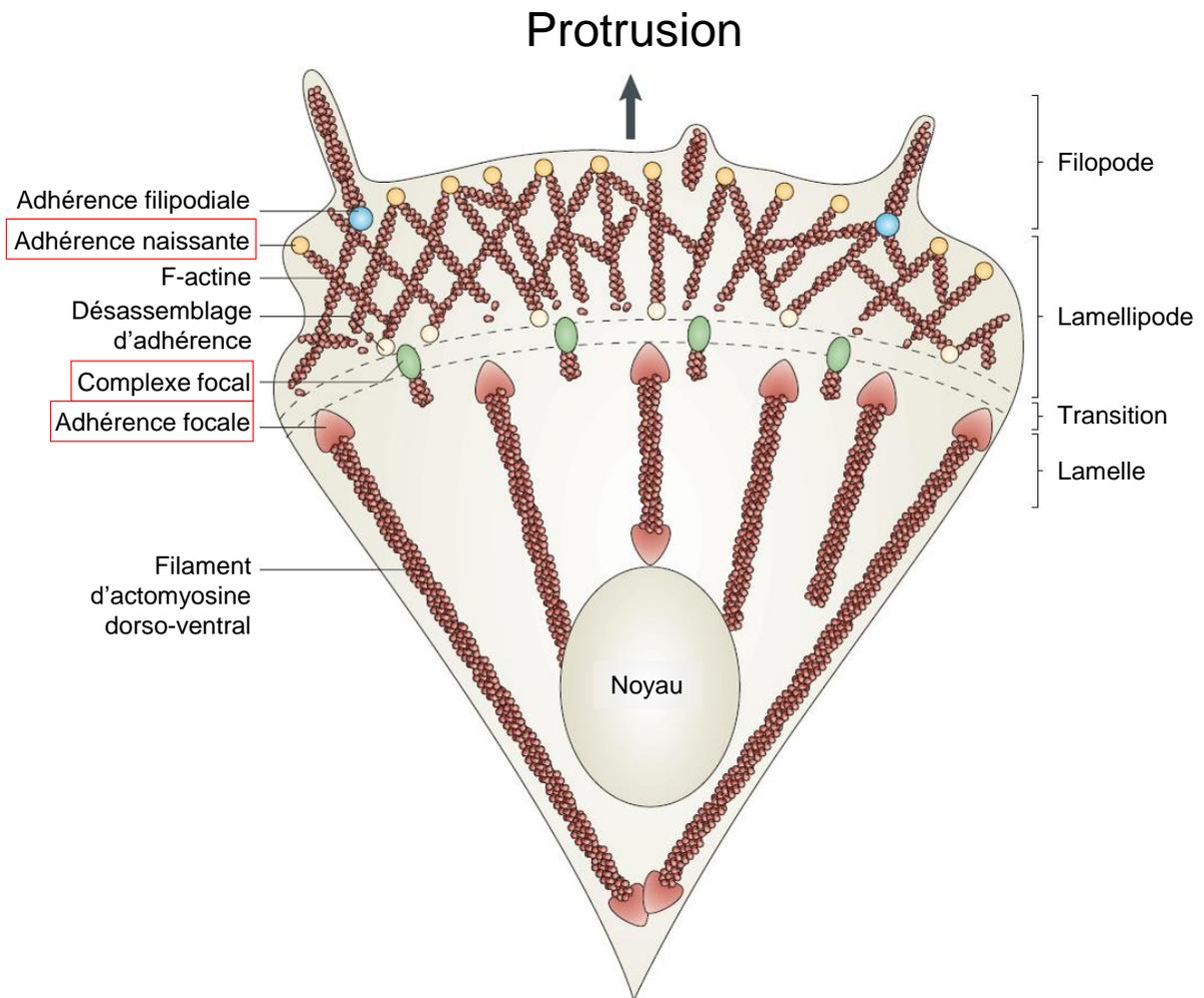


Figure 43 :  l ments structuraux de la cellule en migration. D'après Parsons et al., 2010.

L'analyse de l'activité des PAX dans la zone de rétractation montre que le FVIII diminue l'aire de marquage totale, et le nombre d' v nements phosphorylés. Ces informations peuvent traduire une activité de la PAX plus faible dans la zone de rétractation, auquel cas le désassemblage des AF serait perturbé.

Au niveau de la zone de protrusion, il est intéressant de constater que le FVIIIr augmente 2,4 fois le nombre d' v nements P-PAX, ayant une taille 2,7 fois plus petite par rapport au contrôle sans traitement. Ces résultats peuvent traduire une augmentation de la formation d'adhérence naissante au niveau de la zone de protrusion, où se forment les lamellipodes et seraient en

faveur de la migration. En effet, dans les cellules en migration, les adhérences naissantes se forment à l'avant des cellules (Figure 43) (Parsons et al., 2010).

Les résultats obtenus sur l'activité de la paxilline semblent être contradictoires. En effet, l'activité PAX au niveau de la zone de rétractation semble être en faveur d'une plus forte adhérence cellulaire, tandis que son activité dans la zone de protrusion semble être pro-migratoire. Il est possible que les cellules se trouvent dans une étape précoce du cycle migratoire, ce qui expliquerait ces résultats. Un cycle migratoire est découpé en 4 étapes : la protrusion, l'adhérence, la contraction et la rétractation. L'étape de protrusion correspond à la formation de fin lamellipode par le réseau d'actine. L'étape d'adhérence correspond au moment où le lamellipode adhère à la MEC, en formant des adhérences naissantes à l'avant de ces structures, et des AF à la base arrière. Les fibres de stress d'actine s'organisent à partir de ces AF et les connectent aux adhérences naissantes et aux AF de l'arrière. La maturation et la croissance des complexes focaux en AF sont dépendantes des forces de traction de l'actine et des contraintes extracellulaires (Figure 43). Puis, l'étape de contraction des fibres de stress d'actine renforce les AF de l'avant de la cellule, et affaiblit celles de l'arrière. Cette contraction entraîne un déplacement du corps cellulaire vers l'avant. Pour finir, l'étape de rétractation correspond au détachement des AF de l'arrière de la cellule, permettant la rétractation de la membrane arrière (Figure 44) (Friedl and Wolf, 2003; Gupton and Waterman-Storer, 2006; Mogilner and Keren, 2009; Parri and Chiarugi, 2010; Parsons et al., 2010). Il est possible que les cellules HUVEC aient été fixées dans une étape entre la protrusion et l'adhérence lors de nos expériences, expliquant alors la formation d'adhérences naissantes à l'avant, associées à une plus forte adhérence à l'arrière. Il est important de noter que les supports utilisés sont différents. Pour le test de migration et pour l'analyse de la phosphorylation des FAK, nous avons utilisé un plastique rigide de culture standard, où les cellules sont mobiles ; tandis que les puces Cytoo™ Crossbow sont composées d'un plastique anti-adhérent recouvert de fibronectine en forme d'arc, afin de polariser la cellule et de la maintenir immobile.

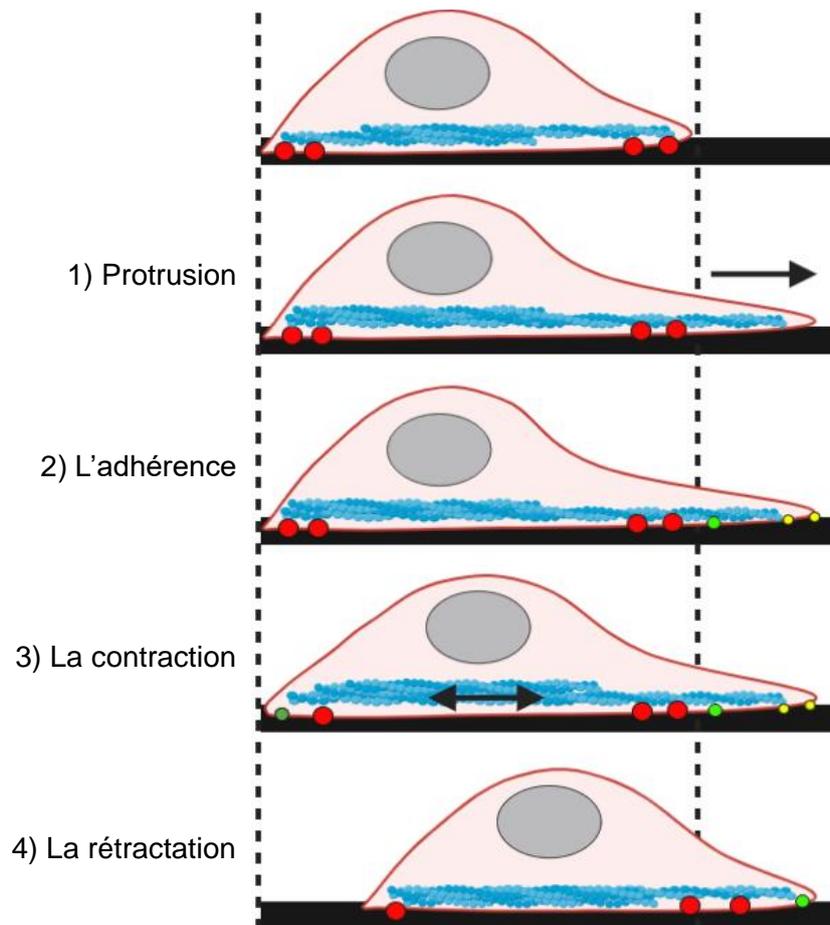


Figure 44 : Schéma représentant le cycle migratoire. La cellule est représentée en rose, le noyau en gris, le cytosquelette d'actine en bleu. Les points à la base des cellules correspondent aux adhésions : en rouge les adhésions focales, en vert les complexes focaux et en jaune les adhésions naissantes.

En parallèle, nous avons montré que le FVIIIr entraîne un réarrangement du cytosquelette d'actine. En effet, une diminution de la surface de marquage de l'ensemble des fibres de stress d'actine et de la surface moyenne par fibre est observée après traitement au FVIIIr, dans la zone de protrusion et dans la zone de rétractation. Cela peut signifier que le réseau d'actine est moins dense et avec des fibres plus petites. Ces informations corréleraient avec une augmentation de la formation d'adhérences naissantes en présence d'une faible dose de FVIIIr, où le réseau d'actine est en début de formation.

Pour conclure, le FVIIIr induit la formation de tubes vasculaires *in vitro* qui pourrait être expliquée par la modulation des propriétés migratoires des cellules endothéliales. Cette migration pourrait être induite par une augmentation de l'activité de FAK et la modulation de l'activité de PAX, permettant la formation d'adhérences naissantes au niveau de la zone de protrusion de la cellule et le réarrangement du cytosquelette d'actine. Le FVIIIr pourrait agir via

les intégrines ayant la capacité d'activer FAK, notamment l'intégrine $\beta 1$ sur-exprimée par le FVIIIr. Afin d'étudier plus en détail la dynamique des AF, il serait intéressant de compléter ce travail par des analyses de microscopie time-lapse confocale qui permettraient d'obtenir des images de cellules endothéliales en migration exprimant FAK et PAX marquées par des fluorochromes (Hu et al., 2014). Le test d'adhérence effectué par xCelligence montre une surface d'étalement plus petite en présence de FVIIIr par rapport au contrôle, pouvant signifier une adhérence plus forte ou une polymérisation de l'actine plus faible. Cette expérience nous montre également que les partenaires et/ou la forme active ou inactive du FVIII n'induisent pas les mêmes effets que le FVIIIr seul, soulignant l'impact fonctionnel des partenaires moléculaires du FVIII. Il serait intéressant de confirmer *in vivo* les effets du VIII observées *in vitro* en étudiant quantitativement et qualitativement, l'angiogenèse dans des matrices supplémentées ou non en FVIIIr et injectées en site sous cutanée chez des souris sauvages ou des souris déficientes en FVIII, ou VWF par exemple (Benslimane-Ahmim et al., 2013b).

Le système immunitaire : recrutement leucocytaire

La perméabilité de la barrière endothéliale permet de réguler le trafic leucocytaire et moléculaire, depuis le sang vers les tissus et inversement. Il existe différentes techniques pour mesurer la perméabilité vasculaire selon que l'on recherche un effet sur le passage de cellules ou sur le passage de nutriments. On distingue d'ailleurs la perméabilité vasculaire de la transmigration, dans la mesure où la première est reliée au passage de grosses et petites molécules, alors que la deuxième n'analyse que le passage des cellules, notamment leucocytaires, à travers cette paroi (Hubatsch et al., 2007; Justus et al., 2014; Muller, 2016; Muller and Lusinskas, 2008). Nous avons analysé l'effet du FVIIIr sur la perméabilité vasculaire ainsi que sur la transmigration leucocytaire.

Perméabilité de l'endothélium

L'analyse transcriptomique révèle un enrichissement de la fonction « jonctions adhérentes », contenant des gènes impliqués dans le cytosquelette d'actine (*ACTB*, *ACTN1* et 4). En plus d'être ancrées au niveau des AF, les fibres de stress d'actine sont également ancrées au niveau des jonctions adhérentes, impliquées dans l'adhérence cellules-cellules importante au contrôle de la perméabilité de l'endothélium (Natale *et al.*, 2019; Pollard, 2016; Sjöblom *et al.*, 2008; Svitkina, 2018). Le FVIIIr diminue l'expression protéique de Claudine-1 et ZO-1, protéines de jonction serrée dont la sous-expression augmente la perméabilité vasculaire (Kang et al., 2019; Yamamoto et al., 2008). L'inhibition de l'expression de ZO-1 par le FVIIIr est confirmée en microscopie sur un endothélium de cellules HUVEC. En parallèle, nous avons analysé la diffusion du Dextran-FITC à travers un endothélium d'HUVEC. Le FVIIIr induit une augmentation de la diffusion de la molécule, traduisant une augmentation de la perméabilité membranaire.

Adhérence et transmigration leucocytaire

ICAM1 (le plus sur-exprimé), *VCAM1* (le deuxième) et *SELE*, codant pour l'E-sélectine (le quatrième) sont parmi les molécules les plus sur-exprimées en présence de FVIIIr, tant à un niveau transcriptomique que protéique. Les molécules d'adhérence cellulaire E-sélectine, *ICAM1* et *VCAM1* sont sur-exprimées à la surface des cellules endothéliales activées, suggérant

un mécanisme d'activation des cellules HUVEC par le FVIIIr. Ces molécules sont impliquées dans le processus de migration transendothéliale des leucocytes, qui s'effectue en plusieurs étapes : 1) le « tethering » et le « roulement » des leucocytes sur l'endothélium, 2) l'activation des leucocytes, 3) l'arrêt des leucocytes et 4) la migration des leucocytes à travers l'endothélium (Aird, 2007; Cerutti and Ridley, 2017). L'E-selectine est impliquée dans l'étape 1, tandis qu'ICAM1 et VCAM1 sont préférentiellement impliquées dans l'étape 3 et 4 (Greenwood et al., 1995; Jones et al., 2015; Lehmann et al., 2003).

D'après nos résultats, le FVIIIr augmente le « roulement » et l'adhérence des monocytes sur un endothélium d'HUVEC en condition de flux physiologique. En effet, le traitement des monocytes ou de l'endothélium par le FVIIIr augmente le nombre de monocytes en « roulement », ainsi que le nombre de monocytes adhérents. Le traitement des monocytes mais pas le traitement de l'endothélium, augmente la vitesse d'adhérence des monocytes sur l'endothélium. Plusieurs hypothèses peuvent être émises à la lecture de ces résultats. Tout d'abord, l'augmentation du « roulement » et du nombre de monocytes adhérents mais pas de la vitesse d'adhérence, suggère un effet du FVIIIr au moment de l'étape 1 du processus transmigrationnaire, lorsque l'endothélium est traité. Ceci montre un rôle prépondérant de l'E-sélectine dans l'effet du FVIIIr. L'augmentation du nombre de monocytes adhérents suppose également un effet du FVIIIr au moment de l'étape 3, via la sur-expression d'ICAM1 et VCAM1. Les effets du traitement des monocytes observés sur leur adhérence à l'endothélium impliquent que le FVIIIr est capable de les activer. Il serait alors pertinent d'investiguer ses effets sur l'activation et la polarisation macrophagique. Par ailleurs, il serait intéressant de traiter à la fois les monocytes et l'endothélium, afin de voir si cela entraîne un effet synergique du FVIIIr sur l'adhérence des monocytes à l'endothélium. Ces résultats montrent que le FVIIIr a peu d'effet sur l'étape 4 du processus dans ces conditions.

Concernant la migration des monocytes à travers l'endothélium, nos résultats montrent un effet du FVIIIr dépendant des donneurs. On observe une augmentation de la migration transendothéliale qui sera à confirmer avec un plus grand échantillonnage tenant compte de la variabilité inter-individuelle. Cette variabilité peut être liée aux taux de FVIII ou de VWF des donneurs, à leur sexe ou leur âge.

Dans un contexte d'hémarthrose chez les souris déficientes en FVIII, une augmentation de la perméabilité des vaisseaux synoviaux, associée à une réponse pro-inflammatoire de type

macrophage M1 dans un premier temps, suivi d'une réponse anti-inflammatoire de type M2, favoriserait le développement d'autres hémarthroses. Ces résultats sont également observés au niveau de l'articulation contrôlée, dans une moindre mesure (Cooke et al., 2018). D'après nos résultats, le FVIIIr augmente la perméabilité de l'endothélium de cellule HUVEC, notamment en diminuant l'expression de ZO-1 et Claudine-1. Nous avons montré que le FVIIIr active l'endothélium et les monocytes, favorisant alors leur adhérence par l'augmentation de l'expression d'ICAM1, de VCAM1 et de l'E-sélectine. Le FVIIIr n'a pas d'impact majeur sur la transmigration monocyttaire.

Récepteurs potentiels induisant une signalisation

Le FVIIIr agit de manière directe sur la cellule endothéliale sans avoir identifié cependant le(s) récepteur(s) impliqué(s). L'analyse fonctionnelle révèle un enrichissement des fonctions « réponse à un stimulus » ou « réponse à une substance organique », impliquant la fixation potentielle du FVIIIr à un récepteur de surface, pouvant induire une signalisation intracellulaire. Or, dans la littérature, le FVIII n'est pas décrit comme un facteur induisant une signalisation intracellulaire. La plupart des récepteurs connus pour le FVIII sont ceux impliqués dans sa clairance : LRP1, ASGPR, Siglec-5, STAB-2, CLEC4M et SCARA-5 (Figure 45) (Bovenschen et al., 2005b; Lenting et al., 1999; Pegon et al., 2012; Saenko et al., 1999b; Swystun et al., 2018, 2019a, 2019b). Ces récepteurs « scavengers » ont une grande diversité structurale, et sont impliqués dans la détection, l'internalisation et la dégradation d'un large éventail de ligands endogènes ou exogènes (PrabhuDas et al., 2017). Outre leur rôle « scavenger », ces récepteurs contribuent à différentes fonctions biologiques, notamment au niveau des cellules endothéliales. Il n'est donc pas exclu que le FVIII puisse induire une signalisation via l'un de ces récepteurs.

LRP1 est le récepteur majeur de la clairance du FVIII, exprimé principalement par les hépatocytes et les macrophages résidant dans le foie. Il est également mais faiblement exprimé par les cellules endothéliales (Mao et al., 2016; Pi et al., 2012b). LRP1 est connu pour être impliqué dans le métabolisme lipidique, ainsi que dans des processus patho-physiologiques comme dans la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose ou la coagulation (Lillis *et al.*, 2008). Récemment, son implication dans des fonctions endothéliales comme dans la transcytose de la barrière hémato-encéphalique, la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse a été mise en évidence (András *et al.*, 2010; Mao *et al.*, 2016; Pflanzner *et al.*, 2011; Storck *et al.*, 2016).

CLEC4M est exprimé par les cellules endothéliales sinusoides du foie, du tissu lymphatique et des cellules dendritiques (Khoo *et al.*, 2008). Il est décrit comme un récepteur d'adhérence de pathogène comme le VIH, comme un récepteur de clairance pour le VWF (Bashirova *et al.*, 2001; Rydz *et al.*, 2013). Plus récemment, il est suspecté comme étant impliqué dans l'entrée du virus SARS-CoV-2 dans la cellule, par interaction avec la « Spike protein » du virus (Chen and Zheng, 2020).

SCARA5 semble être exprimé par un grand nombre de différents tissus, notamment par les cellules endothéliales de la rétine humaine par exemple (Mendes-Jorge *et al.*, 2014; Swystun *et al.*, 2019b). Il est décrit comme un récepteur de clairance du VWF et du complexe VWF-FVIII (Swystun *et al.*, 2019b). Dans le cadre du cancer du sein, SCARA5 est décrit comme inhibant la lymphangiogenèse en réprimant VEGF-C (You *et al.*, 2017).

STAB-2 est exprimé par les cellules endothéliales sinusoides du foie, de la rate, ainsi que par des cellules immunitaires comme les macrophages (Lee *et al.*, 2011; Swystun *et al.*, 2018). Il est principalement impliqué dans la clairance des glycosaminoglycanes, mais également dans l'adhérence des lymphocytes à l'endothélium hépatique, via l'intégrine $\alpha M\beta 2$ (Jung *et al.*, 2007; Swystun *et al.*, 2018).

Siglec-5 est exprimé par les monocytes / macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes B (Pegon *et al.*, 2012; van Schooten *et al.*, 2008). C'est un récepteur impliqué dans la clairance du FVIII et du VWF (Pegon *et al.*, 2012). Dans la littérature, il n'existe pas d'informations concernant son implication dans des fonctions endothéliales.

L'ASGPR est exprimé par les cellules parenchymateuse du foie, ainsi que les cellules dendritiques (Bovenschen *et al.*, 2005a; Gu *et al.*, 2019). Il est également décrit comme étant exprimé par les cellules endothéliales sinusoides porcins (Paris *et al.*, 2011). Ce récepteur est majoritairement impliqué dans la clairance de nombreuses glycoprotéines plasmatiques (Igdoura, 2017; Mi *et al.*, 2016). Il est également une cible privilégié des auto-anticorps dans le cas d'hépatite auto-immune (Roggenbuck *et al.*, 2012).

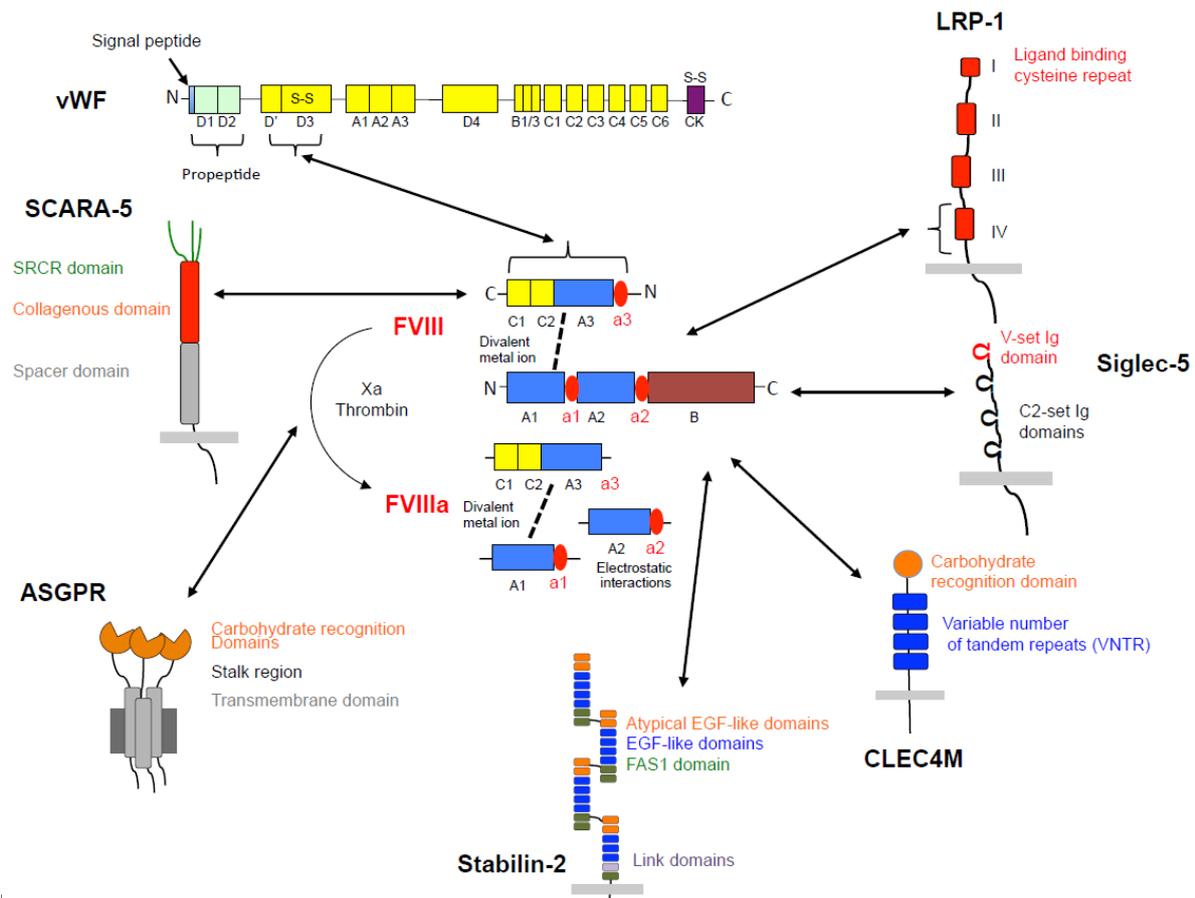


Figure 45 : Les récepteurs de clairances du FVIII. (Cadé *et al.*, soumis pour publication)

Parmi tous ces récepteurs, l'expression de Siglec-5 et ASGPR par les cellules endothéliales n'est pas décrite par les cellules endothéliales humaines (Bovenschen *et al.*, 2005a; Pegon *et al.*, 2012; van Schooten *et al.*, 2008). Par ailleurs, contrairement aux récepteurs LRP1, ASGPR, CLEC4M et Siglec-5, les récepteurs STAB-2 et SCARA5 ne sont pas capables d'internaliser le FVIII seul (Swystun *et al.*, 2018, 2019b).

En plus des récepteurs de clairance, trois autres récepteurs fixant le FVIII ont été décrits : CD206 (MRC1), Galectine-1 et Galectine-3 (Dasgupta *et al.*, 2007; O'Sullivan *et al.*, 2016). Le récepteur CD206 est incriminé dans le développement des anticorps neutralisant anti-FVIII, puisque la fixation du FVIII sur ce récepteur permet son endocytose par les cellules dendritiques, et la présentation de dérivés peptidiques du FVIII aux lymphocytes T CD4⁺ (Dasgupta *et al.*, 2007). Il est décrit comme étant exprimé par les cellules endothéliales sinusoides du foie (Mi *et al.*, 2016). Les protéines Galectine-1 et 3 sont abondamment exprimées par les cellules

endothéliales, et peuvent aussi circuler dans le plasma en complexe avec le VWF (Saint-Lu *et al.*, 2012; Thijssen *et al.*, 2008). Récemment, les récepteurs Galectine-1 et 3 sont décrits comme pouvant fixer le FVIII, et le récepteur Galectine-1 atténue son activité pro-coagulante (O’Sullivan *et al.*, 2016).

D’après les analyses du RNAseq, seuls les récepteurs Galectine-1, Galectine-3, LRP1, ASGPR et dans une moindre mesure CLEC4M sont exprimés par les cellules HUVEC (Tableau XV). Il est possible que le FVIII agisse via l’un de ces récepteurs, notamment LRP1 qui semble être un bon candidat compte tenu de son rôle dans l’angiogenèse, la perméabilité vasculaire et la transmigration. Toutefois, il n’est pas exclu que le FVIII agisse via d’autres récepteurs comme les intégrines, connues pour induire l’activation de FAK et PAX, et d’entraîner une réorganisation du cytosquelette d’actine (van der Flier and Sonnenberg, 2001; Legate and Fässler, 2009; Quadri, 2012).

Tableau XV : Les récepteurs interagissant avec le FVIII

	LRP1	CLEC4M	SCARA5	STAB2	Siglec-5	ASGPR	CD206	Galectine-1	Galectine-3
Exprimé par les cellules endothéliales (littérature)	Oui (Mao <i>et al.</i> , 2017)	Oui (Khoo <i>et al.</i> , 2008)	Oui (Mendes-Jorge <i>et al.</i> , 2014)	Oui (Swystun <i>et al.</i> , 2018)	Non	Non	Oui (Mi <i>et al.</i> , 2016)	Oui (Thijssen <i>et al.</i> , 2008)	Oui (Thijssen <i>et al.</i> , 2008)
Interaction avec le FVIII seul	Oui (Lenting <i>et al.</i> , 1999)	Oui (Swystun <i>et al.</i> , 2019)	Dépendante du VWF (Swystun <i>et al.</i> , 2019)	Dépendante du VWF (Swystun <i>et al.</i> , 2018)	Oui (Pegon <i>et al.</i> , 2012)	Oui (Bovenschen <i>et al.</i> , 2005)	Oui (Dasgupta <i>et al.</i> , 2007)	Oui (O’Sullivan <i>et al.</i> , 2016)	Oui (O’Sullivan <i>et al.</i> , 2016)
Exprimé par les cellules HUVEC (RNAseq)	Oui (55 à 572 reads)	Très faiblement (1 à 11 reads)	Non (0 à 1 read)	Non (0 à 4 reads)	Non (0 read)	Oui (49 à 337 reads)	Non (0 à 4 reads)	Oui (61 615 à 85 162 reads)	Oui (55 à 1 510 reads)

Perspectives

Nos travaux montrent un rôle extra-coagulant du FVIII sur les cellules endothéliales et les monocytes *in vitro*, avec un effet sur l'angiogenèse, la migration, l'adhérence et le recrutement leucocytaire (Figure 46). La concentration 10 UI/mL de FVIIIr a été choisie comme fil rouge pour ces travaux, en raison des résultats obtenus lors des tests d'adhérence. Ce choix a été motivé par : 1) l'effet maximal du FVIII à 10 UI/mL observé sur l'adhérence ; 2) 10 UI/mL induisait un effet biologique significatif en présence de facteurs de croissance. Bien que la concentration de 1 UI/mL de FVIII se rapproche des conditions physiologiques systémiques, en cas d'accident hémorragique ou de saignement sub-clinique les concentrations en FVIII locaux sont très probablement plus élevées au même titre que les protagonistes de l'inflammation. Ces points de réflexion, nous ont amenés à privilégier initialement le taux de 10 UI/mL (« concentration dans un microenvironnement ») dans nos expérimentations et de comparer ses effets à des concentrations inférieures à 1 UI/mL (« concentrations systémiques »). Nos résultats montrent un effet plus important du FVIIIr à 10 UI/mL dans certaines expériences (adhérence, phosphorylation de FAK et perméabilité vasculaire), et un effet plus important du FVIII à plus faibles doses dans les expériences de migration, d'expression de ZO-1 et phosphorylation de la PAX. Il serait donc intéressant de ré-étudier les effets transcriptomiques du FVIII à des concentrations plus faibles en comparaison des résultats obtenus avec 10 UI/mL.

Pour compléter ces travaux, il est important de mettre en lumière la ou les voie(s) de signalisation(s) induite(s) par le FVIII. Cette analyse pourrait s'effectuer par Western Blot, en étudiant la signalisation en aval de la protéine FAK par exemple. Afin d'identifier son ou ses récepteur(s), une analyse des effets du FVIII après neutralisation des récepteurs candidats, par anticorps bloquants ou shRNA, pourrait être réalisée. Si aucun de ces candidats n'est impliqué dans les effets du FVIII, une analyse par spectrométrie de masse des partenaires du FVIII après co-immunoprécipitation apporterait de nouvelles pistes de recherche. L'effet du FVIII pourrait alors être analysé après blocage du ou des récepteur(s) co-immunoprécipités(s), ou bien en développant des variants du FVIII n'interagissant pas avec ce(s) récepteur(s), sur le même principe que l'étude de Muczynski *et al.*, qui utilise des variants du FVIII ayant une affinité variable pour le VWF (Muczynski *et al.*, 2018). La/les cible(s) du FVIII à la surface des cellules peuvent varier en fonction de sa concentration, il serait alors intéressant de pouvoir varier les doses étudiées. De plus, comme nos résultats montrent un effet du FVIIIr sur les monocytes, il

serait intéressant d'étudier leur activation et leur polarisation, en analysant leur morphologie, l'expression de marqueurs membranaires et leur secrétome (Ivanova and Orekhov, 2016; Knowles et al., 2019; Nieuwenhuizen et al., 2014; Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

Pour mieux appréhender les fonctions extra-hémostatiques du FVIII, l'utilisation de modèles animaux est indispensable afin de se rapprocher de la situation clinique. Afin de renforcer les données obtenues *in vitro*, il pourrait être envisagé de comparer le phénotype de souris FVIII^{-/-} à des souris exprimant un FVIII muté à des positions abolissant complètement son effet hémostatique. Le phénotype de souris FVIII^{-/-} traitées avec un FVIIIr muté ayant perdu ses activités coagulantes, pourrait être comparé à des souris traitées avec un FVIIIr non muté et à l'Emicizumab.

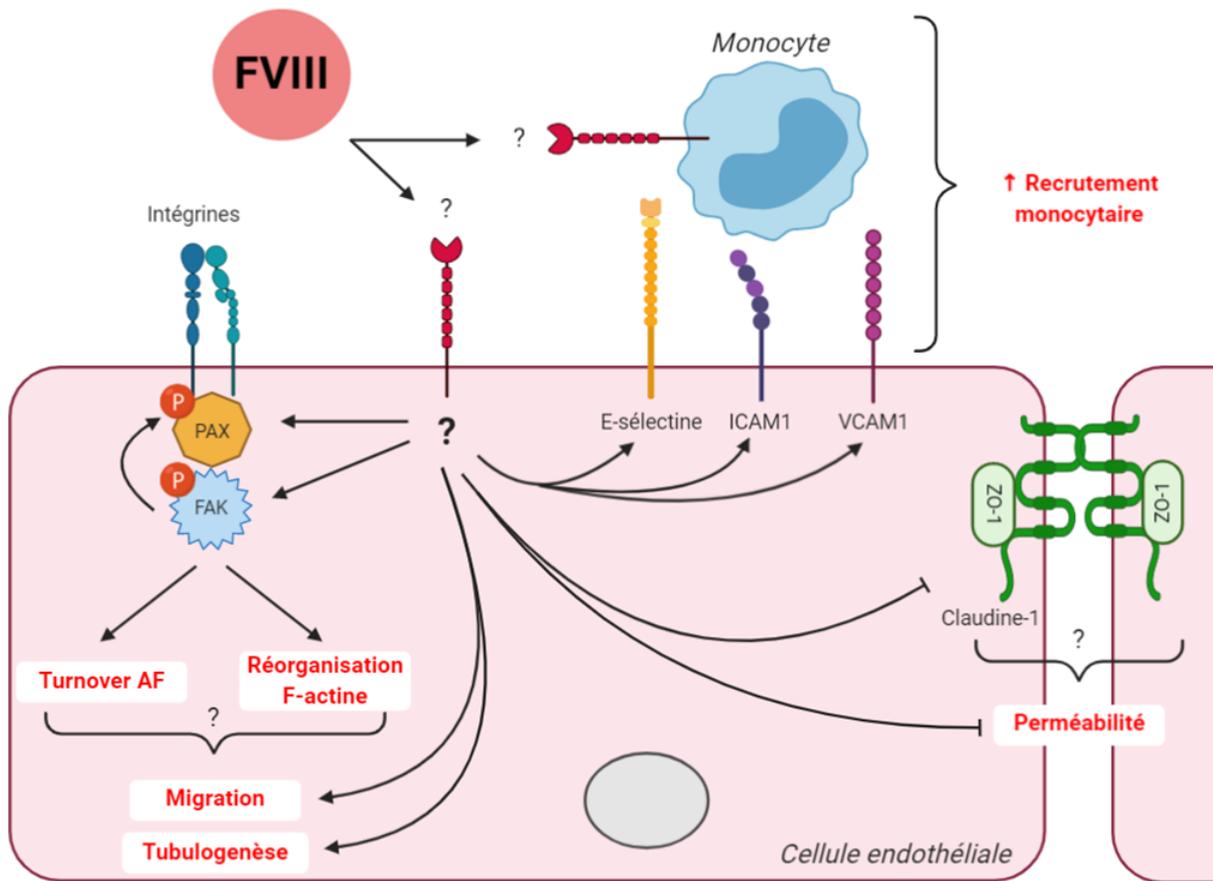


Figure 46 : Schéma récapitulant l'ensemble des effets du FVIII résultant des travaux in vitro réalisés. Le FVIII a un effet sur les cellules endothéliales et sur le recrutement des monocytes. Il module la tubulogenèse et la migration, en régulant le niveau de phosphorylation de FAK et PAX ; sur la perméabilité vasculaire via ZO-1 et Claudine-1 ; et sur le recrutement monocytaire via l'E-selectine, ICAM1 et VCAM1.

Dans le contexte de l'hémophilie A

Les patients souffrant d'hémophilie A présentent, en plus des troubles hémorragiques, une diminution de la densité minérale osseuse, une altération de l'inflammation, ainsi que des troubles vasculaires notamment dans le cadre d'hémarthrose (Bhat et al., 2015; Gamal Andrawes et al., 2020b; Goldscheitter et al., 2020; Jardim et al., 2017; Zetterberg et al., 2014). Jusqu'à récemment, ces désordres étaient attribués à la sédentarité prolongée des patients, et aux dommages articulaires associés aux hémorragies répétées. Grâce au développement et la disponibilité de traitement prophylactique, les patients souffrant d'hémophilie A ont vu leurs symptômes hémorragiques diminués, leur permettant d'adopter un mode de vie moins sédentaire, ce qui remet en question l'hypothèse précédente (Valentino and Khair, 2020). Les observations cliniques et pré-cliniques révèlent des rôles potentiels du FVIII dans différents processus biologiques. Toutefois, les effets observés *in vivo* peuvent dépendre de la thrombine ou du FXa. En effet, l'une des conséquences majeures d'un déficit en FVIII est l'altération de la génération de thrombine et de FXa, médiée en particulier par le complexe FVIIIa/FIXa (Negrier et al., 2019; Samuelson Bannow et al., 2019)

Système osseux

Le développement d'un phénotype ostéoporotique, en absence d'hémarthrose induite, est observé chez des souris déficientes en FVIII et en FIX, mais pas chez des souris déficientes en VWF (Taves et al., 2019). Les souris VWF^{-/-} présentent un taux de FVIII d'environ 20%, impliquant une génération de thrombine possible, contrairement aux souris FVIII^{-/-} et FIX^{-/-}. Ces résultats supportent l'idée que le phénotype osseux observé chez les souris FVIII^{-/-} et FIX^{-/-} peut être le résultat d'une absence complète de thrombine et de l'activation de ses récepteurs.

Les récepteurs de la thrombine (PAR) sont composés de 4 membres (Mackie et al., 2008). Les récepteurs PAR-1 et PAR-2 sont exprimés à la surface des précurseurs ostéoblastiques, des précurseurs ostéoclastiques et des ostéoblastes. Il a été montré que la thrombine module l'activité ostéoblastique par l'activation de PAR-1, et que la structure osseuse anormale observée chez les souris déficientes en FVIII et en PAR-1 sont semblables (Aronovich et al., 2013; Pagel et al., 2009). Toutefois, la contribution du couple thrombine/PAR-1 dans la biologie osseuse reste controversée. En effet, Tudpor *et al.*, montrent que les souris PAR-1^{-/-} présentent

une augmentation de la masse osseuse, expliquée par une diminution du ratio RANKL/OPG (Tudpor et al., 2015). L'effet de la déficience en PAR-1 pourrait alors dépendre du sexe des souris. En effet, Aronovich *et al.*, décrivent une diminution de la masse osseuse de souris femelle PAR-1^{-/-}, alors que Tudpor *et al.*, montrent une augmentation de la masse osseuse de souris mâle. Cet effet différentiel entre les souris mâles et femelles a été confirmé par l'utilisation de dabigatran extexilate, un inhibiteur direct de la thrombine (Brent et al., 2018). Leurs résultats montrent une augmentation de la masse minérale osseuse chez les souris femelles, tandis qu'aucune différence n'est observée chez les mâles. Le rôle de la thrombine dans le remodelage osseux dans l'hémophilie reste controversé. En effet, une approche de siRNA anti-prothrombine *in vivo*, ne montre aucune modification des paramètres morphométriques osseux chez les souris traitées, et conclue que la déficience en thrombine n'est pas impliquée dans la diminution de la masse minérale osseuse dans l'hémophilie A (Taylor et al., 2018). Dans le processus de la génération de thrombine, le FXa est également généré, et active le récepteur PAR-2 dans les cellules osseuses. Les souris PAR-2^{-/-} présentent un phénotype ostéopétrotique (Georgy et al., 2012). A l'inverse, *in vitro*, un inhibiteur de FXa (rivaroxaban) inhibe les effets d'hormone de régulation osseuse comme l'œstrogène, sur des ostéoblastes isolés de patientes en pré-ménopause et en post-ménopause (Somjen et al., 2017). Tous ces résultats n'excluent pas un rôle potentiel du FVIII dans le métabolisme osseux. En effet, un rôle direct du complexe FVIII/VWF sur la différenciation ostéoclastique a été observé *in vitro*, et un rôle direct du FVIII est suspecté dans le développement des ostéoblastes (Baud'huin et al., 2009; Larson and Taylor, 2017). Un dimorphisme sexuel conduisant à une perte osseuse est également observé chez les souris FVIII^{-/-}. Weitzmann *et al.*, décrivent un phénotype ostéoporotique chez les souris mâles et femelles, associé à une diminution de la formation osseuse chez les mâles, et à une augmentation de la résorption osseuse chez les femelles (Weitzmann et al., 2019).

L'ensemble de ces données corrobore l'hypothèse selon laquelle l'impact du FVIII, du FXa et de la thrombine dans la biologie osseuse est associé à un dimorphisme sexuelle. Ces études apportent également des informations en faveur d'un impact du FVIII sur la biologie osseuse, indépendamment de ses propriétés hémostatiques. Les effets directs et/ou indirects du FVIII dans le métabolisme osseux restent à explorer.

Systeme immunitaire

Le profil immunologique des patients hémophile A est distinct de celui des patients sains, avec une tendance pro-inflammatoire (Jardim et al., 2017). Les monocytes/macrophages sont des cellules médiatrices de l'inflammation, associées à l'hémarthrose dans l'hémophilie A. En effet, leur polarisation est altérée chez les souris FVIII^{-/-}, ainsi que chez les patients (Knowles et al., 2019; Nieuwenhuizen et al., 2014). Dans un contexte d'hémarthrose, un infiltrat macrophagique de type M1, puis M2, associé à une néo-vascularisation est observé dans l'articulation (Cooke et al., 2018). Une étude analysant la localisation d'un FVIIIr administré chez des souris FVIII^{-/-} montre qu'il est préférentiellement localisé dans la zone marginale de la rate, sans co-localisation majeure avec le VWF endogène. Différents marqueurs macrophagiques sont co-localisés avec ce FVIIIr, comme MARCO (Macrophage-Associated Receptor With Collagenous structure), Siglec-1 et SIGNR1 (Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Nonintegrin-Related 1 C-Type lectin). Par ailleurs, un profil transcriptomique pro-inflammatoire a été observé dans la rate, 3h après l'administration du FVIIIr (Lai et al., 2018). Ces informations, ainsi que l'effet du FVIIIr observé sur les monocytes dans nos conditions, révèle que les monocytes/macrophages sont une cible potentielle du FVIII.

Le FVIII pourrait réguler indirectement l'activation des monocytes/macrophages, via la génération de thrombine et de FXa, avec un impact fonctionnel sur l'inflammation et le tissu osseux. En effet, la contribution de PAR-2 dans l'inflammation de différents organes a été démontrée par l'utilisation d'inhibiteur de FXa (Ding et al., 2020; Ichikawa et al., 2019; Shi et al., 2018). La fixation du FXa sur son récepteur PAR-2 induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-8 ou le TNF α , et la différenciation en macrophage pro-inflammatoire de type M1 (Chen et al., 2019; Zuo et al., 2015). De même, la thrombine via son récepteur PAR-1 promeut la différenciation des macrophages pro-inflammatoires de type M1, associée à l'expression des cytokines pro-inflammatoires (López-Zambrano et al., 2020). Par la régulation de la polarisation et de l'activation macrophagique, qui est fonctionnellement liée au remodelage osseux, le FXa, la thrombine et indirectement le FVIII pourraient être impliqués dans les pathologies osseuses (Toni et al., 2020).

Système vasculaire

La néo-angiogenèse et le remodelage vasculaire jouent un rôle important dans le développement de l'arthropathie hémophilique (Acharya et al., 2011; Zetterberg et al., 2014). Bhat *et al.* observent que cette néo-angiogenèse se traduit par la formation de vaisseaux larges et irréguliers, avec une augmentation de l'expression des marqueurs du remodelage vasculaire, comme l' α SMA, l'endogline et le VEGF. L'équipe émet l'hypothèse que ce sont des gènes cibles du FVIII, dont la signalisation est régie par des mécanismes inconnus. Par ailleurs, ce remodelage vasculaire est maintenu plusieurs mois, et s'effectue également sur l'articulation contrôlée, n'ayant pas subi d'hémarthrose induite. Ce phénomène n'est pas observé chez les souris souffrant d'arthrose ou d'arthrite rhumatoïde, suggérant qu'il est spécifiquement lié à la déficience en FVIII (Bhat *et al.*, 2015).

En 2017, une étude montre que la thrombine diminue l'angiogenèse de cellules endothéliales endométriales *in vitro* (Shapiro et al., 2017). De même, le FXa inhibe la formation de tube vasculaire *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin d'ischémie du membre inférieur, et l'inhibition du FXa par le rivaroxaban restaure l'angiogenèse (Sanada et al., 2016). Dans un contexte d'hémophilie, l'absence de FXa et de thrombine causée par la déficience en FVIII pourrait alors promouvoir cette angiogenèse anormale.

Conclusion

Au regard de toutes ces informations, provenant de nos résultats et de la littérature, l'hypothèse d'effets extra-hémostatiques du FVIII dans les systèmes vasculaires, osseux et immunitaire est non négligeable. Nos travaux apportent des preuves d'effets directs du FVIII *in vitro*, avec un impact sur l'angiogenèse et la migration des cellules endothéliales, la perméabilité d'un endothélium, et sur l'adhérence des monocytes à celui-ci. Ces travaux s'inscrivent dans un contexte où la prise en charge de l'hémophilie A est bouleversée par la mise sur le marché de l'Emicizumab, et également par de nouveaux traitements non substitutifs en étude clinique, comme Mim8, le Fitusiran, le Concizumab et le Marstacimab. Ces approches non substitutives sont en compétition avec des approches substitutives également à l'étude, comme la thérapie génique et la protéine de fusion rFVIII_{Fc}-VWF-XTEN. Avec nos travaux et l'arrivée de ces nouveaux traitements, de nouvelles questions se posent quant à la prise en charge des patients. L'utilisation de traitements non substitutifs compensant uniquement les effets coagulants du FVIII, notamment chez des patients hémophiles A n'ayant pas développé d'anticorps anti-FVIII, permettra-t-il de prendre en compte les effets extra-hémostatiques du FVIII ? Il est alors essentiel d'améliorer les connaissances sur les rôles extra-coagulants du FVIII afin de mieux appréhender la prise en charge des patients hémophiles.

ANNEXES

Extrahemostatic activities and interactions of Factor VIII: a specific focus on bone and inflammation

Marie Cadé¹, Javier Muñoz-Garcia¹, Antoine Babuty^{1,2}, Marc Fouassier², Marie-Francoise Heymann¹, Paul E. Monahan³, Dominique Heymann^{1,4,*}

¹Université de Nantes, INSERM, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, 44805, France.

²Department of Haemostasis, CHU de Nantes, France.

³Spark Therapeutics, Philadelphia, PA, USA.

⁴University of Sheffield, Department of Oncology and Metabolism, Sheffield, UK.

Abstract

Hemophilia A is an X-linked hereditary bleeding disorder related to the deficiency of coagulation factor VIII (FVIII). Mild, moderate, or severe forms are recognized, leading to spontaneous bleeding episodes particularly into joints and muscles. Recent insights have highlighted the extrahemostatic functions of FVIII. FVIII deficiency has been associated with altered bone remodeling, dysregulated macrophage polarization, and inflammatory processes that are combined with neof ormation of abnormal blood vessels that have modified permeability. Treatment based on FVIII can lead to the development of inhibitors that render FVIII concentrate infusion ineffective. In this context, hemophilia has entered a new therapeutic era with the availability of new drugs (e.g. Emicizumab) to restore the hemostatic balance by bypassing pathologic acquired antibodies. The present review aims to summarize these main extrahemostatic functions of FVIII which may be crucial information for defining the best orientation of future therapies in hemophilia.

Introduction

Hemophilia A (HA) is an inherited bleeding disorder related to a functional and/or quantitative alteration in the expression of coagulation factor (F) VIII (FVIII). HA is a rare genetic disease affecting approximately 1 in 5,000 males, with recessive inheritance linked to the X chromosome. In about 2/3 of cases, the mutation comes from family inheritance, and in the remaining third, there is sporadic onset of the disease. Although males are preferentially affected, rare cases of HA in females have been reported. These cases may be due to receiving two mutated X chromosomes (the

mother carrying hemophilia A and an affected father), or inactivation of the X chromosome carrying the healthy allele [1-3].

The pivotal role played by FVIII in the coagulation cascade is now well-established [4] (Figure 1). The active form of FVIII (FVIIIa) acts as a cofactor in the tenase complex (FIXa/FVIIIa) which allows the conversion of FX to its active form, FXa, through the serine protease FIXa [5]. FXa contributes to prothrombinase complex with cofactor FVa, which catalyzes the conversion of prothrombin into thrombin. *In fine*, formed thrombin (FIIa) induces the

conversion of fibrinogen into fibrin, resulting in clotting. Indeed, the thrombin binds to Protease-Activated Receptor (PAR)-1 and -4 expressed at the platelets membrane and induced their activation and aggregation [6]. Even if thrombin is the main FVIII activator, FXa can also induce the activation of FVIII in FVIIIa. The activation by Factor Xa cannot occur if FVIII is linked to von Willebrand Factor (VWF). In HA, FVIII deficiency is directly associated with alteration to the coagulation process. VWF binds to FVIII in a non-covalent manner and is its main molecular partner. VWF is a multimeric glycoprotein essential for maintaining the integrity of FVIII in the bloodstream. It serves as a chaperone for FVIII and is therefore a crucial element because it protects the FVIII in the blood and increases both its half-life and its bioavailability [7]. The FVIII-VWF interaction is highly dynamic, with rapid association and dissociation rates [7].

The clinical manifestations of HA depend on the severity of the disease, which is directly related to the coagulant activity of FVIII, measured in plasma. Patients with coagulant FVIII activity of less than 1% have a severe form of the disease, while coagulant FVIII activity between 1 and 5% is observed in around 20% of patients and is considered moderate disease. The mild form then concerns 40% of patients, with FVIII activity of up to 40%. The severe and moderate forms of HA are associated with recurrent and spontaneous bleeding, mainly in the muscles and joints [4]. The recurrence of hematomas and hemarthrosis can lead to the development of disabling hemophilic arthropathies, and in some cases can be life-threatening, especially in case of cerebral haemorrhage [7]. Until recent decades, concern regarding the risk of causing

recurrent bleeding and the sequelae of hemarthroses and other hemorrhages resulted in a sedentary lifestyle for HA patients. Fortunately, the development and availability of prophylactic treatments has allowed this to change [4]. However, if the bleeding disorder is caused by deficient activity of FVIII, and consequently by severely deficient thrombin generation, recent insights highlight various activities of FVIII outside the scope of hemostasis. The present review gives a brief overview of the extrahemostatic activities of FVIII and discusses their main impact in HA.

Hemophilia A Therapies

Substitutive therapies

Prior to the 1970s, the treatment of haemophilia was based on the use of cryoprecipitate and fresh frozen plasma [8]. At that time appeared highly purified clotting factor concentrates from fractionated human plasma and then synthesized by genetic engineering (recombinant FVIII) since the 1990s. These products are produced in eukaryote systems including Chinese hamster ovary; baby hamster kidney; human embryonic kidney cells (Table 1). These recombinant factors have a half-life of 8-12h and require 1 to 3 intravenous injections per week for severe haemophiliacs on prophylaxis [9].

Since 2010, technological advances have made it possible to modify the structure of these proteins, allowing to extend their half-life. They have contributed, on the one hand, for reducing the number of prophylactic injections in patients and, on the other hand, for preventing the occurrence of bleeding, thanks to a higher residual factor level. The main molecular modification is based on the addition of a

polyethylene glycol (PEG) group [10] on the protein fusion linked to the Fc fragment of an IgG [11,12], or by the deletion of part of the FVIII protein (FVIII single chain). More recently, a promising novel fusion protein was evaluated in a phase 3 clinical trial. This drug consists of a recombinant FVIII coupled to an Fc fragment of immunoglobulin on which a fragment of VWF and two XTEN linkers have been added. Such construct decreased the clearance and degradation of the fusion protein and had an extended half-life of 37 hours [13] (Table 1). Similarly, recombinant factors have been also proposed to treat hemophilia B patients with a recombinant drug composed by a recombinant FIX linked with recombinant albumin [14]. The therapeutic regimen proposed was : 40 IU/kg weekly and 75 IU/kg every 2 weeks. In this phase 3 clinical trial, more 90% of bleeding episodes were treated with a single injection. No patient developed an inhibitor, and no side effects were identified.

The major complication of FVIII replacement therapies is the development of anti-FVIII alloantibodies (called inhibitor). It occurs in 25-35% cases of severe haemophilia A. These inhibitors are most often polyclonal IgGs with high affinity that interfere very rapidly with the endogenous and injected factor and render substitution treatments ineffective [15]. These clinically complex situations to manage have oriented research towards the development of non-substitutive therapies, with the aim of restoring the hemostatic balance.

Non substitutive therapies

Emicizumab is a bispecific humanized monoclonal antibody used in HA with a

very long half-life (28 days) and is administered subcutaneously at a rate of once a week or even once a month. It binds to FIXa and FX to restore the function of cofactor VIIIa necessary for effective hemostasis [16]. Without any structural relationship or sequence homology with FVIII, it is not a target for anti-FVIII antibodies. Initially developed to treat HA patients with inhibitor, its very long half-life and mode of injection route (subcutaneous) have broadened its prescription spectrum to include all severe HA patients for prophylaxis (Table 1).

Other treatments modifying the hemostatic balance are still being studied. These include fitusiran, an antithrombin inhibitor that is a small interfering RNA that penetrates hepatocytes and inhibits antithrombin synthesis [17]. Other molecules target TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), a glycoprotein that represses clotting by inhibiting the tissue factor-FVII-FXa complex [18]. These anti TFPIs thus tend to restore the hemostatic balance in HA patients.

Gene therapy

The goal of haemophilia gene therapy is to introduce an operational copy of the gene encoding the deficient antihemophilic factor into hepatocytes via an adenovirus that is not pathogenic to humans [19,20]. To date, the efficacy and safety of gene therapy has been established, but only for a short period of time. Clinical trials are ongoing but the fact that the vectors used are common viruses, encountered by many people, complicates the use of gene therapy as antibodies to the vector are common (Table 1).

The biological activities of FVIII in bone remodeling

Multiple clinical studies have described the risk of low bone mineral density (BMD) in HA adult and pediatric populations (Table 2). These studies demonstrate the high prevalence of low BMD in moderate and severe HA patients, 27% of whom exhibit an osteoporotic phenotype and 43% of osteopenia associated with abnormal levels of markers for bone metabolism and circulating cytokines in blood [49-51]. Low BMD markedly increases the risk of fracture in HA patients [52,53]. The etiology of the low BMD in HA patients was initially and logically assumed to be associated with a sedentary lifestyle along with the development of hemarthrosis. New prophylactic treatments based on FVIII replacement result in more consistent hemostatic protection and have durably modified the lifestyle of HA patients. However, FVIII replacement partly prevents the loss of BMD in patients with a severe form of the disease [54-56].

Bone remodeling is a regular cycle composed of phases of bone formation and resorption, mediated by osteoblasts and osteoclasts respectively. Both bone cell types communicate by using soluble factors and, more particularly, a molecular triad belonging to the TNF/TNF receptor superfamilies which controls the differentiation and activation of osteoclasts. This molecular triad includes: i) the Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B (RANK) expressed at the surface of osteoclasts; ii) RANK ligand (RANKL); and iii) Osteoprotegerin (OPG), an ubiquitinary soluble protein which acts as a decoy receptor for RANKL. RANKL expressed by osteoblasts and stromal cells binds to RANK and induces the

differentiation and activation of osteoclasts. OPG released by osteoblasts binds to RANKL and blocks the binding of RANKL to RANK and consequently interrupts the associated NF κ B signaling pathway. In addition to being an inhibitor of osteoclast formation and bone resorption, OPG is a biological modulator of endothelial cells (e.g. the promotion of vascular tubes) [57-59]. Demonstrating that OPG was co-localized and physically associated with VWF in the Weibel-Palade bodies was the first evidence of a relationship between a hemostatic factor and a bone remodeling regulator [60]. OPG binds to A functional link between the FVIII/VWF complex and bone cell differentiation has been demonstrated [61]. In 2009, Baud'huin *et al.* revealed that FVIII-VWF complex inhibits the RANKL-induced osteoclastogenesis and resorption activity of osteoclasts in murine and human models. FVIII-VWF complex binds to OPG and this interaction occurs through the A1 domain of VWF [62]. In contrast to FVIII the FVIII-VWF complex can bind to RANKL [63]. This gave new evidence of extrahemostatic activity of FVIII in bone biology (Figure 2).

More recently, the bone phenotype of FVIII-, FIX or VWF-knockout mice has been studied [62-65]. FVIII^{-/-} and FIX^{-/-} but not VWF^{-/-} male mice develop an osteoporotic phenotype in the absence of induced hemarthrosis or clinically detectable bleeding [65]. This phenotype was exacerbated after joint bleeding induced by injury in FVIII^{-/-} male mice whereas VWF^{-/-} did not display the same characteristics, demonstrating that FVIII is involved in the regulation of bone remodeling after injury in contrast to an intact FVIII/VWF complex which is not required for bone remodeling post-injury

[65,66]. A direct role for FVIII in osteoblast development is suspected [67]. Interestingly, Weitzmann *et al.* observed sexual dimorphism in the mechanism driving bone loss in FVIII^{-/-} mice [69]. Whether FVIII^{-/-} males and females showed osteoporotic phenotype, bone loss was directly related to a decrease in bone formation in males and an increase in bone resorption in females [69]. These data may potentially be related to a crucial role played by thrombin generation and signaling for the maintenance of a normal bone phenotype. Indeed, thrombin is activated during the coagulation cascade and the bone phenotype observed in FVIII deficiency mice may be the results of a complete absence of thrombin formation and of thrombin receptor activation.

Protease-activated receptors (PARs) belong to family composed by 4 members that mediate cellular responses to extracellular proteases [70]. Osteoblast precursors (bone marrow stromal cells), osteoblasts and osteoclast precursors express PAR-1 and PAR-2. Thrombin modulates osteoblast activities through activation of the PAR-1 signaling pathway [71,72]. Bone structural abnormalities appeared similar in mice with a complete knockout of either FVIII or PAR-1 [72]. However, the contribution of the thrombin/PAR-1 couple in bone biology remains controversial. Tudpor *et al.* studied the phenotypic impact of thrombin receptor deficiency in mice and revealed increased bone mass in knockout mice, explained by a decreasing RANKL/OPG ratio [72]. Cortical bone volume, as well as trabecular thickness and connectivity, were increased in males but not in females. In contrast, by using the α -prothrombin siRNA approach in mice, Taylor *et al.* did not observe any modification to the bone morphometric

parameters in treated mice and concluded that thrombin deficiency was not involved in the mechanism of decreased BMD in HA [73]. In the process of thrombin generation, FXa is generated that may activate PAR-2 expressed in bone cells [70]. PAR-2^{-/-} mice were characterized by a mild osteopetrosis phenotype in the growing mice. The higher cortical and trabecular bone mass with lower osteoblastic and osteoclastic parameters gave evidence of the implication of PAR-2 in bone turnover but can not be related to the bone phenotype observed in HA mice [65,74]. The recent use of dabigatran etexilate, a direct thrombin inhibitor, revealed a slight increase in BMD in C57BL/6 female mice in contrast to males, in whom no significant difference was observed [75] (Figure 1). Thrombin (e.g. dabigatran) and FXa (e.g. Apixaban, Rivaroxaban) inhibitors have also been assessed in patients regards to the risk of osteoporosis and compared to warfarin, a vitamin antagonist [76]. Compared with warfarin, thrombin and FXa inhibitors were associated with a lower of osteoporosis in females but not in males. This observation was in agreement with *in vitro* observation in which rivaroxaban inhibited the stimulatory effects of bone-modulating hormones (e.g. estrogen) in both primary osteoblasts isolated from premenopausal and postmenopausal women [77]. In addition, compared with dabigatran, both FXa inhibitors were associated with a lower risk of osteoporosis [76]. Overall, these data strengthens the hypothesis that the impact of the FVIII-thrombin axis in bone biology is related to functional sexual dimorphism. These studies also bring new clues in favor of a biological impact of FVIII in bone biology, independently of its hemostatic properties. The indirect and/or direct

mechanisms of FVIII in bone metabolism need to be better explored.

FVIII regulates macrophage behavior: a functional relationship with the inflammatory process

The immune status of HA patients differs from that of healthy donors and is characterized by a prominent pro-inflammatory profile [78]. Macrophages are major cell mediators in the inflammatory process associated with HA hemarthrosis. Their polarization is altered in FVIII^{-/-} mice [79]. In a physiological context after their extravasation from blood, monocytes differentiate into M1 and/or M2 macrophage subtypes depending on the microenvironment. In the presence of Th1 cytokines such as IFN- γ , TNF- α , or bacterial LPS (lipopolysaccharides), monocytes differentiate into pro-inflammatory M1 macrophages. These macrophages then secrete a large amount of pro-inflammatory cytokines, such as interleukins IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 or TNF- α . M1 macrophages intervene in the elimination of pathogens by generating ROS, antigen presentation or promoting the response of Th1 and Th17 lymphocytes [80]. In the presence of interleukins IL-10, IL-4, IL-13 or TGF- β , monocytes polarize into type M2 subtype, anti-inflammatory macrophages. M2 macrophages are conventionally classified into 4 types: i) M2a, which plays a key role in tissue remodeling and wound healing, ii) M2b, with an immunoregulatory function by activating regulatory T cells and Th2 lymphocytes, iii) M2c, involved in the phagocytosis of apoptotic bodies, and iv) M2d, with pro-angiogenic activities [80].

Transient modifications of monocyte/macrophage populations were observed in FVIII^{-/-} mice after joint injury [79]. These authors observed an increase in M1 monocytes in circulating blood, and a decrease in spleen, combined with a decrease in the M2 subtype in the spleen. In addition, a concomitant increase in M1 and M2 macrophages was detectable in synovial tissue post-injury. In contrast, no modification in macrophage polarization was observed in healthy joints. Similarly, a recent study in HA patients also shows deregulation of macrophage polarization [81] (Figure 2). The differentiation properties of purified monocytes isolated from HA patients and healthy donors were compared. Monocytes from HA patients were characterized by a lower rate of polarization compared to donor cells, with polarization dysregulated in response to M-CSF (M2 macrophages), and partially dysregulated in response to GM-CSF (M1 macrophages). Monocytes from HA patients expressed a lower number of M-CSF and GM-CSF receptors compared to healthy donors. This study supports the biological function of coagulation factors in macrophage polarization. However, hemophilia A and B patients were studied without any distinction making it difficult to obtain a clear conclusion on FVIII function in macrophage differentiation. Kist-Toth *et al.* compared the effects of recombinant FVIII and FVIII-Fc (a fusion protein composed of B domain deleted-FVIII fused to the Fc region of IgG1) on human macrophages but did not observe any regulation of macrophage polarization in the presence of FVIII [82]. Similar results were obtained on monocyte-derived dendritic cells [83].

Joint bleeding in FVIII^{-/-} mice led to synovial neovascularization, characterized by large vessels with high α -SMA expression [84]. Inflammation and macrophage polarization cannot be dissociated in HA. Proinflammatory M1 macrophage infiltration was observed concomitantly with neovessels, followed by a M2 macrophage response contributing to tissue-reparative actions. Overall, an inflammatory reaction was detectable in close soft tissues at the same time as an increase in permeability, and the formation of new vessels that promotes re-bleeding (Figure 2). These marked tissue modifications were not prevented by short term FVIII replacement [85]. The localization of recombinant FVIII administered in FVIII^{-/-} mice has recently been studied [86]. Recombinant FVIII was preferentially observed in the marginal zone of the spleen with no major co-localization of murine VWF with recombinant human FVIII. Macrophage markers, including the scavenger receptor Macrophage-Associated Receptor with Collagenous structure (MARCO), Sialic acid-binding-Ig-like Lectin-1 (SIGLEC-1) and Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Nonintegrin-Related 1 C-type lectin (SIGNR1) were co-localized with infused FVIII [84]. Interestingly, a proinflammatory transcriptional profile was observed in the spleen and liver after administration of recombinant FVIII compared to the vehicle. A series of 33 and 12 upmodulated genes was identified in the spleen and liver respectively, 3h after FVIII infusion [84]. These investigations reveal macrophages as a potential target of FVIII.

FVIII may indirectly regulate macrophage activation with functional impact in inflammation and bone tissue. By

modulating thrombin and FXa generation as well as downstream signaling associated with PARs, FVIII may modulate the activation of macrophages and potentially bone remodeling. Indeed, the literature is rich in manuscripts describing the contribution of PAR-2 in inflammation in various organs as demonstrated by the use of FXa inhibitors [87-92]. The binding of FXa to PAR-2 induced ERK1/2 signaling and led in the expression of pro-inflammatory cytokines (e.g. IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ) and the differentiation of macrophages toward pro-inflammatory M1 subtype [94-95]. However, the literature remains nuanced and PAR2-mediated M2 skewing has also been reported in response to Mycobacterium tuberculosis antigen [96]. By regulating the differentiation and activation of macrophages which are functionally related to bone remodeling, FXa and indirectly FVIII might be involved in bone diseases [97] (Figure 2). Questions regarding the direct or indirect impact of FVIII and the molecular complexes related to FVIII in macrophage differentiation and their role in osteoimmunology remain open.

The molecular partners of FVIII: what may be their relationship with the FVIII-associated inflammation and bone remodeling?

Although VWF was the first partner of FVIII to be described, several membrane receptors controlling the bioavailability of FVIII have been identified more recently. Most FVIII is probably eliminated in a VWF-dependent manner. However, the clearance mechanisms of inactivated FVIII, degraded subunits, or the FVIII-VWF complex have only been partially characterized [98]. Animal studies using radiolabeled FVIII show that the liver and

spleen are the major sites for clearance of the FVIII-VWF complex, as well as macrophages [99,100]. Scavenger receptors belong to a large family of transmembrane proteins which are expressed predominantly by myeloid cells. These receptors show a high structural diversity and recognize numerous ligands (e.g. soluble proteins, microbial pathogens) [101]. They are involved in a wide range of biological functions including sensing, internalization and degradation of ligands. During the last two decades, various scavenger receptors involved in the clearance of FVIII have been described and may contribute to the biological function of FVIII in inflammation and musculoskeletal tissues (Figure 3).

Low density lipoprotein receptor - related protein 1 (LRP-1)

LRP-1 is a member of the LDLR family which recognizes numerous ligands. It is an endocytic receptor abundantly expressed in the liver, mainly in resident hepatocytes and macrophages [102]. The property of LRP-1 to bind FVIII was initially reported by Saenko *et al.* [103] and Lenting *et al.* [104]. LRP-1 appeared to be the major hepatic receptor responsible for clearance of FVIII. Their studies show a direct interaction between FVIII and LRP-1 which was not inhibited by the presence of VWF. Cells expressing LRP-1 were able to internalize radiolabeled FVIII unlike LRP1-deficient cells. Furthermore, the internalization of FVIII by LRP-1 was inhibited by 70% in the presence of the Receptor-Associated Protein (RAP) that prevented the binding of FVIII to LRP-1 [103,104]. The internalization of the radiolabeled FVIII-VWF complex was also made possible by LRP-1 and appeared to be promoted by the

presence of heparan sulfate proteoglycans (HSPG) expressed at the membrane surface. Simultaneous inhibition of HSPG and LRP-1 results in a longer half-life for FVIII than inhibition of LRP-1 alone [105]. In 2003, Bovenschen *et al.* confirmed the importance of the LRP-1 receptor in the clearance of FVIII by using a genetically modified mouse model in which LRP-1 was deleted specifically from the liver [106]. This deletion led to doubling of the FVIII plasma concentration, a significant delay in its clearance, and an increased half-life. LRP-1 cooperates with the LDL receptor in the regulation of FVIII plasma levels, as demonstrated in the LDL receptor and LRP-1 double deficient mice [107]. Surface plasmon resonance experiments revealed that FVIIIa bound clusters I, II of LRP-1. Similarly to LPR chaperone, α 2 macroglobulin receptor and RAP, FVIIIa LRP-1 also binds cluster III. [108]. Finally, Young *et al.* identified cluster IV as the major LRP1 binding site for FVIII [109]. LRP-1 contributes to the bone biology by controlling the dialog between osteoblasts and osteoclasts [110,111]. Indeed, LRP-1 is a mitogenic effector in osteoblasts which in turn control osteoclast activity [110-112]. In this context LRP-1 protects against osteoporosis [111]. LRP-1 expressed is also expressed by young macrophages and depleting Lrp1 in macrophages abrogates the benefit effects of macrophage in bone repair [113]. In contrast, the treatment of old mice with recombinant LRP-1 improves fracture healing confirming the crucial role of LRP-1 in bone remodeling and the contribution of macrophages in LRP-1 functions. Consequently, FVIII may act as bone regulator factor by regulating LRP-1 expression at the cell membrane and its internalization [114].

*Asialoglycoprotein receptor
(ASGPR)*

ASGPR is a member of the C-type (i.e. calcium-dependent) lectin family, abundantly expressed in hepatocytes as well as in macrophages, and involved in binding and endocytosis of glycoproteins in the bloodstream. In 2005, Bovenschen *et al.* showed that the B domain of FVIII recognized ASGPR in a dose-dependent manner and with high affinity ($K_d \approx 2$ nM) [115]. Enzyme treatment with endoglycosidase F completely abolished the interactions between FVIII and ASGPR, showing that the N-glycosylations of FVIII were responsible for their interaction. The half-life of FVIII in the bloodstream increased in the presence of asialo-orosomucoid (an ASGPR antagonist) whereas the half-life of B domain-deleted FVIII is comparable to the native FVIII in treated HA patients. However, the physiological significance of this interaction remains unknown. It has been hypothesized that ASGPR may play a role in quality control of secreted FVIII by internalization of the FVIII incompletely N-glycosylated [116]. ASGPR also mediate the clearance of VWF and ASGPR-1 knockout mice had a reduced bleeding time compared to WT littermates in contrast to ASGPR-2 [117]. The control of VWF bioavailability may impact FVIII level and its interaction with bone related factor [60-62]. Valladeau *et al.* showed the ASPGRs expression by immature dendritic cells which were localized to early endosome highlighting their potential function in the receptor recycling following internalization ligand [118]. The control of FVIII and VWF bioavailability as well as the recycling of specific receptors in phagocytic cell types and endothelial cells may regulate the

extrahemostatic activities of FVIII. Complementary investigations are required to study the possible impact of ASPGR in bone tissue and to better understand its impact in immune cells.

*Sialic acid binding
immunoglobulin-like lectin-5
(Siglec-5)*

Siglec-5 belongs to a large family of receptors composed of 14 members with specific affinity to different types of sialic acid structures and conformations. They are mostly expressed by cells of hematopoietic origin, such as neutrophils, B lymphocytes, monocytes, dendritic cells, and macrophages with specific distribution for each member [119]. Siglec-5 is expressed by monocytes/macrophages (including lines such as THP-1 and U937), neutrophils and B cells. VWF and FVIII bind to recombinant Siglec-5 as well as to Siglec-5 expressing cells *in vitro* [120]. Treating VWF with sialidase resulted in a complete loss of the interaction between VWF and Siglec-5, suggesting that their interaction was dependent on sialic acid. Conversely, this treatment did not affect the interaction between FVIII and Siglec-5. The colocalization of VWF, FVIII and Siglec-5 with endosomal markers suggested that their interaction was followed by their endocytosis [120]. Finally, these authors observed a significant decrease in FVIII-VWF levels in mice overexpressing Siglec-5 in their hepatocytes. These results suggest that FVIII and VWF may be ligands of Siglec-5 and that the latter may contribute to the regulation of the plasma levels of VWF, FVIII, FVIII-VWF complex, and of their biological activities [120]. If there no data available on the potential involvement of Siglec-5 in bone metabolism, its role in

inflammation has been already established [121]. Siglec-5 displays anti-inflammatory activity by inhibiting leukocyte-rolling over E- and P-selectins and reduces the basal leukocyte rolling *in vivo*. In addition, Siglec-5 prevents leukocyte recruitment in a TNF α -induced inflammation model. The control of FVIII bioavailability and its impact in Siglec-5 mediated inflammatory process must be investigated.

Stabilin-2 (STAB-2)

STAB-2 is a scavenger receptor member belonging to the C-type lectin family. STAB-2 is expressed by sinusoidal endothelial cells of the liver (LSEC) and spleen, as well as by immune cells such as macrophages. It is a clearance receptor for glycosaminoglycans such as hyaluronic acid [122]. A mutated form of the STAB-2 receptor that affects its expression level was associated with an approximately 30% increase in FVIII and VWF in plasma, suggesting that STAB-2 was involved in regulating these proteins [123]. STAB-2 may modulate clearance of FVIII in a VWF-dependent manner. The affinity of STAB-2 to FVIII is relatively low in the absence of VWF [109]. STAB-2 contributes to the internalization of VWF as well as that of the FVIII-VWF complex [109]. STAB-2 is highly expressed in bone marrow, lymphoid organs [124,125] and can be expressed by bone derived cancer cells [126]. In contrast to STAB-1 which reduces bone resorption activity *in vitro*, no data are currently available of the role of the contribution of STAB-2 in bone remodeling [127]. STAB-2 contributes to the clearance of apoptotic cells [128] and FVIII/VWF complex blocks the inhibitory effect of OPG on TNF Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) on osteoblast-like cells [61].

Stabilin-2 is involved in lymphocyte adhesion to endothelial cells and by this way could contribute to the inflammation [129]. The functional link between STAB-2 and FVIII in the control of cell apoptosis and leukocyte recruitment/activation remains undetermined.

C-type lectin domain family 4 member M (CLEC4M)

CLEC4M is a member of the type-C lectin family, expressed by sinusoidal endothelial cells of the liver, lymphoid tissues, and dendritic cells [130]. CLECM4 binds to N-glycan residues of VWF and then controls its internalization and clearance [131]. In addition, FVIII binds to CLEC4M by its mannose-exposed N-linked glycans through VWF-dependent and independent mechanisms. FVIII also binds CLEC4M-expressing HEK 293 cells and is internalized via a clathrin-coated pit-dependent mechanism leading to its catabolism by lysosomes [131]. Unfortunately, there is no study yet available analyzing the expression/function of CLEC4M in bone cells. Its role in the control of inflammatory process is suspected by its ability to bind to SARS-CoV-2 spike protein [132].

Scavenger Receptor Class A Member 5 (SCARA-5)

The Genome-Wide Association Studies (GWAS) investigation identified the scavenger receptor SCARA-5 as being associated with plasma VWF and/or FVIII [133]. SCARA-5 is a type II membrane protein that contains an extracellular spacer

domain, a collagenous domain and a scavenger receptor cysteine rich (SRCR) domain at the N-terminus, and a transmembrane domain. There is also a C-terminus intracellular region. Forming a trimer at the cell surface, SCARA-5 is expressed by a large pattern of tissues including the spleen, heart, and brain. It is expressed by splenic sinusoidal endothelial cells. SCARA-5 was co-localized with VWF and can bind and internalize this factor alone or in a complex with FVIII. The binding and internalization of FVIII to SCARA-5 cannot occur in the absence of VWF [134]. SCARA-5 is expressed by osteoblastic like cells and inhibits their proliferation [135]. SCARA-5 contributes to adipogenesis by facilitating the commitment of mesenchymal stem cells toward adipocyte [136]. Interestingly, a dysregulation of the balance adipogenesis and osteoblastogenesis in favor of adipogenesis led to a decreased bone mineral density in osteoporotic patients [137]. Overall, these data support a potential involvement of SCARA-5 in which FVIII may be associated.

Conclusions

Joint bleedings lead to local inflammation, immune cell recruitment and the differentiation of macrophages. The treatments used in HA have hitherto been based on supplying the FVIII missing from plasma in either its original or recombinant form [138]. Severe hemophiliacs with a FVIII level of less than 1% can benefit from prophylactic treatment for FVIII to limit the occurrence of hematomas and hemarthrosis and to preserve their joints. Alternative therapies are available, in particular Emicizumab. Emicizumab is a bispecific antibody mimicking the hemostatic activity

of FVIII that is available as a prophylactic treatment for severe HA patients as a replacement for exogenous FVIII [139,140]. This molecule mimics the ability of FVIII to bring activated factor IX in proximity to coagulation factor X to catalyze the proteolytic generation of activated factor X and continue the coagulation cascade. Other molecules are also being tested in the treatment of hemophilia, by inhibiting coagulation inhibitors [inhibitor of anti-tissue factor pathways (TFPI), antithrombin inhibitors] in order to restore the hemostatic balance to a static balance. Such approaches can be used in patients with severe hemophilia, and they are interesting tools in the therapeutic arsenal for treating hemophilia. However, it is unknown whether they can restore the non-hemostatic functions of FVIII or whether they may have indirect adverse effects in the long term. Clinical trials are mandatory for comparing both therapeutic approaches, and better understanding the extrahemostatic functions of FVIII is a prerequisite.

Additional information

Competing interests

- Prof. D. Heymann has received research support from Baxter/Baxalta (now a part of Shire)

- Prof. P.E. Monahan holds patents licensed to Asklepios, for which he receives royalties. He has received payment for consultation, services, and for speaking for Asklepios, Chatham LLC, Baxter Healthcare and Pfizer and has additionally consulted for Bayer, Novo Nordisk, and Biogen. He is now an employee of Spark Therapeutics.

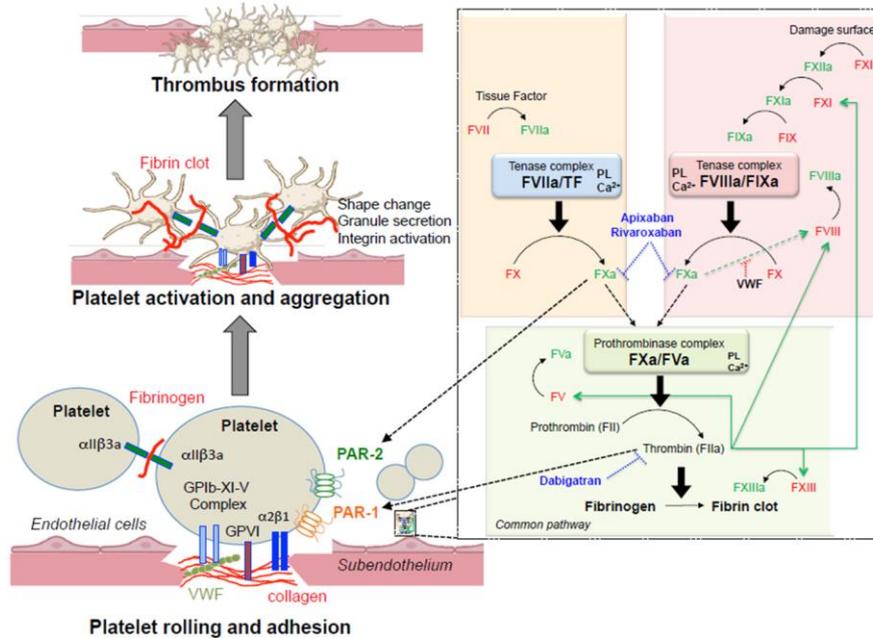


Figure 1: The role of FVIII in the coagulation cascade. The coagulation cascade is dedicated to the formation of fibrin clots. It plays a role in blocking local hemorrhage after vascular breaches. The cascade is articulated around two pathways at the surface of the platelets: i) the intrinsic pathway, which is initiated by contact of the blood with components of the subendothelium, ii) the extrinsic pathway, which is initiated by the tissue factor (TF). After a first step of platelet adhesion to subendothelium components (e.g. $\alpha 2\beta 1$ integrin or GPIb to collagen, GPIIb-XI-V complex to VWF), platelets are activated and their aggregation leads to the thrombus formation. The activation of fibrinogen results in fibrin clots and enhances the platelet aggregation. Along the coagulation cascade, platelets are also activated by thrombin and FXa through cell signaling associated to PAR-1 and PAR-2 respectively. Both pathways lead to activation of FX and the initiation of the common pathway which results in the formation of fibrin clots. PL: phospholipids

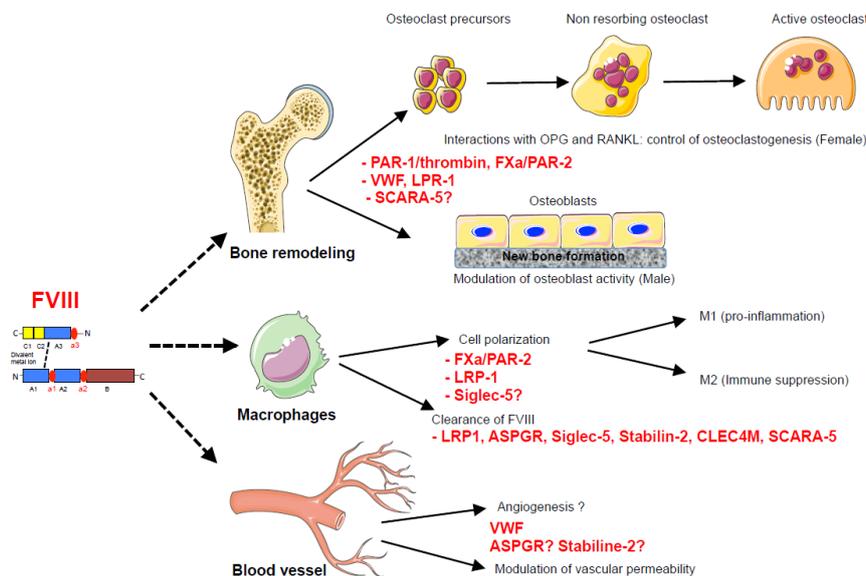


Figure 2: The extrahemostatic functions of FVIII. Recent data from the literature highlighted the non-hemostatic activities of FVIII, including bone, inflammatory and vascular systems. By interacting with OPG and RANKL, the FVIII-VWF complex regulates osteoclast formation and bone resorption. FVIII appears to regulate osteoblast activity via the thrombin and PAR-1 pathways. Sexual dimorphism can be associated with the mechanism driving bone regulation. FVIII is implicated in the inflammatory process by modulating macrophage polarization. Macrophages also contribute to the clearance of FVIII. Large blood neovessels with increased permeability have been described in the synovial tissues of hemophilia patients, as well as in FVIII knockout mice.

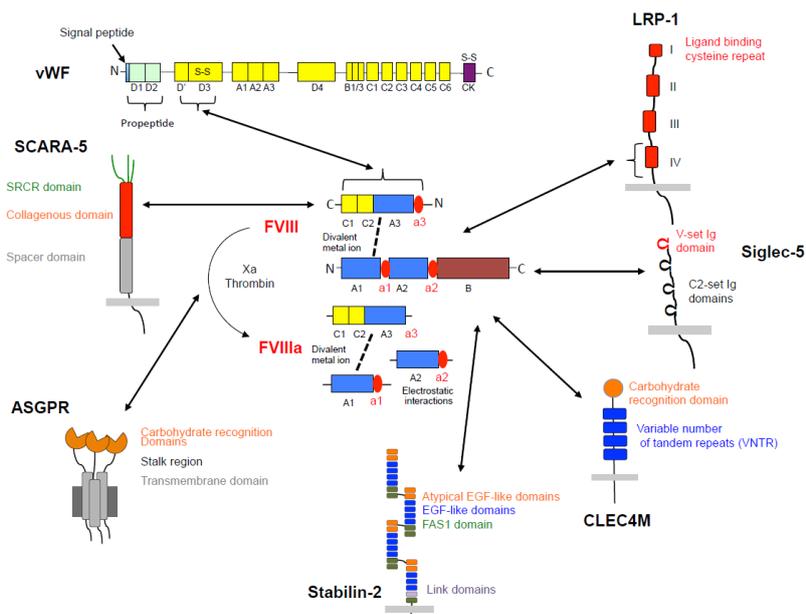


Figure 3: The main receptors controlling the bioavailability of FVIII and VWF. Blood circulating FVIII is a divalent metal ion-dependent heterodimer composed of a light chain (C1-C2-A3 domains) and a heavy chain (A1-12-B). Proteolytic cleavage of FVIII leads to an active form of FVIII which is composed of a heterotrimer. The monomer C1-C2-C3 is linked to the monomer A1 in a divalent metal ion-dependent manner and the monomer A2 binds to the two monomers via electrostatic interactions. In addition to VWF, which interacts with FVIII and increases its half-life, several other receptors of FVIII have been described. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1), asialoglycoprotein receptor (ASGPR), sialic acid binding immunoglobulin-like lectin-5 (Siglec-5), stabilin-2 (STAB-2), C-type lectin domain family 4 member M (CLEC4M), and Scavenger Receptor Class A Member 5 (SCARA-5) can bind to FVIII and control its clearance. In addition to regulating FVIII or the bioavailability of the FVIII-VWF complex, these binding molecules may modulate their biological functions. SRCR: Scavenger receptor cysteine-rich; VNTR: Variable number of tandem repeats.

Table 1 : Main hemophilia A therapies

Therapeutic agents	Mechanism of action	Dosing frequency (prophylaxis)
Plasmatic FVIII concentrates - Pure plasmatic FVIII - Plasmatic FVIII with VWF	Replacement therapy with plasmatic FVIII	1 to 3 times/week (i.v.) 1 to 3 times/week (i.v.)
Recombinant FVIII concentrates) - rFVIII CHO - rFVIII BHK - rFVIII HEK	Replacement therapy with recombinant FVIII from animal or human cells	1 to 3 times/week (i.v.) 1 to 3 times/week (i.v.) 1 to 3 times/week (i.v.)
Extended Half Life FVIII concentrates - rFVIII PEG (rurioctocog alpha pegol, turoctocog alpha pegol, danoctocog alpha pegol) - rFVIII-Fc (efimorotocog alpha) - rFVIII single chain - rFVIIIc-VWF-XTEN (<i>SOBI</i>)	Replacement therapy with recombinant modified FVIII (from CHO, BHK or HEK) which shows extended half-life : Fc fusion, single chain factor VIII or PEGylation	1 to 2 times/week (seldom 3 times/week) (i.v.) 1 to 2 times/week (seldom 3 times/week) (i.v.) 1 to 2 times/week (seldom 3 times/week) (i.v.) 1 to 2 times/week (seldom 3 times/week), ongoing clinical trial (i.v.)
Bispecific antibodies - Emticzumab - Mim8 (<i>NovoNordisk</i>)	Bispecific antibodies mimicking the action of FVIII and allowing the activation of FX into FXa	Once a week or 1/2 weeks or once monthly (s.c.) Ongoing clinical trial (s.c.)
RNA inhibitors (si RNA) - RNAi therapeutic targeting antithrombin (Fitusiran) (<i>Schofl Genzyme</i>)	siRNA targeting the production of the most potent physiological coagulation inhibitor	Once monthly, ongoing clinical trial (s.c.)
Anti-"Tissue Factor Pathway Inhibitor" antibodies - Concuzimab (<i>NovoNordisk</i>) - Befovacimab (<i>Bayer</i>) - Marstacimab (<i>Pfizer</i>)	Anti-TFPI monoclonal antibody that decreases the inhibition of the FVIIa/tissue factor complex after interaction with FXa and thus partially restores thrombin generation	Ongoing clinical trial (s.c.) Once daily to once weekly, Ongoing clinical trial (s.c.) Ongoing clinical trial (s.c.) Ongoing clinical trial (s.c.)
Gene therapy - ssaAAV2/5-hFVIIIco-SQ (<i>Biomarin</i>) - ssaAAV2/LKO3-hFVIIIco-SQ (<i>Sparks Therapeutics</i>) - ssaAAV2/8-hFVIII-SQ (<i>Shire</i>) - ssaAAV2/8-hFVIIIco-V3 (<i>UCLSr Jude</i>)	Adeno-Associated Virus vectors providing the patient liver with a cDNA sequence encoding a functional FVIII	Ongoing clinical trial (i.v.) Ongoing clinical trial (i.v.) Ongoing clinical trial (i.v.) Ongoing clinical trial (i.v.) Ongoing clinical trial (i.v.)

FVIII : Factor VIII, VWF : von Willebrand Factor, BHK cells : Baby Hamster Kidney cells ; CHO cells : Chinese Hamster Ovary cells ; HEK : Human Embryo Kidney cells

Table 2: Clinical trials studying the impact of haemophilia on bone mineral density

Country	Number of patients enrolled	Ages (years)	Bone parameters in HA patients	References
Australia	19 HA A 215 age-matched controls	5.73-18.5 (Mean: 12.2)	- Lower BMD of lumbar spine	[21]
Canada	18 HA A and B 36 age-matched controls	≥ 18	- Vitamin D deficiency in 41% of patients - Lower distal tibia and radius total BMD - Lower trabecular BMD	[22]
Colombia	79 HA A and 11 HA B 90 age-matched controls	> 5	- Lower BMD of femoral neck and hips - Elevated C-reactive protein levels in 44.1% of patients with low BMD (14.8% in normal BMD)	[23]
Czech Republic	56 HA	Median: 12.7 (6.6-19.2)	- Lower BMD at distal radius in 4% of patients - Lower BMC at the diaphysis (total area and cortical thickness) - HA patients significantly shorter as compared to the national reference data - Sarcopenia in HA patients	[24]
Egypt	30 HA 30 age-matched controls	Mean: 4.97	- lower BMD of lumbar spine	[25]
Egypt	40 HA A 10 age-matched controls	Children	- higher serum sclerostin level in HA Low BMD in 37.5% of patients	[26]
Finland	31 HA A and B 50 age-matched controls	4-16	- Lower whole body BMD - Higher urine calcium secretion in HA patients - Urinary calcium excretion correlated inversely with PTH and positively with vitamin D - No significant differences in the bone turnover markers (PINP, ICTP, ALP) - Lower bone resorption marker U-INTP in HA patients - Higher serum Ca level in HA patients	[27]

Greece	17 HA	4.94-18	Only a small number of children and young adults with hemophilia have impaired bone properties	[28]
Greece	100 HA A and B 50 age-matched controls	Mean: 45.8	- Low BMD diagnosed in 26.9% and 20% of HA and control patients respectively - Lower BMD in total hip, femoral neck and great trochanter in HA patients - Vitamin D deficiency in 50% of patients	[29]
India	41 (vs 38 age-matched control patients)	2-18	- Lower BMC and BMD - High prevalence of low vitamin D level - Lower serum phosphorus was and higher alkaline phosphatase levels	[30]
Iran	40 HA A and B	> 20	- Lower BMD in 58% of patients (osteopenia 50%, osteoporosis 8%)	[31]
Iran	42 HA A Age-matched controls	18-72 (Mean 31.1)	- 45.2% of osteopenia and 28.6% of osteoporosis in the spine and/or femur	[32]
Iran	14 HA B 14 age-matched controls	19-55	- Lower BMD in femur regions - Higher ALP and SGOT in HA patients	[33]
Israel	27 HA 33 age-matched controls	7-17.7 (Mean: 11.2)	- Lower muscle strength (especially limb's strength) - No significant differences in bone properties (evaluated by bone speed of sound (SOS) measurement)	[34]
Italy	70	≥ 18	- Low BMD of the femur (74.2%, >30,<71) 52 patients and of the lumbar spine (54.2%,<30y or >71)	[35]
Italy	HA A or B subdivided into three groups of 26 patients each (HIV-HCV co-infected, HCV mono-infected and uninfected)	20-73	- Lower bone mineral density and hypovitaminose D in co-infected groups - Co-infection as comorbidity factor	[36]
Mexico	69 HA A	6-16	- Lower BMD in 34.7% of HA patients - Lower osteocalcin concentration in HA patients and no significant difference in C-telopeptide levels compared to the reference data	[37]

Sweden	26 severe HA A or B 16 mild HA A or B All patients received prophylactic treatment	> 18 and < 65 . 40.2+/-3.3 (severe HA) 33.6+/-2.1 (mild HA)	- No BMD alteration	[38]
Sweden	39 HA A and B <i>Group A</i> (started prophylaxis at age of ≤3 years; n = 22); <i>Group B</i> (at age of >3 years; n = 15)	Mean: 26 (HA A), 42 (HA B)	- Group A : BMD similar to the reference population - Groupe B : lower BMD compared to the reference population	[39]
Turkey	41 HA A (vs 40 control patients)	18-56 (median: 26)	- Lower femoral neck and total hip BMD - Osteoporosis in 60% of cases - Osteopenia in 20% of cases - Vitamine D insufficiency or deficiency in 60% of cases	[39]
Turkey	51 HA A and 10 HA B	20-63 (average : 37.8)	- Low BMD in 48% of patients - No correlation between BMD and vitamin levels	[40]
Turkey	39	Children	- Low BMD in 78.4% of patients - Vitamin D deficiency in 87.2% of patients - Negative correlation between PTH and Z-score	[41]
Turkey	29 HA A and 6 HA B	> 18	- Lower BMD (34% decrease) - Lower levels of vitamin D, calcium and testosterone - Higher levels of PTH, PINP and activated partila thromboplastin time - No significant difference in NLR, PLR, phosphorus, thyroid-stimulating hormone, and uNTX levels	[42]
Turkey	39 HA A and 10 HA B	average 36 ± 11.35	- Lower BMD in 34.8% of patients of less than 50y - Osteoporosis in 66.6% of patients older than 50y - Vitamin D deficiency in 77.5% of patients with no correlation with BMD	[43]
Turkey	44 HA 40 age-matched controls	3-18	- lower BMD of lumbar spine - Higher levels of PTH levels in HA patients - Lower concentrations of vitamin D, osteocalcin, calcitonin	[44]

UK	37 HA A	> 18	- 5% of osteoporosis - Lower BMD in 24% of patients - Vitamin D deficiency in 91% of patients similarly to the control group	[45]
USA	316 HA A and 66 HA B	20 (HA A) 26 (HA B)	- Higher fracture incidence (24.8 fractures per 1000 patient-years, than 9.6 fractures per 1000 patient-years in the control population)	[46]
USA	88 HA A and B	Median : 41	- < 50y : low BMD (21%) and low normal BMD (39%) The low BMD was independently associated with increasing hemophilic arthropathy - > 50y : osteoporosis (38%), osteopenia (42%)	[47]
USA	25 HA A 5 HA B	18-66 (Median: 41.5)	- Lower BMD in the lumbar spine (20%), femoral neck (47%), hip (20%) - Osteopenia in HA patients (43%) - Osteoporosis in HA patients (27%) - No significant differences in ALP, TSH, calcium, testosterone - Correlation between vitamin D levels and osteoporosis	[48]

HA : Hemophilia ; BMD : Bone Mineral Density ; SGOT : serum glutamic oxaloacetic transaminase

References

- [1] Carcao MD. The diagnosis and management of congenital hemophilia. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38:727-34.
- [2] Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias- from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med* 2001; 344 :17773-79.
- [3] Song MJ, Kim HJ, Yoo KY, Park IA, Lee KO, Ki CS, et al. Molecular characterization of female hemophilia A by multiplex ligation-dependent probe amplification analysis and X-chromosome inactivation study. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2011; 22:211-14
- [4] Valentino LA, Khair K. Prophylaxis for hemophilia A without inhibitors: treatment options and considerations. *Expert Rev Hematol* 2020; 13:731-43.
- [5] Nogami K, Shima M, Hosokawa K, Suzuki T, Koide T, Saenko EL, et al. Role of factor VIII C2 domain in factor VIII binding to factor Xa. *J Biol Chem* 1999; 274 :31000-07

- [6] Sang Y, Roest M, de Laat B, de Groot PG, Huskens D. Interplay between platelets and coagulation. *Blood Rev* 2020; (in press).
- [7] 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; 128:2007-16.
- [8] Pool JG, Gershgold EJ, Pappenhagen AR. High-potency antihaemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate. *Nature* 1964; 203:312.
- [9] Nathwani AC, Davidoff AM, Tuddenham EGD. Advances in Gene Therapy for Hemophilia. *Hum Gene Ther* 2017; 28:1004-12.
- [10] Tiede A, Brand B, Fischer R, Kavakli K, Lentz SR, Matsushita T, et al. Enhancing the pharmacokinetic properties of recombinant factor VIII: first-in-human trial of glycoPEGylated recombinant factor VIII in patients with hemophilia A. *J Thromb Haemost* : 2013; 11:670-8.
- [11] Powell JS, Josephson NC, Quon D, Ragni MV, Cheng G, Li E, et al. Safety and prolonged activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in hemophilia A patients. *Blood* 2012; 119:3031-77.
- [12] Powell JS, Pasi KJ, Ragni MV, Ozelo MC, Valentino LA, Mahlangu JN, et al. Phase 3 study of recombinant factor IX Fc fusion protein in hemophilia B. *N Engl J Med* 2013; 369:2313-23.
- [13] Seth Chhabra E, Liu T, Kulman J, Patarroyo-White S, Yang B, Lu Q, et al. BIVV001, a new class of factor VIII replacement for hemophilia A that is independent of von Willebrand factor in primates and mice. *Blood* 2020; 135:1484-96.
- [14] Santagostino E, Martinowitz U, Lissitchkov T, Pan-Petes B, Hanabusa H, Oldenburg J, et al. Long-acting recombinant coagulation factor IX albumin fusion protein (rIX-FP) in hemophilia B: results of a phase 3 trial. *Blood* 2016; 127:1761-69.
- [15] Santagostino E, Auerswald G, Benson G, Dolan G, Jiménez-Yuste V, Lambert T, et al. Switching treatments in haemophilia: is there a risk of inhibitor development? *Eur J Haematol* 2015; 94:284-9.
- [16] Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, Muto A, Kojima T, Soeda T, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med* 2012; 18:1570-74.
- [17] Sehgal A, Barros S, Ivanciu L, Cooley B, Qin J, Racie T, et al. An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nature Med* 2015; 21:492-7.
- [18] Dockal M, Hartmann R, Fries M, Thomassen MCLGD, Heinzmann A, Ehrlich H, et al. Small peptides blocking inhibition of factor Xa and tissue factor-factor VIIa by tissue factor pathway inhibitor (TFPI). *J Biol Chem* 2014; 289:1732-41.
- [19] George LA, Sullivan SK, Giermasz A, Rasko JEJ, Samelson-Jones BJ, Ducore J, et al. Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity

- Factor IX Variant. *N England J Med* 2017; 377:2215-27.
- [20] Rangarajan S, Walsh L, Lester W, Perry D, Madan B, Laffan M, et al. AAV5-Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. *N England J Med* 2017; 377:2519-30.
- [21] Barnes C, Wong P, Egan B, Speller T, Cameron F, Jones G, et al. Reduced bone density among children with severe hemophilia. *Pediatrics* 2004; 114:e177-81.
- [22] Lee A, Boyd SK, Kline G, Poon MC. Premature changes in trabecular and cortical microarchitecture result in decreased bone strength in hemophilia. *Blood* 2015; 125:2160-63.
- [23] Sossa Melo CL, Wandurraga EA, Peña AM, Jiménez SI, Salazar LA, Ochoa ME, et al. Low bone mineral density and associated factors in patients with haemophilia in Colombia. *Haemophilia* 2018; 24:e222-29.
- [24] Soucek O, Komrska V, Hlavka Z, Cinek O, Rocek M, Zemkova D, et al. Boys with haemophilia have low trabecular bone mineral density and sarcopenia, but normal bone strength at the radius. *Haemophilia* 2012; 18:222-8.
- [25] Abdelrazik N, Reda M, El-Ziny M, Rabea H. Evaluation of bone mineral density in children with hemophilia: Mansoura University children hospital (MUCH) experience, Mansoura, Egypt. *Hematology* 2007; 12:431-7.
- [26] El-Mikkawy DME, Elbadawy MA, Abd El-Ghany SM, Samaha D. Serum sclerostin level and bone mineral density in pediatric hemophilic arthropathy. *Indian J Pediatr* 2019; 86:515-9.
- [27] Ranta S, Viljakainen H, Mäkipernaa A, Mäkitie O. Hypercalciuria in children with haemophilia suggests primary skeletal pathology. *Br J Haematol* 2011; 153:364-71.
- [28] Christoforidis A, Economou M, Papadopoulou E, Kazantzidou E, Gompakis N, Athanassiou-Metaxa M. Bone status of children with hemophilia A assessed with quantitative ultrasound sonography (QUS) and dual energy X-ray absorptiometry (DXA). *J Pediatr Hematol Oncol* 2010; 32:e259-63.
- [29] Anagnostis P, Vakalopoulou S, Slavakis A, Charizopoulou M, Kazantzidou E, Chrysopoulou T, et al. Reduced bone mineral density in patients with haemophilia A and B in Northern Greece. *Thromb Haemost* 2012; 107:545-51.
- [30] Ashritha A, Delhi Kumar CG, Sahoo J, Nalini P. Evaluation of bone mineral density in children with hemophilia: an observational case-control study. *J Pediatr Hematol Oncol* 2019; 41:511-4.
- [31] Naderi A, Nikvarz M, Arasteh M, Shokoohi M. Osteoporosis/osteopenia and hemophilic arthropathy in severe hemophilic patients. *Arch Iran Med* 2012; 15:82-4.
- [32] Roushan N, Meysamie A, Managhchi M, Esmaili J, Dormohammadi T. Bone mineral density in hemophilia patients. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2014; 30:351-5.
- [33] Mansouritorghabeh H, Rezaieyazdi Z, Saadati N, Saghafi M, Mirfeizi Z, Rezai J. Reduced bone density in individuals

- with severe hemophilia B. *Int J Rheum Dis* 2009; 12: 125-9.
- [34] Falk B, Portal S, Tikitsky R, Zigel L, Weinstein Y, Constantini N, et al. Bone properties and muscle strength of young haemophilia patients. *Haemophilia* 2005; 11:380-6.
- [35] Ulivieri FM, Rebagliati GAA, Piodi LP, Solimeno LP, Pasta G, et al. Usefulness of bone microarchitectural and geometric DXA-derived parameters in haemophilic patients. *Haemophilia* 2018; 24:980-7.
- [36] Linari S, Montorzi G, Bartolozzi D, Borderi M, Melchiorre D, Benelli M, et al. Hypovitaminosis D and osteopenia/osteoporosis in a haemophilia population: a study in HCV/HIV or HCV infected patients. *Haemophilia* 2013; 19:126-33.
- [37] Tiacuilo-Parra A, Villela-Rodríguez J, Garibaldi-Covarrubias R, Soto-Padilla J, Orozco-Alcala J. Bone turnover markers and bone mineral density in children with haemophilia. *Haemophilia* 2011; 17:657-61.
- [38] Khawaji M, Akesson K, Berntorp E. Long-term prophylaxis in severe haemophilia seems to preserve bone mineral density. *Haemophilia* 2009; 15:261-6.
- [39] Khawaji M, Astermark J, Von Mackensen S, Akesson K, Berntorp E. Bone density and health-related quality of life in adult patients with severe haemophilia. *Haemophilia* 2011; 17:304-11.
- [40] Ekinci O, Demircioglu S, Dogan A, Merter M, Yildiz S, Demir C. Decreased bone mineral density and associated factors in severe haemophilia A patients: A case-control study. *Haemophilia* 2019; 25:e315-21.
- [41] Sahin S, Sadri S, Baslar Z, Ar MC. Osteoporosis in patients with hemophilia: single-center results from a middle-income country. *Clin Appl Thromb Hemost* 2019; 25:1076029619861689.
- [42] Culha V, Akpınar Tekgündüz S, Yarali HN, Tunç B, Özbek NY. Impact of prophylaxis on bone mineral metabolism in children with hemophilia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2019; 41:121-3.
- [43] Dagli M, Kutlucan A, Abusoglu S, Basturk A, Sozen M, Kutlucan L, Unlu A, Yilmaz F. Evaluation of bone mineral density (BMD) and indicators of bone turnover in patients with hemophilia. *Bosn J Basic Med Sci* 2018;18(2):206-210.
- [44] Kiper Unal HD, Comert Ozkan M, Atilla FD, Demirci Z, Soyer N, Yildirim Sirmsir I, Omur O, Capaci K, Saydam G, Sahin F. Evaluation of bone mineral density and related parameters in patients with haemophilia: a single center cross-sectional study. *Am J Blood Res* 2017;7(5):59-66.
- [45] Alioglu B, Selver B, Ozsoy H, Koca G, Ozdemir M, Dallar Y. Evaluation of bone mineral density in Turkish children with severe haemophilia A: Ankara hospital experience. *Haemophilia*. 2012;18(1):69-74.
- [46] Wells AJ, McLaughlin P, Simmonds JV, Prouse PJ, Prelevic G, Gill S, et al. A case-control study assessing bone mineral density in severe haemophilia A in the UK. *Haemophilia* 2015; 21:109-15.

- [47] Gay ND, Lee SC, Liel MS, Sochacki P, Recht M, Taylor JA. Increased fracture rates in people with haemophilia: a 10-year single institution retrospective analysis. *Br J Haematol* 2015; 170:584-6.
- [48] Kempton CL, Antun A, Antonucci DM, Carpenter W, Ribeiro M, Stein S, Slovensky L et al. Bone density in haemophilia: a single institutional cross-sectional study. *Haemophilia* 2014; 20:121-8.
- [49] Gerstner G, Damiano ML, Tom A, Worman C, Schultz W, Recht M, et al. Prevalence and risk factors associated with decreased bone mineral density in patients with haemophilia. *Haemophilia* 2009; 15:559-65.
- [50] Rodriguez-Merchan EC, Valentino LA. Increased bone resorption in hemophilia. *Blood Rev* 2019; 33:6-10
- [51] Goldscheitter G, Recht M, Sochacki P, Manco-Johnson M, Taylor JA. Biomarkers of bone disease in persons with hemophilia. *Haemophilia* 2020; (in press).
- [52] Gerstner G, Damiano ML, Tom A, Worman C, Schultz W, Recht M, et al. Prevalence and risk factors associated with decreased bone mineral density in patients with haemophilia. *Haemophilia* 2009; 15:559-65
- [53] Gay ND, Lee SC, Liel MS, Sochacki P, Recht M, Taylor JA. Increased fracture rates in people with haemophilia: a 10-year single institution retrospective analysis. *Br J Haematol* 2015; 170:584-6.
- [54] Caviglia H, Landro ME, Galatro G, Candela M, Neme D. Epidemiology of fractures in patients with haemophilia. *Injury* 2015; 46:1885-90.
- [55] Khawaji M, Akesson K, Berntorp E. Long-term prophylaxis in severe haemophilia seems to preserve bone mineral density. *Haemophilia* 2009; 15:261-6.
- [56] Andrawes NG, Fayek NH, El-dihn NS, Mostafa RA. Effect of low-dose factor VIII prophylaxis therapy on bone mineral density and 25(OH) vitamin D level in children with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2020; 26:325-32.
- [57] Benslimane-Ahmin Z, Heymann D, Dizier B, Lokajczyk A, Brion R, Laurendeau I, et al. Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cells properties. *J Thromb Haemost* 2011; 9:834-43.
- [58] Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Rédini F, Heymann D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:2334-50.
- [59] Baud'huin M, Duplomb L, Teletchea S, Lamoureux F, Ruiz-Velasco C, et al. Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013; 24:401-9.
- [60] Zannettino AC, Holding CA, Diamond P, Atkins GJ, Kostakis P, Farrugia A, et al. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *J Cell Physiol* 2005; 204:714-23

- [61] Baud'huin M, Duplomb L, Téletchéa S, Charrier C, Maillason M, Fouassier M, et al. Factor VIII-von Willebrand factor complex inhibits osteoclastogenesis and controls cell survival. *J Biol Chem* 2009; 84:31704-13.
- [62] Shahbazi S, Lenting PJ, Fribourg C, Terraube V, Denis CV, Christophe OD. Characterization of the interaction between von Willbrand factor and osteoprotegerin. *J Thromb Haemost* 2007; 5:1956-62.
- [63] Liel MS, Greenberg DL, Recht M, Vanek C, Klein RF, Taylor JA. Decreased bone density and bone strength in a mouse model of severe factor VIII deficiency. *Br J Haematol* 2012; 158:140-3.
- [64] Recht M, Liel MS, Turner RT, Klein RF, Taylor JA. The bone disease associated with factor VIII deficiency in mice is secondary to increased bone resorption. *Haemophilia* 2013; 19:908-12.
- [65] Taves S, Sun J, Livingston EW, Chen X, Amiaud J, Brion R, et al. Hemophilia A and B mice, but not VWF^{-/-} mice, display bone defects in congenital development and remodeling after injury. *Sci Rep* 2019; 9:14428.
- [66] Lau AG, Sun J, Hannah WB, Livingston EW, Heymann D, Bateman TA, et al. Joint bleeding in factor VIII deficient mice causes an acute loss of trabecular bone and calcification of joint soft tissues which is prevented with aggressive factor replacement. *Haemophilia* 2014, 20:716-22.
- [67] Larson E, Taylor JA. Factor VIII plays a direct role in osteoblast development. *Blood* 2017; 130: 3661.
- [68] Weitzmann MN, Roser-Page S, Vikulina T, Weiss D, Hao L, Baldwin WH, et al. Reduced bone formation in males and increased bone resorption in females drive bone loss in hemophilia A mice. *Blood Adv* 2019; 3:288-300.
- [69]. Mackie EJ, Loh LH, Sivagurunathan S, Uaesoontrachoon K, Yoo HJ, Wong D, et al. Protease-activated receptors in the musculoskeletal system. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40:1169-84.
- [70] Pagel CN, Song SJ, Loh LH, Tudor EM, Murray-Rust TA, Pike RN, et al. Thrombin-stimulated growth factor and cytokine expression in osteoblasts is mediated by protease-activated receptor-1 and prostanoids. *Bone* 2009; 44:813-21.
- [71] Aronovich A, Nur Y, Shezen E, Rosen C, Zlotnikov Klionsky Y, et al. A novel role for factor VIII and thrombin/PAR1 in regulating hematopoiesis and its interplay with the bone structure. *Blood* 2013; 122:2562-71.
- [72] Tudpor K, van des Eerden BJC, Jongwattanapisan P, Roelofs JJTJ, van Leuwen JPTM, Bindels RJM, et al. Thrombin receptor deficiency leads to a high bone mass phenotype by decreasing the RANKL/OPG ratio. *Bone* 2015; 72:14-22.
- [73] Taylor HJ, Goldscheitter G, Taylor JA. The Role of thrombin deficiency on skeletal health. *Blood* 2018; 132:5012.

- [74] Georgy SR, Pagel CN, Hhasem-Zadeh, Zebaze RMD, Pike RN, Sims NA, et al. Proteinase-activated receptor-2 is required for normal osteoblast and osteoclast differentiation during skeletal growth and repair. *Bone* 2012; 50 :704-12.
- [75] Brent MB, Thomsen JS, Bruël A. The effect of oral dabigatran etelxate on bone density, strength, and microstructure in healthy mice. *Bone Rep* 2017; 8:9-17.
- [76] Huang HK, Liu PP, Lin SM, Hsu JY, Peng CC, Munir KM, et al. Risk of developing diabetes in patients with atrial fibrillation taking non-vitamin K antagonist oral anticoagulants or warfarin: A nationwide cohort study. *Diabetes Obes Metab* 2021; 23:499-507.
- [77] Somjen D, Sharfman ZT, Katzburg S, Sharon O, Maman E, Salai M, et al. Rivaroxaban significantly inhibits the stimulatory effects of bone-modulating hormones: In vitro study of primary female osteoblasts. *Connect Tissue Res* 2017; 58:215-20.
- [78] Jardim LL, Chaves DG, Silveira-Cassette ACO, Silva ACSE, Santana MP, Cerqueira MH, et al. Immune status of patients with haemophilia A before exposure to factor VIII: first results from the HEMFIL study. *Br J Haematol* 2017; 178:971-8.
- [79] Nieuwenhuizen L, Schugens REG, Coeveled K, Mastbergen SC, Roosendaal G, Biesma DH, et al. Hemarthrosis in hemophilic mice results in alterations in M1-M2 monocyte/macrophage polarization. *Thromb Res* 2014;133:390-5.
- [80] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 2018; 233:6425-40.
- [81] Knowles LM, Kagiri D, Bernard M, Schwarz EC, Eichler H, Pilch J. Macrophage polarization is deregulated in haemophilia. *Thromb Haemost* 2019; 119:234-45.
- [82] Kis-Toth K, Rajani GM, Simpson A, Henry KL, Dumont J, Peters RT, et al. Recombinant factor VIII Fc fusion protein drives regulatory macrophage polarization. *Blood Adv* 2018; 2:2904-16.
- [83] Kannicht C, Danßmann I, Weilandt, Derkow K, Kohla G, Geyer H. Factor VIII Fc Fusion Protein but not FVIII Drives Human Monocyte-Derived Dendritic Cell Activation via FcγRIIa. *Hemasphere* 2020; 4:e330.
- [84] Cooke EJ, Zhou JY, Wyseure T, Joshi S, Bhat V, Durden DL, et al. Vascular permeability and remodelling coincide with inflammatory and reparative processes after joint bleeding in factor VIII-deficient mice. *Thromb Haemost* 2018; 118:1036-47.
- [85] Cooke EJ, Wyseure T, Zhou JY, Gopal S, Nasamran CA, Fisch KM, et al. Mechanism of vascular permeability and remodeling associated with hemarthrosis in factor VIII-deficient mice. *J Thromb Haemost* 2019; 17:1815-26.
- [86] Lai JD, Cartier D, Hartholt RB, Swystun LL, van Velzen AS ; den

- Haan JMMM, et al. Early cellular interactions and immune transcriptome profiles in human factor VIII-exposed hemophilia A mice. *J Thromb Haemost* 2018; 16:533-45.
- [87] Ding Y, Li X, Zhou M, Cai L, Tang H, Xie T, et al. Factor Xa inhibitor rivaroxaban suppresses experimental abdominal aortic aneurysm progression via attenuating aortic inflammation. *Vascul Pharmacol* 2020; 21:106818.
- [88] Ishikawa H, Shimada M, Narita M, Narita I, Kimura Y, Tanaka M, et al. Rivaroxaban, a direct factor Xa inhibitor, ameliorates hypertensive renal damage through inhibition of the inflammatory response mediated by protease-activated receptor pathway. *J Am Heart Assoc* 2019; 8:e012195.
- [89] Shi M, Wang L, Zhou J, Ji S, Wang N, Tong L, et al. Direct factor Xa inhibition attenuates acute lung injury progression via modulation of the PAR-2/NF-kappaB signaling pathway. *Am J Transl Res* 2018; 10:2335-49.
- [90] Hara T, Phuong PT, Fukuda D, Yamaguchi K, Murata C, Nishimoto S, et al. Protease-activated receptor-2 plays a critical role in vascular inflammation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2018; 138:1706-19.
- [91] Hara T, Fukuda D, Tanaka K, Higashikuni, Hirata Y, Nishimoto S, et al. Rivaroxaban, a novel oral anticoagulant, attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 2015; 242:639-46.
- [92] Kelso EB, Ferrell WR, Lockhart JC, Elias-Jones I, Hembrough T, Dunning L, et al. Expression and proinflammatory role of proteinase-activated receptor 2 in rheumatoid synovium: ex vivo studies using a novel proteinase-activated receptor 2 antagonist. *Arthritis Rheum* 2007; 56:765-71.
- [93] Zuo P, Zuo Z, Wang X, Chen L, Zheng Y, Ma G, et al. Factor Xa induces pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages via protease-activated receptor-2 activation. *Am J Transl Res* 2015; 7:2326-34.
- [94] Chen L, Gao B, Zhang Y, Lu H, Pan L, Yin L, et al. PAR2 promotes M1 macrophage polarization and inflammation via FOXO1 pathway. *J Cell Biochem* 2019; 120:9799-809.
- [95] Husa C, Ortiz AC, Dunning L, McGavin L, Bennett L, McIntosh K, et al. Proteinase-activated receptor-2 modulates OA-related pain, cartilage and bone pathology. *Ann Rheum Dis* 2016; 75:1989-97.
- [96] Garcia-Gonzalez G, Sanchez-Gonzalez, Hernandez-Bello, Gonzalez GM, Franco-Molina MA, Coronado-Verda EE, et al. Triggering of protease-activated receptors (PARs) induces alternative M2 macrophage polarization with impaired plasticity. *Mol Immunol* 2019; 114:278-88.
- [97] Toni R, Di Conza G, Barbaro F, Zini N, Consolini E, Dallatana D, et al. Microtomography of immune cells in

- osteoporosis and bone lesions by endocrine disruptors. *Front Immunol* 2020; 11:1737.
- [98] Swystun LL, Ogiwara K, Rawley O, Brown C, Georgescu I, Hopman W, et al. Genetic determinants of VWF clearance and FVIII binding modify FVIII pharmacokinetics in pediatric hemophilia A patients. *Blood* 2019; 134:880-91.
- [99] Navarrete A, Dasgupta S, Delignat S, Caligiuri G, Christophe OD, Bayry J, et al. Splenic marginal zone antigen-presenting cells are critical for the primary allo-immune response to therapeutic factor VIII in hemophilia. *J Thromb Haemost* 2009; 7:1816-23.
- [100] Van Schooten CJ, Shahbazi S, Groot E, Oortwijn BD, van den Berg HM, Denis CV, et al. Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo. *Blood* 2008; 112:1704-12.
- [101] PrabhuDas MR, Baldwin CL, Bollyky PL, Bowdish DME, Drickamer K, Febbraio M, et al. A consensus definitive classification of scavenger receptors and their roles in health and disease. *J Immunol* 2017; 198:3775-89.
- [102] Young PA, Migliorini M, Strickland DK. Evidence that factor VIII forms a bivalent complex with the low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 1 (LRP1): identification of cluster IV on LRP1 as the major binding site. *J Biol Chem* 2016; 291:26035-44.
- [103] 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; 274:37685-92.
- [104] Lenting PJ, Neels JG, van den Berg BM, Clijsters PP, Meijerman DW, Pannekoek H, et al. The light chain of FVIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 1999; 274:23734-39.
- [105] Sarafanov AG, Ananyeva NM, Shima M, Saenko EL. Cell surface heparan sulfate proteoglycans participate in factor VIII catabolism mediated by low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 2001; 276:11970-9.
- [106] Bovenschen N, Herz J, Grimbergen JM, Lenting PJ, Havekes LM, Mertens K, et al. Elevate plasma factor VIII in a mouse model of low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency. *Blood* 2003; 101:3933-39.
- [107] 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; 106:906-12.
- [108] Kurasawa JH, Shestopal SA, Woodle SA, Mikhail Ovanesov V, Lee TK, AG Sarafanov. Cluster III of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 binds activated blood coagulation factor VIII. *Biochemistry* 2015; 481-9.
- [109] Young PA, Migliorini M, Strickland DK. Evidence That Factor VIII Forms a Bivalent Complex with the Low

- Density Lipoprotein (LDL) Receptor-related Protein 1 (LRP1): identification of cluster IV on LRP1 as the major binding site. *J Biol Chem.* 2016; 291:26035-44.
- [110] Kohara Y, Haraguchi R, Kitazawa R, Kitazawa S. Knockdown of Lrp1 in RAW264 cells inhibits osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast interactions in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2020; 523:961-5.
- [111] Bartelt A, Behler-Janbeck F, Beil FT, Koehne, Müller B, Schmidt T, et al. Lrp1 in osteoblasts controls osteoclast activity and protects against osteoporosis by limiting PDGF-RANKL. Signaling. *Bone Res* 2018; 26:6:4.
- [112] Grey A, Banovic T, Zhu Q, Watson M, Callon K, Palmano K, et al. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a mitogenic receptor for lactoferrin in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 2004; 18:2268-78.
- [113] Vi L, Bath GS, Soderblom EJ, Whetstone H, Wei Q, Furman B, et al. Macrophage cells secrete factors including LRP1 that orchestrate the rejuvenation of bone repair in mice. *Nat Commun* 2018; 9:5191.
- [114] Bloem E, Karpf DM, Norby PL, Johansen PB, Loftager M, Rahbek-Nielsen, et al. Factor VIII with a 237 amino acid B-domain has an extended half-life in F8-knockout mice. *J Thromb Haemost* 2019; 17:350-60.
- [115] Pipe SW. Functional roles of the factor VIII B domain. *Haemophilia* 2009; 15:1187-96.
- [116] Bovenschen N, Rijken DC, Havekes LM, van Vlijmen BJ, Mertens K. The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J Thromb Haemost* 2005; 3:1257-65.
- [117] Grewal PK, Uchiyama S, Ditto D, Varki N, Le DT, Nizet V, et al. The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis. *Nat Med* 2008; 14:648-55.
- [118] Valladeau J, Duvert-Frances V, Pin JJ, Kleijmeer MJ, Ait-Yahia S, Ravel O, et al. Immature human dendritic cells express asialoglycoprotein receptor isoforms for efficient receptor-mediated endocytosis. *J Immunol* 2001; 167:5767-74.
- [119] Connolly NP, Jone M, Watt S. Human Siglec-5: tissue distribution, novel isoform and domain specificities for sialic acid-dependent ligand interactions. *Br J Hematol* 2002; 119:221-38.
- [120] Pegon JN, Kurdi M, Casari C, Odouard S, Denis CV, Christophe OD, et al. Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica* 2012; 97:1855-63.
- [121] Pepin M, Mezouar S, Pegon J, Muczynski V, Adam F, Bianchini EP, et al. Soluble Siglec-5 associates to PSGL-1 and displays anti-inflammatory activity. *Sci Rep* 2016; 6:37953.
- [122] Swystun LL, Lai JD, Notley C, Georgescu I, Paine AS, Mewburn J, et al. The endothelial cell receptor stabilin-2 regulates VWF-FVIII

- complex half-life and immunogenicity. *J Clin Invest* 2018; 128:4057-73.
- [123] Huffman JE, de Vries PS, Morrison AC, Sabater-Lleal M, Kacprowski T, Auer PL, et al. Rare and low-frequency variants and their association with plasma levels of fibrinogen, FVII, FVIII, and VWF. *Blood* 2015; 126:e19-29.
- [124] Hare AK, Harris EN. Tissue-specific splice variants of HARE/Stabilin-2 are expressed in bone marrow, lymph node, and spleen. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 456:257-61.
- [125] Park SY, IS Kim. Stabilin receptors: role as phosphatidyl serine receptors. *Biomolecules* 2019; 9:387.
- [126] Saadaat R, Abdul-Ghafar J, Ud Din N, Haidary AM. Anal extraskeletal osteosarcoma in a man: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep* 2020; 14:51
- [127] Kim SY, Lee EH, Park SY, Choi H, Koh JT, Kim IS, et al. Ablation of stabilin-1 enhances bone-resorbing activity in osteoclasts in vitro. *Calcif Tissue Int* 2019; 105:205-14.
- [129] Jung MY, Park SY, Kim IS. Stabilin-2 is involved in lymphocyte adhesion to the hepatic sinusoidal endothelium via the interaction with alphaMbeta2 integrin. *J Leukoc Biol* 2007; 82:1156-65.
- [130] Khoo US, Chan KY, Chan VS, Lin CL. DC-SIGN and L-SIGN: the SIGNs for infection. *J Mol Med (Berl)* 2008; 86:861-74.
- [131] Rydz N, Swystun LL, Notley C, Paterson AD, Riches JJ, Sponagle K, et al. The C-type lectin receptor CLEC4M binds, internalizes, and clears von Willebrand factor and contributes to the variation in plasma von Willebrand factor levels. *Blood* 2013; 121:5228-37.
- [132] Swystun LL, Notley C, Georgescu I, Lai JD, Nesbitt K, James PD, et al. The endothelial lectin clearance receptor CLEC4M binds and internalizes factor VIII in a VWF-dependent manner. *J Thromb Haemost* 2019; 17:681-94.
- [132] Chen L, Zheng S. Understand variability of COVID-19 through population and tissue variations in expression of SARS-CoV-2 host genes. *Inform Med Unlocked* 2020; 21:100443.
- [133]. Smith NL, Chen MH, Dehghan A, Strachan DP, Basu S, Soranzo N, et al. Novel associations of multiple genetic loci with plasma levels of factor VII, factor VIII, and von Willebrand factor: The CHARGE (Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology) Consortium. *Circulation* 2010; 121:1382-92.
- [134]. Swystun LL, Ogiwara K, Lai JD, Ojala JRM, Rawley O, Lassalle F, et al. The scavenger receptor SCARA5 is an endocytic receptor for von Willebrand factor expressed by littoral cells in the human spleen. *J Thromb Haemost* 2019; 17:1384-96.
- [135] Wen X, Wang N, Zhang F, Dong C. Overexpression of SCARA-5 inhibits tumor proliferation and invasion in osteosarcoma via suppression of the FAK signaling pathway. *Mol Med Rep* 2016; 13:2885-91.

- [136] Lee H, Lee YJ, Choi H, Seok JW, Yoon BK, Kim D, et al. SCARA-5 plays a critical role in the commitment of mesenchymal stem cells to adipogenesis. *Sci Rep* 2017; 7:14833.
- [137] Li J, L X, Zhang L. The role of bone marrow microenvironment in governing the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis. *Aging Dis* 2015; 7:514-25.
- [138]. Franchini M, Mannucci PM. Hemophilia A in the third millennium. *Blood Rev* 2013; 27:179-84.
- [139]. Mahlangu JN. Bispecific antibody Emicizumab for haemophilia A: a breakthrough for patients with inhibitors. *BioDrugs* 2018; 32:561-70.
- [140]. Lenting PJ, Denis CV, Chirstophe OD. Emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood* 2027; 130:2463-2468.

Annexe 2 : Liste des publications

Marie Cadé, Javier Muñoz-García, Denis Cochonneau, Emilie Moranton, Mathias Chatelais, Lokajczyk Anna, Heymann Marie-Françoise, Catherine Boisson-Vidal, Heymann Dominique. **FVIII regulates the transcriptomic profile of endothelial cells: functional impact in the blood barrier and macrophage behaviour.** Manuscrit en préparation.

Marie Cadé, Javier Muñoz-García, Marc Fouassier, Antoine Babuty, Marie-Françoise Heymann, Paul E. Monahan, Dominique Heymann. **Extrahemostatic activities and interactions of Factor VIII: a specific focus on bone and inflammation.** Soumis pour publication.

Mathilde Mullard, Marie Cadé, Sarah Morice, Maryne Dupuy, Geoffroy Danieau, Jérôme Amiaud, Sarah Renault, Frédéric Lézet, Régis Brion, Rose Anne Thepault, Benjamin Ory, François Lamoureux, Isabelle Corre, Bénédicte Brounais-LeRoy, Françoise Rédini and Franck Verrecchia. **Sonic Hedgehog Signature in Pediatric Primary Bone Tumors: Effects of the GLI Antagonist GANT61 on Ewing's Sarcoma Tumor Growth.** Cancers 2020, 12(11), 3438; <https://doi.org/10.3390/cancers12113438>

Marta Tellez-Gabriel, Denis Cochonneau, Marie Cadé, Camille Jubelin, Marie-Françoise Heymann and Dominique Heymann. **Circulating Tumor Cell-Derived Pre-Clinical Models for Personalized Medicine.** Cancers 2019, 11(1), 19; <https://doi.org/10.3390/cancers11010019>

Annexe 3 : Liste des communications

Marie CADÉ, Denis COCHONNEAU, Ahlem ZNAIDI, Anna LOKAJCZYK, Catherine BOISSON-VIDAL, Dominique HEYMANN. **Vascular disorders in Haemophilia A: functional impacts of factor VIII and osteoprotegerin**. Mini-symposium organisé par la Société Française d'Angiogenèse. Présentation d'un « flash poster » (poster accompagné d'une présentation orale en anglais).

Marie CADÉ, Javier MUNOZ-GARCIA, Denis COCHONNEAU, Ahlème ZNAIDI, Emilie MORANTON, Anna LOKAJCZYK, Catherine BOISSON-VIDAL, Dominique HEYMANN. **Regulation of endothelial cells and monocyte adhesion by recombinant FVIII**. Journées scientifiques organisées par l'école doctorale Biologie-Santé de Nantes. Présentation orale en anglais.

Marie CADÉ, Javier MUNOZ-GARCIA, Denis COCHONNEAU, Ahlème ZNAIDI, Emilie MORANTON, Anna LOKAJCZYK, Catherine BOISSON-VIDAL, Dominique HEYMANN. **Regulation of endothelial cells and monocyte adhesion by recombinant FVIII**. Congrès organisé par la Société Française d'Angiogenèse. Reporté en raison de la pandémie COVID-19 (une présentation orale en anglais était prévue).

REFERENCES

- Acharya, S.S., Kaplan, R.N., Macdonald, D., Fabiyi, O.T., DiMichele, D., and Lyden, D. (2011). Neovascularization contributes to the development of hemophilic synovitis. *Blood* *117*, 2484–2493.
- Ahmad, S.S., and Walsh, P.N. (2005). Role of the C2 Domain of Factor VIIIa in the Assembly of Factor-X Activating Complex on the Platelet Membrane. *Biochemistry* *44*, 13858–13865.
- Aird, W.C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* *100*, 158–173.
- Aiuti, A., Roncarolo, M.G., and Naldini, L. (2017). Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an ex vivo gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products. *EMBO Mol Med* *9*, 737–740.
- András, I.E., Eum, S.Y., Huang, W., Zhong, Y., Hennig, B., and Toborek, M. (2010). HIV-1-induced amyloid beta accumulation in brain endothelial cells is attenuated by simvastatin. *Mol Cell Neurosci* *43*, 232–243.
- André, P., Denis, C.V., Ware, J., Saffaripour, S., Hynes, R.O., Ruggeri, Z.M., and Wagner, D.D. (2000). Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood* *96*, 3322–3328.
- Antunes, S.V., Tangada, S., Stasyshyn, O., Mamonov, V., Phillips, J., Guzman-Becerra, N., Grigorian, A., Ewenstein, B., and Wong, W.-Y. (2014). Randomized comparison of prophylaxis and on-demand regimens with FEIBA NF in the treatment of haemophilia A and B with inhibitors. *Haemophilia* *20*, 65–72.
- Anwar, R., Minford, A., Gallivan, L., Trinh, C.H., and Markham, A.F. (2002). Delayed umbilical bleeding—a presenting feature for factor XIII deficiency: clinical features, genetics, and management. *Pediatrics* *109*, E32.
- Aronovich, A., Nur, Y., Shezen, E., Rosen, C., Zlotnikov Klionsky, Y., Milman, I., Yarimi, L., Hagin, D., Rechavi, G., Martinowitz, U., et al. (2013). A novel role for factor VIII and thrombin/PAR1 in regulating hematopoiesis and its interplay with the bone structure. *Blood* *122*, 2562–2571.
- Assinder, S.J., Stanton, J.-A.L., and Prasad, P.D. (2009). Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol* *41*, 482–486.
- Astermark, J., Santagostino, E., and Keith Hoots, W. (2010). Clinical issues in inhibitors. *Haemophilia* *16 Suppl 5*, 54–60.
- Augustin, H.G., Koh, G.Y., Thurston, G., and Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 165–177.
- Austin, S.K., Kavakli, K., Norton, M., Peyvandi, F., Shapiro, A., and FX Investigators Group (2016). Efficacy, safety and pharmacokinetics of a new high-purity factor X concentrate in subjects with hereditary factor X deficiency. *Haemophilia* *22*, 419–425.
- Aznar, J.A., Lucía, F., Abad-Franch, L., Jiménez-Yuste, V., Pérez, R., Batlle, J., Balda, I., Parra, R., and Cortina, V.R. (2009). Haemophilia in Spain. *Haemophilia* *15*, 665–675.

- Badirou, I., Kurdi, M., Rayes, J., Legendre, P., Christophe, O.D., Lenting, P.J., and Denis, C.V. (2010). von Willebrand factor clearance does not involve proteolysis by ADAMTS-13. *J. Thromb. Haemost.* *8*, 2338–2340.
- Bagnall, R.D., Waseem, N., Green, P.M., and Giannelli, F. (2002). Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* *99*, 168–174.
- Baronciani, L., Cozzi, G., Canciani, M.T., Peyvandi, F., Srivastava, A., Federici, A.B., and Mannucci, P.M. (2003). Molecular defects in type 3 von Willebrand disease: updated results from 40 multiethnic patients. *Blood Cells Mol. Dis.* *30*, 264–270.
- Bashirova, A.A., Geijtenbeek, T.B., van Duijnhoven, G.C., van Vliet, S.J., Eilering, J.B., Martin, M.P., Wu, L., Martin, T.D., Viebig, N., Knolle, P.A., et al. (2001). A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* *193*, 671–678.
- Baud'huin, M., Duplomb, L., Téletchéa, S., Charrier, C., Maillason, M., Fouassier, M., and Heymann, D. (2009). Factor VIII-von Willebrand factor complex inhibits osteoclastogenesis and controls cell survival. *J. Biol. Chem.* *284*, 31704–31713.
- Beacham, D.A., Wise, R.J., Turci, S.M., and Handin, R.I. (1992). Selective inactivation of the Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) binding site in von Willebrand factor by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* *267*, 3409–3415.
- Becker, S., Simpson, J.C., Pepperkok, R., Heinz, S., Herder, C., Grez, M., Seifried, E., and Tonn, T. (2004). Confocal microscopy analysis of native, full length and B-domain deleted coagulation factor VIII trafficking in mammalian cells. *Thromb. Haemost.* *92*, 23–35.
- Bellis, S.L., Miller, J.T., and Turner, C.E. (1995). Characterization of Tyrosine Phosphorylation of Paxillin in Vitro by Focal Adhesion Kinase. *J. Biol. Chem.* *270*, 17437–17441.
- Benslimane-Ahmim, Z., Heymann, D., Dizier, B., Lokajczyk, A., Brion, R., Laurendeau, I., Bièche, I., Smadja, D.M., Galy-Fauroux, I., Collic-Jouault, S., et al. (2011). Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cells properties. *J Thromb Haemost* *9*, 834–843.
- Benslimane-Ahmim, Z., Poirier, F., Delomenie, C., Lokajczyk, A., Grelac, F., Galy-Fauroux, I., Mohamedi, A., Fischer, A.-M., Heymann, D., Lutomski, D., et al. (2013a). Mechanistic study of the proangiogenic effect of osteoprotegerin. *Angiogenesis* *16*, 575–593.
- Benslimane-Ahmim, Z., Poirier, F., Delomenie, C., Lokajczyk, A., Grelac, F., Galy-Fauroux, I., Mohamedi, A., Fischer, A.-M., Heymann, D., Lutomski, D., et al. (2013b). Mechanistic study of the proangiogenic effect of osteoprotegerin. *Angiogenesis* *16*, 575–593.
- Berger, R.B., Blackwell, N.M., Lass, J.H., Diaconu, E., and Pearlman, E. (2002). IL-4 and IL-13 regulation of ICAM-1 expression and eosinophil recruitment in *Onchocerca volvulus* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *43*, 2992–2997.

- Bernardo, A., Ball, C., Nolasco, L., Choi, H., Moake, J.L., and Dong, J.F. (2005). Platelets adhered to endothelial cell-bound ultra-large von Willebrand factor strings support leukocyte tethering and rolling under high shear stress. *J. Thromb. Haemost.* 3, 562–570.
- Beutel, K., Hauch, H., Rischewski, J., Kordes, U., Schneppenheim, J., and Schneppenheim, R. (2009). ITI with high-dose FIX and combined immunosuppressive therapy in a patient with severe haemophilia B and inhibitor. *Hamostaseologie* 29, 155–157.
- Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Majeau, G.R., Cotran, R.S., and Gimbrone, M.A. (1984). Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J. Exp. Med.* 160, 618–623.
- Bhardwaj, R., Rath, G., and Goyal, A.K. (2018). Advancement in the treatment of haemophilia. *Int J Biol Macromol* 118, 289–295.
- Bhat, V., Olmer, M., Joshi, S., Durden, D.L., Cramer, T.J., Barnes, R.F., Ball, S.T., Hughes, T.H., Silva, M., Luck, J.V., et al. (2015). Vascular remodeling underlies rebleeding in hemophilic arthropathy. *Am. J. Hematol.* 90, 1027–1035.
- Bhopale, G.M., and Nanda, R.K. (2003). Blood coagulation factor VIII: An overview. *J. Biosci.* 28, 783–789.
- Bianchini, E.P., Auditeau, C., Razanakolona, M., Vasse, M., and Borgel, D. (2021). Serpins in Hemostasis as Therapeutic Targets for Bleeding or Thrombotic Disorders. *Front Cardiovasc Med* 7.
- van den Biggelaar, M., Hernández-Fernaud, J.R., van den Eshof, B.L., Neilson, L.J., Meijer, A.B., Mertens, K., and Zanivan, S. (2014). Quantitative phosphoproteomics unveils temporal dynamics of thrombin signaling in human endothelial cells. *Blood* 123, e22-36.
- Biggs, R., Douglas, A.S., Macfarlane, R.G., Dacie, J.V., Pitney, W.R., and Merskey, null (1952). Christmas disease: a condition previously mistaken for haemophilia. *Br Med J* 2, 1378–1382.
- Biswas, A., Ivaskevicius, V., Thomas, A., Varvenne, M., Brand, B., Rott, H., Hausfels, I., Ruehl, H., Scholz, U., Klamroth, R., et al. (2014). Eight novel F13A1 gene missense mutations in patients with mild FXIII deficiency: in silico analysis suggests changes in FXIII-A subunit structure/function. *Ann. Hematol.* 93, 1665–1676.
- Blair, H.A. (2019). Emicizumab: A Review in Haemophilia A. *Drugs* 79, 1697–1707.
- Board, P., Coggan, M., and Miloszewski, K. (1992). Identification of a point mutation in factor XIII A subunit deficiency. *Blood* 80, 937–941.
- Bochenek, M.L., and Schäfer, K. (2019). Role of Endothelial Cells in Acute and Chronic Thrombosis. *Hamostaseologie* 39, 128–139.
- Bolton-Maggs, P.H., and Pasi, K.J. (2003). Haemophilias A and B. *The Lancet* 361, 1801–1809.
- Bolton-Maggs, P., Goudemand, J., Hermans, C., Makris, M., and de Moerloose, P. (2014). FXI concentrate use and risk of thrombosis. *Haemophilia* 20, e349-351.

- Bon, A., Morfini, M., Dini, A., Mori, F., Barni, S., Gianluca, S., de Martino, M., and Novembre, E. (2015). Desensitization and immune tolerance induction in children with severe factor IX deficiency; inhibitors and adverse reactions to replacement therapy: a case-report and literature review. *Ital J Pediatr* *41*, 12.
- Bontempo, F.A., Lewis, J.H., Gorenc, T.J., Spero, J.A., Ragni, M.V., Scott, J.P., and Starzl, T.E. (1987). Liver transplantation in hemophilia A. *Blood* *69*, 1721–1724.
- Bonthron, D., Orr, E.C., Mitsock, L.M., Ginsburg, D., Handin, R.I., and Orkin, S.H. (1986). Nucleotide sequence of pre-pro-von Willebrand factor cDNA. *Nucleic Acids Res* *14*, 7125–7127.
- Borel-Derlon, A., Federici, A.B., Roussel-Robert, V., Goudemand, J., Lee, C.A., Scharrer, I., Rothschild, C., Berntorp, E., Henriot, C., Tellier, Z., et al. (2007). Treatment of severe von Willebrand disease with a high-purity von Willebrand factor concentrate (Wilfactin): a prospective study of 50 patients. *J. Thromb. Haemost.* *5*, 1115–1124.
- Bovenschen, N., Herz, J., Grimbergen, J.M., Lenting, P.J., Havekes, L.M., Mertens, K., and van Vlijmen, B.J.M. (2003). Elevated plasma factor VIII in a mouse model of low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency. *Blood* *101*, 3933–3939.
- Bovenschen, N., Rijken, D.C., Havekes, L.M., van Vlijmen, B.J.M., and Mertens, K. (2005a). The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J. Thromb. Haemost.* *3*, 1257–1265.
- Bovenschen, N., Mertens, K., Hu, L., Havekes, L.M., and van Vlijmen, B.J.M. (2005b). LDL receptor cooperates with LDL receptor-related protein in regulating plasma levels of coagulation factor VIII in vivo. *Blood* *106*, 906–912.
- Bowen, D.J. (2002). Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* *55*, 1–18.
- Bowen, D.J., and Collins, P.W. (2004). An amino acid polymorphism in von Willebrand factor correlates with increased susceptibility to proteolysis by ADAMTS13. *Blood* *103*, 941–947.
- Bowyer, A., Smith, J., Woolley, A.M., Kitchen, S., Hampton, K.K., Maclean, R.M., VAN Veen, J.J., and Makris, M. (2011). The investigation of a prolonged APTT with specific clotting factor assays is unnecessary if an APTT with Actin FS is normal. *Int J Lab Hematol* *33*, 212–218.
- Brackmann, H.H., Oldenburg, J., and Schwaab, R. (1996). Immune tolerance for the treatment of factor VIII inhibitors--twenty years' "bonn protocol." *Vox Sang* *70 Suppl 1*, 30–35.
- Bradbury, P., Bach, C.T., Paul, A., and O'Neill, G.M. (2014). Src kinase determines the dynamic exchange of the docking protein NEDD9 (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated gene 9) at focal adhesions. *J Biol Chem* *289*, 24792–24800.
- Brass, L.F., Manning, D.R., Cichowski, K., and Abrams, C.S. (1997). Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond. *Thromb. Haemost.* *78*, 581–589.
- van Breevoort, D., van Agtmaal, E.L., Dragt, B.S., Gebbinck, J.K., Dienava-Verdoold, I., Kragt, A., Bierings, R., Horrevoets, A.J.G., Valentijn, K.M., Eikenboom, J.C., et al. (2012). Proteomic screen

identifies IGFBP7 as a novel component of endothelial cell-specific Weibel-Palade bodies. *J. Proteome Res.* *11*, 2925–2936.

Brehm, M.A. (2017). Von Willebrand factor processing. *Hamostaseologie* *37*, 59–72.

Brenner, B., Kuperman, A.A., Watzka, M., and Oldenburg, J. (2009). Vitamin K-dependent coagulation factors deficiency. *Semin. Thromb. Hemost.* *35*, 439–446.

Brent, M.B., Thomsen, J.S., and Brüel, A. (2018). The effect of oral dabigatran etexilate on bone density, strength, and microstructure in healthy mice. *Bone Rep* *8*, 9–17.

Brettler, D.B. (1996). Inhibitors in congenital haemophilia. *Baillieres Clin Haematol* *9*, 319–329.

Broos, K., Feys, H.B., De Meyer, S.F., Vanhoorelbeke, K., and Deckmyn, H. (2011). Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* *25*, 155–167.

Brown, S.A., Eldridge, A., Collins, P.W., and Bowen, D.J. (2003). Increased clearance of von Willebrand factor antigen post-DDAVP in Type 1 von Willebrand disease: is it a potential pathogenic process? *J. Thromb. Haemost.* *1*, 1714–1717.

Brummel, K.E., Paradis, S.G., Butenas, S., and Mann, K.G. (2002). Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood* *100*, 148–152.

Bulato, C., Novembrino, C., Anzoletti, M.B., Spiezia, L., Gavasso, S., Berbenni, C., Tagariello, G., Farina, C., Nardini, I., Campello, E., et al. (2018). “In vitro” correction of the severe factor V deficiency-related coagulopathy by a novel plasma-derived factor V concentrate. *Haemophilia* *24*, 648–656.

Cachemaille, M., Laedermann, C.J., Pertin, M., Abriel, H., Gosselin, R.-D., and Decosterd, I. (2012). Neuronal expression of the ubiquitin ligase Nedd4-2 in rat dorsal root ganglia: modulation in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Neuroscience* *227*, 370–380.

Calmette, L., and Clauser, S. (2018). [Von Willebrand disease]. *Rev Med Interne* *39*, 918–924.

Cameron, C., Notley, C., Hoyle, S., McGlynn, L., Hough, C., Kamisue, S., Giles, A., and Lillicrap, D. (1998). The canine factor VIII cDNA and 5' flanking sequence. *Thromb. Haemost.* *79*, 317–322.

Canis, K., McKinnon, T. a. J., Nowak, A., Panico, M., Morris, H.R., Laffan, M., and Dell, A. (2010). The plasma von Willebrand factor O-glycome comprises a surprising variety of structures including ABH antigens and disialosyl motifs. *J. Thromb. Haemost.* *8*, 137–145.

Canis, K., McKinnon, T.A.J., Nowak, A., Haslam, S.M., Panico, M., Morris, H.R., Laffan, M.A., and Dell, A. (2012). Mapping the N-glycome of human von Willebrand factor. *Biochem. J.* *447*, 217–228.

Carcao, M.D. (2012). The diagnosis and management of congenital hemophilia. *Semin. Thromb. Hemost.* *38*, 727–734.

Casari, C., Lenting, P.J., Wohner, N., Christophe, O.D., and Denis, C.V. (2013a). Clearance of von Willebrand factor. *J. Thromb. Haemost.* *11 Suppl 1*, 202–211.

- Casari, C., Du, V., Wu, Y.-P., Kauskot, A., de Groot, P.G., Christophe, O.D., Denis, C.V., de Laat, B., and Lenting, P.J. (2013b). Accelerated uptake of VWF/platelet complexes in macrophages contributes to VWD type 2B-associated thrombocytopenia. *Blood* *122*, 2893–2902.
- Casini, A., Brungs, T., Lavenu-Bombled, C., Vilar, R., Neerman-Arbez, M., and Moerlose, P. de (2017). Genetics, diagnosis and clinical features of congenital hypodysfibrinogenemia: a systematic literature review and report of a novel mutation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* *15*, 876–888.
- Casonato, A., Fabris, F., and Girolami, A. (1990). Platelet aggregation and pseudothrombocytopenia induced by 1-desamino-8-D-arginine vasopressin (DDAVP) in type IIB von Willebrand's disease patient. *Eur. J. Haematol.* *45*, 36–42.
- Casonato, A., Galletta, E., Sarolo, L., and Daidone, V. (2018). Type 2N von Willebrand disease: Characterization and diagnostic difficulties. *Haemophilia* *24*, 134–140.
- Castaman, G. (2008). Desmopressin for the treatment of haemophilia. *Haemophilia* *14*, 15–20.
- Castaman, G., and James, P.D. (2019). Pregnancy and delivery in women with von Willebrand disease. *European Journal of Haematology* *103*, 73–79.
- Castaman, G., and Linari, S. (2017). Diagnosis and Treatment of von Willebrand Disease and Rare Bleeding Disorders. *Journal of Clinical Medicine* *6*.
- Castaman, G., Federici, A.B., Rodeghiero, F., and Mannucci, P.M. (2003). Von Willebrand's disease in the year 2003: towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. *Haematologica* *88*, 94–108.
- Castaman, G., Lethagen, S., Federici, A.B., Toretto, A., Goodeve, A., Budde, U., Batlle, J., Meyer, D., Mazurier, C., Fressinaud, E., et al. (2008). Response to desmopressin is influenced by the genotype and phenotype in type 1 von Willebrand disease (VWD): results from the European Study MCMDM-1VWD. *Blood* *111*, 3531–3539.
- Castro-Núñez, L., Dienava-Verdoold, I., Herczenik, E., Mertens, K., and Meijer, A.B. (2012). Shear stress is required for the endocytic uptake of the factor VIII-von Willebrand factor complex by macrophages. *J. Thromb. Haemost.* *10*, 1929–1937.
- Caudill, J.S.C., Nichols, W.L., Plumhoff, E.A., Schulte, S.L., Winters, J.L., Gastineau, D.A., and Rodriguez, V. (2009). Comparison of coagulation factor XIII content and concentration in cryoprecipitate and fresh-frozen plasma. *Transfusion* *49*, 765–770.
- Caviglia, H., Landro, M.E., Galatro, G., Candela, M., and Neme, D. (2015). Epidemiology of fractures in patients with haemophilia. *Injury* *46*, 1885–1890.
- Cerutti, C., and Ridley, A.J. (2017). Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Experimental Cell Research* *358*, 31–38.
- Chafa, O., Tagzirt, M., Tapon-Bretonnière, J., Reghis, A., Fischer, A.-M., and LeBonniec, B.F. (2009). Characterization of a homozygous Gly11Val mutation in the Gla domain of coagulation factor X. *Thromb. Res.* *124*, 144–148.

- Chambost, H., Gaboulaud, V., Coatmélec, B., Rafowicz, A., Schneider, P., and Calvez, T. (2002). What factors influence the age at diagnosis of hemophilia? Results of the French hemophilia cohort. *The Journal of Pediatrics* *141*, 548–552.
- Charlebois, J., Rivard, G.-É., and St-Louis, J. (2018). Management of acquired hemophilia A: Review of current evidence. *Transfus Apher Sci* *57*, 717–720.
- Chauncey, J.M., and Wieters, J.S. (2020). Tranexamic Acid. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Chen, L., and Zheng, S. (2020). Understand variability of COVID-19 through population and tissue variations in expression of SARS-CoV-2 host genes. *Inform Med Unlocked* *21*, 100443.
- Chen, L., Gao, B., Zhang, Y., Lu, H., Li, X., Pan, L., Yin, L., and Zhi, X. (2019). PAR2 promotes M1 macrophage polarization and inflammation via FOXO1 pathway. *J Cell Biochem* *120*, 9799–9809.
- Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., and Horwitz, A.R. (2008). Actin and α -actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nature Cell Biology* *10*, 1039–1050.
- Chrobak, I., Lenna, S., Stawski, L., and Trojanowska, M. (2013). Interferon- γ promotes vascular remodeling in human microvascular endothelial cells by upregulating endothelin (ET)-1 and transforming growth factor (TGF) β 2. *J Cell Physiol* *228*, 1774–1783.
- Chtourou, S., Porte, P., Nogr , M., Bihoreau, N., Cheesman, E., Samor, B., Sauger, A., Raut, S., and Mazurier, C. (2007). A solvent/detergent-treated and 15-nm filtered factor VIII: a new safety standard for plasma-derived coagulation factor concentrates. *Vox Sang* *92*, 327–337.
- Coller, B.S. (2011). Historical perspective and future directions in platelet research. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* *9*, 374–395.
- Collins, P.W. (2012). Therapeutic challenges in acquired factor VIII deficiency. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* *2012*, 369–374.
- Collins, P., Budde, U., Rand, J.H., Federici, A.B., and Kessler, C.M. (2008). Epidemiology and general guidelines of the management of acquired haemophilia and von Willebrand syndrome. *Haemophilia* *14 Suppl 3*, 49–55.
- Collins, P., Baudo, F., Huth-K hne, A., Ingerslev, J., Kessler, C.M., Castellano, M.E.M., Shima, M., St-Louis, J., and Lévesque, H. (2010). Consensus recommendations for the diagnosis and treatment of acquired hemophilia A. *BMC Res Notes* *3*, 161.
- Comfurius, P., Smeets, E.F., Willems, G.M., Bevers, E.M., and Zwaal, R.F. (1994). Assembly of the prothrombinase complex on lipid vesicles depends on the stereochemical configuration of the polar headgroup of phosphatidylserine. *Biochemistry* *33*, 10319–10324.
- Conti, P., Youinou, P., and Theoharides, T.C. (2007). Modulation of autoimmunity by the latest interleukins (with special emphasis on IL-32). *Autoimmun Rev* *6*, 131–137.

- Cooke, E.J., Zhou, J.Y., Wyseure, T., Joshi, S., Bhat, V., Durden, D.L., Mosnier, L.O., and von Drygalski, A. (2018). Vascular Permeability and Remodelling Coincide with Inflammatory and Reparative Processes after Joint Bleeding in Factor VIII-Deficient Mice. *Thromb Haemost* *118*, 1036–1047.
- Cooney, K.A., Nichols, W.C., Bruck, M.E., Bahou, W.F., Shapiro, A.D., Bowie, E.J., Gralnick, H.R., and Ginsburg, D. (1991). The molecular defect in type IIB von Willebrand disease. Identification of four potential missense mutations within the putative GpIb binding domain. *J. Clin. Invest.* *87*, 1227–1233.
- Crawley, J.T.B., de Groot, R., Xiang, Y., Luken, B.M., and Lane, D.A. (2011). Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. *Blood* *118*, 3212–3221.
- Crittenden, J.R., Bergmeier, W., Zhang, Y., Piffath, C.L., Liang, Y., Wagner, D.D., Housman, D.E., and Graybiel, A.M. (2004). CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nat. Med.* *10*, 982–986.
- Dasgupta, S., Navarrete, A.-M., Bayry, J., Delignat, S., Wootla, B., André, S., Christophe, O., Nascimbeni, M., Jacquemin, M., Martinez-Pomares, L., et al. (2007). A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 8965–8970.
- De Brasi, C.D., and Bowen, D.J. (2008). Molecular characteristics of the intron 22 homologs of the coagulation factor VIII gene: an update. *J. Thromb. Haemost.* *6*, 1822–1824.
- De Leo, P., Gazzurelli, L., Baronio, M., Montin, D., Di Cesare, S., Giancotta, C., Licciardi, F., Cancrini, C., Aiuti, A., Plebani, A., et al. (2020). NFKB2 regulates human Tfh and Tfr pool formation and germinal center potential. *Clin Immunol* *210*, 108309.
- De Wee, E.M., Knol, H.M., Mauser-Bunschoten, E.P., van der Bom, J.G., Eikenboom, J.C.J., Fijnvandraat, K., De Goede-Bolder, A., Laros-van Gorkom, B., Ypma, P.F., Zweegman, S., et al. (2011). Gynaecological and obstetric bleeding in moderate and severe von Willebrand disease. *Thromb. Haemost.* *106*, 885–892.
- Dent, J.A., Berkowitz, S.D., Ware, J., Kasper, C.K., and Ruggeri, Z.M. (1990). Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *87*, 6306–6310.
- Dent, J.A., Galbusera, M., and Ruggeri, Z.M. (1991). Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit. *J. Clin. Invest.* *88*, 774–782.
- DiMichele (2000). Inhibitors in haemophilia: a primer. *Haemophilia* *6*, 38–40.
- Dimitrov, J.D., Christophe, O.D., Kang, J., Repessé, Y., Delignat, S., Kaveri, S.V., and Lacroix-Desmazes, S. (2012). Thermodynamic analysis of the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *Biochemistry* *51*, 4108–4116.

- Ding, Y., Li, X., Zhou, M., Cai, L., Tang, H., Xie, T., Shi, Z., and Fu, W. (2020). Factor Xa inhibitor rivaroxaban suppresses experimental abdominal aortic aneurysm progression via attenuating aortic inflammation. *Vascul Pharmacol* 106818.
- Do, H., Healey, J.F., Waller, E.K., and Lollar, P. (1999). Expression of factor VIII by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 274, 19587–19592.
- Döbereiner, H.-G., Dubin-Thaler, B., Giannone, G., Xenias, H.S., and Sheetz, M.P. (2004). Dynamic phase transitions in cell spreading. *Phys Rev Lett* 93, 108105.
- Dolan, G., Benson, G., Duffy, A., Hermans, C., Jiménez-Yuste, V., Lambert, T., Ljung, R., Morfini, M., and Zupančić Šalek, S. (2018). Haemophilia B: Where are we now and what does the future hold? *Blood Rev* 32, 52–60.
- Dong, J., Moake, J.L., Nolasco, L., Bernardo, A., Arceneaux, W., Shrimpton, C.N., Schade, A.J., McIntire, L.V., Fujikawa, K., and López, J.A. (2002). ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 100, 4033–4039.
- Dorgalaleh, A., and Rashidpanah, J. (2016). Blood coagulation factor XIII and factor XIII deficiency. *Blood Rev.* 30, 461–475.
- Dorgalaleh, A., Alavi, S.E.R., Tabibian, S., Soori, S., Moradi, E., Bamedi, T., Asadi, M., Jalalvand, M., and Shamsizadeh, M. (2017). Diagnosis, clinical manifestations and management of rare bleeding disorders in Iran. *Hematology* 22, 224–230.
- Dorner, A.J., Bole, D.G., and Kaufman, R.J. (1987). The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *J. Cell Biol.* 105, 2665–2674.
- Du, J., Wichapong, K., Hackeng, K.M., and Nicolaes, G.A.F. (2015). Molecular simulation studies of human coagulation factor VIII C domain-mediated membrane binding. *Thromb. Haemost.* 113, 373–384.
- Duga, S., and Salomon, O. (2009). Factor XI Deficiency. *Semin. Thromb. Hemost.* 35, 416–425.
- Duga, S., and Salomon, O. (2013). Congenital factor XI deficiency: an update. *Semin. Thromb. Hemost.* 39, 621–631.
- Dupont, A., Soukaseum, C., Cheptou, M., Adam, F., Nipoti, T., Lourenco-Rodrigues, M.-D., Legendre, P., Proulle, V., Rauch, A., Kawecky, C., et al. (2019). Relevance of platelet desialylation and thrombocytopenia in type 2B von Willebrand disease: preclinical and clinical evidence. *J. Thromb. Haemost.* 19, 2493–2500.
- Edilova, M.I., Abdul-Sater, A.A., and Watts, T.H. (2018). TRAF1 Signaling in Human Health and Disease. *Front Immunol* 9, 2969.
- Eikenboom, J.C. (2001). Congenital von Willebrand disease type 3: clinical manifestations, pathophysiology and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol* 14, 365–379.

- Eikenboom, J.C., Matsushita, T., Reitsma, P.H., Tuley, E.A., Castaman, G., Briët, E., and Sadler, J.E. (1996). Dominant type 1 von Willebrand disease caused by mutated cysteine residues in the D3 domain of von Willebrand factor. *Blood* *88*, 2433–2441.
- Elder, B., Lakich, D., and Gitschier, J. (1993). Sequence of the murine factor VIII cDNA. *Genomics* *16*, 374–379.
- Elezović, I. (2010). Acquired haemophilia syndrome: pathophysiology and therapy. *Srp Arh Celok Lek* *138 Suppl 1*, 64–68.
- Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *4*, 181–191.
- Ellies, L.G., Ditto, D., Levy, G.G., Wahrenbrock, M., Ginsburg, D., Varki, A., Le, D.T., and Marth, J.D. (2002). Sialyltransferase ST3Gal-IV operates as a dominant modifier of hemostasis by concealing asialoglycoprotein receptor ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 10042–10047.
- Emsley, J., McEwan, P.A., and Gailani, D. (2010). Structure and function of factor XI. *Blood* *115*, 2569–2577.
- Escobar, M.A., Auerswald, G., Austin, S., Huang, J.N., Norton, M., and Millar, C.M. (2016). Experience of a new high-purity factor X concentrate in subjects with hereditary factor X deficiency undergoing surgery. *Haemophilia* *22*, 713–720.
- Everett, L.A., Cleuren, A.C.A., Khoriaty, R.N., and Ginsburg, D. (2014). Murine coagulation factor VIII is synthesized in endothelial cells. *Blood* *123*, 3697–3705.
- Fahs, S.A., Hille, M.T., Shi, Q., Weiler, H., and Montgomery, R.R. (2014). A conditional knockout mouse model reveals endothelial cells as the principal and possibly exclusive source of plasma factor VIII. *Blood* *123*, 3706–3713.
- Famà, R., Borroni, E., Merlin, S., Airolidi, C., Pignani, S., Cucci, A., Corà, D., Brusca, V., Scardellato, S., Faletti, S., et al. (2020). Deciphering the Ets-1/2-mediated transcriptional regulation of F8 gene identifies a minimal F8 promoter for hemophilia A gene therapy. *Haematologica*.
- Fang, H., Wang, L., and Wang, H. (2007). The protein structure and effect of factor VIII. *Thromb. Res.* *119*, 1–13.
- Fang, H., Zögg, T., and Brandstetter, H. (2019). Maturation of coagulation factor IX during Xase formation as deduced using factor VIII-derived peptides. *FEBS Open Bio* *9*, 1370–1378.
- Fay, P.J. (2004). Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Rev.* *18*, 1–15.
- Fay, P.J. (2006). Factor VIII structure and function. *Int. J. Hematol.* *83*, 103–108.
- Fazavana, J., Brophy, T.M., Chion, A., Cooke, N., Terraube, V., Cohen, J., Parng, C., Pittman, D., Cunningham, O., Lambert, M., et al. (2020). Investigating the clearance of VWF A-domains using site-directed PEGylation and novel N-linked glycosylation. *J. Thromb. Haemost.* *18*, 1278–1290.

Federici, A.B. (2000). Therapeutic approaches to acquired von Willebrand syndrome. *Expert Opin Investig Drugs* 9, 347–354.

Federici, A.B. (2005). Use of intravenous immunoglobulin in patients with acquired von Willebrand syndrome. *Hum. Immunol.* 66, 422–430.

Federici, A.B. (2006). Acquired von Willebrand syndrome: an underdiagnosed and misdiagnosed bleeding complication in patients with lymphoproliferative and myeloproliferative disorders. *Semin. Hematol.* 43, S48-58.

Federici, A.B., Stabile, F., Castaman, G., Canciani, M.T., and Mannucci, P.M. (1998). Treatment of acquired von Willebrand syndrome in patients with monoclonal gammopathy of uncertain significance: comparison of three different therapeutic approaches. *Blood* 92, 2707–2711.

Federici, A.B., Rand, J.H., Bucciarelli, P., Budde, U., van Genderen, P.J., Mohri, H., Meyer, D., Rodeghiero, F., Sadler, J.E., and Subcommittee on von Willebrand Factor (2000). Acquired von Willebrand syndrome: data from an international registry. *Thromb. Haemost.* 84, 345–349.

Federici, A.B., Mannucci, P.M., Castaman, G., Baronciani, L., Bucciarelli, P., Canciani, M.T., Pecci, A., Lenting, P.J., and De Groot, P.G. (2009a). Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: a cohort study of 67 patients. *Blood* 113, 526–534.

Federici, A.B., Mannucci, P.M., Castaman, G., Baronciani, L., Bucciarelli, P., Canciani, M.T., Pecci, A., Lenting, P.J., and De Groot, P.G. (2009b). Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: a cohort study of 67 patients. *Blood* 113, 526–534.

Federici, A.B., Bucciarelli, P., Castaman, G., Mazzucconi, M.G., Morfini, M., Rocino, A., Schiavoni, M., Peyvandi, F., Rodeghiero, F., and Mannucci, P.M. (2014). The bleeding score predicts clinical outcomes and replacement therapy in adults with von Willebrand disease. *Blood* 123, 4037–4044.

Figueiredo, M.S., and Brownlee, G.G. (1995). cis-acting elements and transcription factors involved in the promoter activity of the human factor VIII gene. *J. Biol. Chem.* 270, 11828–11838.

Fischer, K., van der Bom, J.G., Mauser-Bunschoten, E.P., Roosendaal, G., Prejs, R., Grobbee, D.E., and van den Berg, H.M. (2001). Changes in treatment strategies for severe haemophilia over the last 3 decades: effects on clotting factor consumption and arthropathy. *Haemophilia* 7, 446–452.

van der Flier, A., and Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305, 285–298.

Flood, V.H., Christopherson, P.A., Gill, J.C., Friedman, K.D., Haberichter, S.L., Bellissimo, D.B., Udani, R.A., Dasgupta, M., Hoffmann, R.G., Ragni, M.V., et al. (2016). Clinical and laboratory variability in a cohort of patients diagnosed with type 1 VWD in the United States. *Blood* 127, 2481–2488.

- Follenzi, A., Raut, S., Merlin, S., Sarkar, R., and Gupta, S. (2012). Role of bone marrow transplantation for correcting hemophilia A in mice. *Blood* 119, 5532–5542.
- Franchini, M. (2014). Current management of hemophilia B: recommendations, complications and emerging issues. *Expert Rev Hematol* 7, 573–581.
- Franchini, M., and Mannucci, P.M. (2011). Inhibitors of propagation of coagulation (factors VIII, IX and XI): a review of current therapeutic practice. *Br J Clin Pharmacol* 72, 553–562.
- Franchini, M., and Mannucci, P.M. (2013). Von Willebrand disease-associated angiodysplasia: a few answers, still many questions. *Br. J. Haematol.* 161, 177–182.
- Franchini, M., Zaffanello, M., and Lippi, G. (2010). Acquired hemophilia in pediatrics: a systematic review. *Pediatr Blood Cancer* 55, 606–611.
- Franchini, M., Coppola, A., Tagliaferri, A., and Lippi, G. (2013). FEIBA versus NovoSeven in hemophilia patients with inhibitors. *Semin Thromb Hemost* 39, 772–778.
- Franchini, M., Vaglio, S., Marano, G., Mengoli, C., Gentili, S., Pupella, S., and Liembruno, G.M. (2017). Acquired hemophilia A: a review of recent data and new therapeutic options. *Hematology* 22, 514–520.
- Fregin, A., Rost, S., Wolz, W., Krebsova, A., Muller, C.R., and Oldenburg, J. (2002). Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16. *Blood* 100, 3229–3232.
- Fressinaud, E., and Meyer, D. (1993). International survey of patients with von Willebrand disease and angiodysplasia. *Thromb. Haemost.* 70, 546.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3, 362–374.
- Fujimura, Y., Titani, K., Holland, L.Z., Russell, S.R., Roberts, J.R., Elder, J.H., Ruggeri, Z.M., and Zimmerman, T.S. (1986). von Willebrand factor. A reduced and alkylated 52/48-kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* 261, 381–385.
- Fukushi, J., Ono, M., Morikawa, W., Iwamoto, Y., and Kuwano, M. (2000). The activity of soluble VCAM-1 in angiogenesis stimulated by IL-4 and IL-13. *J Immunol* 165, 2818–2823.
- Furlan, M., Robles, R., and Lämmle, B. (1996). Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 87, 4223–4234.
- Furukawa, S., Nogami, K., Ogiwara, K., and Shima, M. (2019). Potential role of activated factor VIII (FVIIIa) in FVIIa/tissue factor-dependent FXa generation in initiation phase of blood coagulation. *Int. J. Hematol.* 109, 390–401.
- van Galen, K.P.M., Mauser-Bunschoten, E.P., and Leebeek, F.W.G. (2012). Hemophilic arthropathy in patients with von Willebrand disease. *Blood Reviews* 26, 261–266.

- van Galen, K.P.M., de Kleijn, P., Foppen, W., Eikenboom, J., Meijer, K., Schutgens, R.E.G., Fischer, K., Cnossen, M.H., de Meris, J., Fijnvandraat, K., et al. (2017). Long-term impact of joint bleeds in von Willebrand disease: a nested case-control study. *Haematologica* *102*, 1486–1493.
- Gallinaro, L., Cattini, M.G., Sztukowska, M., Padrini, R., Sartorello, F., Pontara, E., Bertomoro, A., Daidone, V., Pagnan, A., and Casonato, A. (2008). A shorter von Willebrand factor survival in O blood group subjects explains how ABO determinants influence plasma von Willebrand factor. *Blood* *111*, 3540–3545.
- Gamal Andrawes, N., Hashem Fayek, M., Salah El-Din, N., and Atef Mostafa, R. (2020a). Effect of low-dose factor VIII prophylaxis therapy on bone mineral density and 25(OH) vitamin D level in children with severe haemophilia A. *Haemophilia* *26*, 325–332.
- Gamal Andrawes, N., Hashem Fayek, M., Salah El-Din, N., and Atef Mostafa, R. (2020b). Effect of low-dose factor VIII prophylaxis therapy on bone mineral density and 25(OH) vitamin D level in children with severe haemophilia A. *Haemophilia* *26*, 325–332.
- Gao, W., Anderson, P.J., Majerus, E.M., Tuley, E.A., and Sadler, J.E. (2006). Exosite interactions contribute to tension-induced cleavage of von Willebrand factor by the antithrombotic ADAMTS13 metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 19099–19104.
- Gaucher, C., Diéval, J., and Mazurier, C. (1994). Characterization of von Willebrand factor gene defects in two unrelated patients with type IIC von Willebrand disease. *Blood* *84*, 1024–1030.
- Gay, N.D., Lee, S.C., Liel, M.S., Sochacki, P., Recht, M., and Taylor, J.A. (2015). Increased fracture rates in people with haemophilia: a 10-year single institution retrospective analysis. *Br J Haematol* *170*, 584–586.
- Gelman, I.H. (2010). Emerging Roles for SSeCKS/Gravin/AKAP12 in the Control of Cell Proliferation, Cancer Malignancy, and Barrierogenesis. *Genes Cancer* *1*, 1147–1156.
- Georgy, S.R., Pagel, C.N., Ghasem-Zadeh, A., Zebaze, R.M.D., Pike, R.N., Sims, N.A., and Mackie, E.J. (2012). Proteinase-activated receptor-2 is required for normal osteoblast and osteoclast differentiation during skeletal growth and repair. *Bone* *50*, 704–712.
- German, A.E., Mammoto, T., Jiang, E., Ingber, D.E., and Mammoto, A. (2014). Paxillin controls endothelial cell migration and tumor angiogenesis by altering neuropilin 2 expression. *J Cell Sci* *127*, 1672–1683.
- Gerstner, G., Damiano, M.L., Tom, A., Worman, C., Schultz, W., Recht, M., and Stopeck, A.T. (2009). Prevalence and risk factors associated with decreased bone mineral density in patients with haemophilia. *Haemophilia* *15*, 559–565.
- Giangrande, P.L.F., Peyvandi, F., O’Mahony, B., Behr-Gross, M.-E., Hilger, A., Schramm, W., and Mannucci, P.M. (2017). Kreuth IV: European consensus proposals for treatment of haemophilia with coagulation factor concentrates. *Haemophilia* *23*, 370–375.

- Giannone, G., Dubin-Thaler, B.J., Döbereiner, H.-G., Kieffer, N., Bresnick, A.R., and Sheetz, M.P. (2004). Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell* 116, 431–443.
- Giannone, G., Dubin-Thaler, B.J., Rossier, O., Cai, Y., Chaga, O., Jiang, G., Beaver, W., Döbereiner, H.-G., Freund, Y., Borisy, G., et al. (2007). Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell* 128, 561–575.
- Giblin, J.P., Hewlett, L.J., and Hannah, M.J. (2008). Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Blood* 112, 957–964.
- Gilbert, G.E. (2019). The evolving understanding of factor VIII binding sites and implications for the treatment of hemophilia A. *Blood Reviews* 33, 1–5.
- Gilbert, G.E., and Arena, A.A. (1996). Activation of the factor VIIIa-factor IXa enzyme complex of blood coagulation by membranes containing phosphatidyl-L-serine. *J. Biol. Chem.* 271, 11120–11125.
- Gilbert, G.E., and Drinkwater, D. (1993). Specific membrane binding of factor VIII is mediated by O-phospho-L-serine, a moiety of phosphatidylserine. *Biochemistry* 32, 9577–9585.
- Gilbert, G.E., Sims, P.J., Wiedmer, T., Furie, B., Furie, B.C., and Shattil, S.J. (1991). Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. *J. Biol. Chem.* 266, 17261–17268.
- Gilbert, G.E., Kaufman, R.J., Arena, A.A., Miao, H., and Pipe, S.W. (2002). 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.* 277, 6374–6381.
- Gilbert, G.E., Novakovic, V.A., Shi, J., Rasmussen, J., and Pipe, S.W. (2015). Platelet binding sites for factor VIII in relation to fibrin and phosphatidylserine. *Blood* 126, 1237–1244.
- Giles, A.R., Hoogendoorn, H., and Benford, K. (1987). Type IIB von Willebrand's disease presenting as thrombocytopenia during pregnancy. *Br. J. Haematol.* 67, 349–353.
- Gill, J.C., Endres-Brooks, J., Bauer, P.J., Marks, W.J., and Montgomery, R.R. (1987). The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 69, 1691–1695.
- Gill, J.C., Castaman, G., Windyga, J., Kouides, P., Ragni, M., Leebeek, F.W.G., Obermann-Slupetzky, O., Chapman, M., Fritsch, S., Pavlova, B.G., et al. (2015). Hemostatic efficacy, safety, and pharmacokinetics of a recombinant von Willebrand factor in severe von Willebrand disease. *Blood* 126, 2038–2046.
- Ginsburg, D. (1991). The von Willebrand factor gene and genetics of von Willebrand's disease. *Mayo Clin. Proc.* 66, 506–515.
- Ginsburg, D., Handin, R.I., Bonthron, D.T., Donlon, T.A., Bruns, G.A., Latt, S.A., and Orkin, S.H. (1985). Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science* 228, 1401–1406.

- Gitschier, J., Wood, W.I., Goralka, T.M., Wion, K.L., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Vehar, G.A., Capon, D.J., and Lawn, R.M. (1984). Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312, 326–330.
- Goel, P., Manning, J.A., and Kumar, S. (2015). NEDD4-2 (NEDD4L): the ubiquitin ligase for multiple membrane proteins. *Gene* 557, 1–10.
- Goldscheitter, G., Recht, M., Sochacki, P., Manco-Johnson, M., and Taylor, J.A. (2020). Biomarkers of bone disease in persons with haemophilia. *Haemophilia*.
- Golebiewska, E.M., and Poole, A.W. (2015). Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 29, 153–162.
- Goodwin, T.M. (1989). Congenital hypofibrinogenemia in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 44, 157–161.
- Graw, J., Hh, B., J, O., R, S., M, S., and R, S. (2005). Haemophilia A: From Mutation Analysis to New Therapies.
- Greenwood, J., Wang, Y., and Calder, V.L. (1995). Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *off. Immunology* 86, 408–415.
- Grewal, P.K., Uchiyama, S., Ditto, D., Varki, N., Le, D.T., Nizet, V., and Marth, J.D. (2008). The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis. *Nat. Med.* 14, 648–655.
- Grimsey, N.J., Narala, R., Rada, C.C., Mehta, S., Stephens, B.S., Kufareva, I., Lapek, J., Gonzalez, D.J., Handel, T.M., Zhang, J., et al. (2018). A Tyrosine Switch on NEDD4-2 E3 Ligase Transmits GPCR Inflammatory Signaling. *Cell Rep* 24, 3312–3323.e5.
- Groth, C.G., Hathaway, W.E., Gustafsson, A., Geis, W.P., Putnam, C.W., Björkén, C., Porter, K.A., and Starzl, T.E. (1974). Correction of coagulation in the hemophilic dog by transplantation of lymphatic tissue. *Surgery* 75, 725–733.
- Gu, C., Wang, L., Zurawski, S., and Oh, S. (2019). Signaling Cascade through DC-ASGPR Induces Transcriptionally Active CREB for IL-10 Induction and Immune Regulation. *J Immunol* 203, 389–399.
- Gupton, S.L., and Waterman-Storer, C.M. (2006). Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell* 125, 1361–1374.
- Haberichter, S.L., Merricks, E.P., Fahs, S.A., Christopherson, P.A., Nichols, T.C., and Montgomery, R.R. (2005). Re-establishment of VWF-dependent Weibel-Palade bodies in VWD endothelial cells. *Blood* 105, 145–152.
- Hamik, A., Setiadi, H., Bu, G., McEver, R.P., and Morrissey, J.H. (1999). Down-regulation of monocyte tissue factor mediated by tissue factor pathway inhibitor and the low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 274, 4962–4969.

Harris, R.L., van den Berg, C.W., and Bowen, D.J. (2012). ASGR1 and ASGR2, the Genes that Encode the Asialoglycoprotein Receptor (Ashwell Receptor), Are Expressed in Peripheral Blood Monocytes and Show Interindividual Differences in Transcript Profile. *Mol Biol Int* 2012, 283974.

Haverkate, F., and Samama, M. (1995). Familial dysfibrinogenemia and thrombophilia. Report on a study of the SSC Subcommittee on Fibrinogen (Thromb Haemost).

Hay, C.R.M., Brown, S., Collins, P.W., Keeling, D.M., and Liesner, R. (2006). The diagnosis and management of factor VIII and IX inhibitors: a guideline from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organisation. *British Journal of Haematology* 133, 591–605.

Hay, C.R.M., DiMichele, D.M., and International Immune Tolerance Study (2012). The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. *Blood* 119, 1335–1344.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344–362.

Healey, J.F., Lubin, I.M., and Lollar, P. (1996). The cDNA and derived amino acid sequence of porcine factor VIII. *Blood* 88, 4209–4214.

Hellman, L., Smedsröd, B., Sandberg, H., and Pettersson, U. (1989). Secretion of coagulant factor VIII activity and antigen by in vitro cultivated rat liver sinusoidal endothelial cells. *Br. J. Haematol.* 73, 348–355.

Herbert, J.M., Savi, P., Laplace, M.C., Lalé, A., Dol, F., Dumas, A., Labit, C., and Minty, A. (1993). IL-4 and IL-13 exhibit comparable abilities to reduce pyrogen-induced expression of procoagulant activity in endothelial cells and monocytes. *FEBS Lett* 328, 268–270.

Hermans, C., Brackmann, H.-H., Schinco, P., and Auerswald, G. (2012). The case for wider use of recombinant factor VIII concentrates. *Crit Rev Oncol Hematol* 83, 11–20.

Herrmann, F.H., Auerswald, G., Ruiz-Saez, A., Navarrete, M., Pollmann, H., Lopaciuk, S., Batorova, A., Wulff, K., and Greifswald Factor X Deficiency Study Group (2006). Factor X deficiency: clinical manifestation of 102 subjects from Europe and Latin America with mutations in the factor 10 gene. *Haemophilia* 12, 479–489.

Hews-Girard, J., Rydz, N., Lee, A., Goodyear, M.D., and Poon, M.-C. (2018). Desmopressin in non-severe haemophilia A: Test-response and clinical outcomes in a single Canadian centre review. *Haemophilia* 24, 720–725.

Heymann, D., Kerdraon, O., Verrièle, V., Verhille, E., Veron, V., Vitre, M., Delmas, F., Henry, C., Gouy, Y., Amiand, M., et al. (2020). Centre de Ressources Biologiques-Tumorotheque: Bioresources and Associated Clinical Data Dedicated to Translational Research in Oncology at the Institut de Cancérologie de l'Ouest, France. *Open Journal of Bioresources* 7, 5.

Hilbert, L., Jorieux, S., Proulle, V., Favier, R., Goudemand, J., Parquet, A., Meyer, D., Fressinaud, E., Mazurier, C., and INSERM Network on Molecular Abnormalities in von Willebrand Disease

(2003). Two novel mutations, Q1053H and C1060R, located in the D3 domain of von Willebrand factor, are responsible for decreased FVIII-binding capacity. *Br. J. Haematol.* *120*, 627–632.

Hillery, C.A., Mancuso, D.J., Evan Sadler, J., Ponder, J.W., Jozwiak, M.A., Christopherson, P.A., Cox Gill, J., Paul Scott, J., and Montgomery, R.R. (1998). Type 2M von Willebrand disease: F606I and I662F mutations in the glycoprotein Ib binding domain selectively impair ristocetin- but not botrocetin-mediated binding of von Willebrand factor to platelets. *Blood* *91*, 1572–1581.

Hoffman, M. (2018). The Tissue Factor Pathway and Wound Healing. *Semin. Thromb. Hemost.* *44*, 142–150.

Houston, D.S., Shepherd, J.T., and Vanhoutte, P.M. (1986). Aggregating human platelets cause direct contraction and endothelium-dependent relaxation of isolated canine coronary arteries. Role of serotonin, thromboxane A₂, and adenine nucleotides. *J. Clin. Invest.* *78*, 539–544.

Hsu, T.-C., Pratt, K.P., and Thompson, A.R. (2008). The factor VIII C1 domain contributes to platelet binding. *Blood* *111*, 200–208.

<https://afh.asso.fr> Hémophilie sévère, modérée ou mineure.

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03196284> (2021). A Multi-Centre, Randomised, Open-Label, Controlled Trial Evaluating the Efficacy and Safety of Prophylactic Administration of Concizumab in Haemophilia A and B Patients With Inhibitors (clinicaltrials.gov).

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03417102> (2020). ATLAS-INH: A Phase 3 Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Fitusiran in Patients With Hemophilia A or B, With Inhibitory Antibodies to Factor VIII or IX (clinicaltrials.gov).

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03938792> (2021). An Open-Label Study in Adolescent and Adult Severe (Coagulation Factor Activity <1%) Hemophilia A or B Patients With or Without Inhibitors Comparing Standard Treatment to PF-06741086 Prophylaxis (clinicaltrials.gov).

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04204408> (2021). Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Single and Multiple Subcutaneous Doses of NNC0365-3769 (Mim8) in Healthy Subjects and in Subjects With Haemophilia A With or Without Factor VIII Inhibitors (clinicaltrials.gov).

<http://www.omedit-idf.fr/> (2020). Emicizumab (HEMLIBRA). 3.

Hu, Y.-L., Lu, S., Szeto, K.W., Sun, J., Wang, Y., Lasheras, J.C., and Chien, S. (2014). FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells. *Scientific Reports* *4*, 6024.

Huang, X., Rezaie, A.R., Broze, G.J., and Olson, S.T. (2011). Heparin is a major activator of the anticoagulant serpin, protein Z-dependent protease inhibitor. *J Biol Chem* *286*, 8740–8751.

Hubatsch, I., Ragnarsson, E.G.E., and Artursson, P. (2007). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols* *2*, 2111–2119.

Huffman, J.E., de Vries, P.S., Morrison, A.C., Sabater-Lleal, M., Kacprowski, T., Auer, P.L., Brody, J.A., Chasman, D.I., Chen, M.-H., Guo, X., et al. (2015). Rare and low-frequency variants and their association with plasma levels of fibrinogen, FVII, FVIII, and vWF. *Blood* 126, e19–e29.

Hultin, M.B., and Sussman, I.I. (1990). Postoperative thrombocytopenia in type IIB von Willebrand disease. *Am. J. Hematol.* 33, 64–68.

Ichikawa, H., Shimada, M., Narita, M., Narita, I., Kimura, Y., Tanaka, M., Osanai, T., Okumura, K., and Tomita, H. (2019). Rivaroxaban, a Direct Factor Xa Inhibitor, Ameliorates Hypertensive Renal Damage Through Inhibition of the Inflammatory Response Mediated by Protease-Activated Receptor Pathway. *J Am Heart Assoc* 8, e012195.

Igdoura, S.A. (2017). Asialoglycoprotein receptors as important mediators of plasma lipids and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 28, 209–212.

Ingram, G.I. (1976). The history of haemophilia. *Journal of Clinical Pathology* 29, 469–479.

Iorio, A., Fabbriani, G., Marcucci, M., Brozzetti, M., and Filipponi, P. (2010). Bone mineral density in haemophilia patients. A meta-analysis. *Thromb. Haemost.* 103, 596–603.

Ivanova, E.A., and Orekhov, A.N. (2016). Monocyte Activation in Immunopathology: Cellular Test for Development of Diagnostics and Therapy. *J Immunol Res* 2016.

Ivaskevicius, V., Seitz, R., Kohler, H.P., Schroeder, V., Muszbek, L., Ariens, R.A.S., Seifried, E., Oldenburg, J., and Study Group (2007). International registry on factor XIII deficiency: a basis formed mostly on European data. *Thromb. Haemost.* 97, 914–921.

Jackson, S.P. (2007). The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 109, 5087–5095.

Jackson, C.S., and Gerson, L.B. (2014). Management of gastrointestinal angiodysplastic lesions (GIADs): a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 109, 474–483; quiz 484.

Jackson, S.C., Yang, M., Minuk, L., Sholzberg, M., St-Louis, J., Iorio, A., Card, R., and Poon, M.-C. (2015). Prophylaxis in older Canadian adults with hemophilia A: lessons and more questions. *BMC Hematol* 15, 4.

Jacquemin, M., Neyrinck, A., Hermanns, M.I., Lavend'homme, R., Rega, F., Saint-Remy, J.-M., Peerlinck, K., Van Raemdonck, D., and Kirkpatrick, C.J. (2006). FVIII production by human lung microvascular endothelial cells. *Blood* 108, 515–517.

Jaffe, E.A., Hoyer, L.W., and Nachman, R.L. (1974). Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 1906–1909.

James, P.D., Lillicrap, D., and Mannucci, P.M. (2013). Alloantibodies in von Willebrand disease. *Blood* 122, 636–640.

Jardim, L.L., Chaves, D.G., Silveira-Cassette, A.C.O., Simões E Silva, A.C., Santana, M.P., Cerqueira, M.H., Prezotti, A., Lorenzato, C., Franco, V., van der Bom, J.G., et al. (2017). Immune status of patients with haemophilia A before exposure to factor VIII: first results from the HEMFIL study. *Br J Haematol* 178, 971–978.

- Jiang, Y., Oliver, P., Davies, K.E., and Platt, N. (2006). Identification and characterization of murine SCARA5, a novel class A scavenger receptor that is expressed by populations of epithelial cells. *J Biol Chem* *281*, 11834–11845.
- Jones, R.T., Toledo-Pereyra, L.H., and Quesnelle, K.M. (2015). Selectins in Liver Ischemia and Reperfusion Injury. *J Invest Surg* *28*, 292–300.
- Jung, M.-Y., Park, S.-Y., and Kim, I.-S. (2007). Stabilin-2 is involved in lymphocyte adhesion to the hepatic sinusoidal endothelium via the interaction with alphaMbeta2 integrin. *J Leukoc Biol* *82*, 1156–1165.
- Justus, C.R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., and Yang, L.V. (2014). In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *J Vis Exp*.
- Kalafatis, M., Rand, M.D., and Mann, K.G. (1994). The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J. Biol. Chem.* *269*, 31869–31880.
- Kamikubo, Y., Mendolicchio, G.L., Zampolli, A., Marchese, P., Rothmeier, A.S., Orje, J.N., Gale, A.J., Krishnaswamy, S., Gruber, A., Østergaard, H., et al. (2017). Selective factor VIII activation by the tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex. *Blood* *130*, 1661–1670.
- Kang, L., Shen, L., Lu, L., Wang, D., Zhao, Y., Chen, C., Du, L., Gong, J., Zhang, Y., Mi, X., et al. (2019). Asparaginyl endopeptidase induces endothelial permeability and tumor metastasis via downregulating zonula occludens protein ZO-1. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* *1865*, 2267–2275.
- Karimi, M., Vafafar, A., Haghpanah, S., Payandeh, M., Eshghi, P., Hoofar, H., Afrasiabi, A., Gerdabi, J., Ardeshiri, R., Menegatti, M., et al. (2012). Efficacy of prophylaxis and genotype-phenotype correlation in patients with severe Factor X deficiency in Iran. *Haemophilia* *18*, 211–215.
- Katsumi, A., Tuley, E.A., Bodó, I., and Sadler, J.E. (2000). Localization of disulfide bonds in the cystine knot domain of human von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* *275*, 25585–25594.
- Kaufman, R.J., Dorner, A.J., and Fass, D.N. (1999). von Willebrand Factor Elevates Plasma Factor VIII Without Induction of Factor VIII Messenger RNA in the Liver. *Blood* *93*, 193–197.
- Kaufmann, J.E., and Vischer, U.M. (2003). Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP). *Journal of Thrombosis and Haemostasis* *1*, 682–689.
- Kaufmann, J.E., Oksche, A., Wollheim, C.B., Günther, G., Rosenthal, W., and Vischer, U.M. (2000). Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. *J. Clin. Invest.* *106*, 107–116.
- Kempton, C.L., and Meeks, S.L. (2014). Toward optimal therapy for inhibitors in hemophilia. *Blood* *124*, 3365–3372.
- Keuren, J.F.W., Baruch, D., Legendre, P., Denis, C.V., Lenting, P.J., Girma, J.-P., and Lindhout, T. (2004). von Willebrand factor C1C2 domain is involved in platelet adhesion to polymerized fibrin at high shear rate. *Blood* *103*, 1741–1746.

- Khawaji, M., Akesson, K., and Berntorp, E. (2009). Long-term prophylaxis in severe haemophilia seems to preserve bone mineral density. *Haemophilia* 15, 261–266.
- Khoo, U.-S., Chan, K.Y.K., Chan, V.S.F., and Lin, C.L.S. (2008). DC-SIGN and L-SIGN: the SIGNs for infection. *J Mol Med (Berl)* 86, 861–874.
- Kidder, W., Chang, E.Y., M Moran, C., Rose, S.C., and von Drygalski, A. (2016a). Persistent Vascular Remodeling and Leakiness are Important Components of the Pathobiology of Re-bleeding in Hemophilic Joints: Two Informative Cases. *Microcirculation* 23, 373–378.
- Kidder, W., Chang, E.Y., Moran, C.M., Rose, S.C., and Drygalski, A. von (2016b). Persistent Vascular Remodeling and Leakiness are Important Components of the Pathobiology of Re-bleeding in Hemophilic Joints: Two Informative Cases. *Microcirculation* 23, 373–378.
- Kinoshita, S., Harrison, J., Lazerson, J., and Abildgaard, C.F. (1984). A new variant of dominant type II von Willebrand's disease with aberrant multimeric pattern of factor VIII-related antigen (type IID). *Blood* 63, 1369–1371.
- Kjelle, S.L., Østergaard, H., Greisen, P.J., Hermit, M.B., Thorn, K., Hansen, B.G., Zhou, R., Bjelke, J.R., Kjalke, M., Lund, J., et al. (2019). Mim8 - a Next-Generation FVIII Mimetic Bi-Specific Antibody - Potently Restores the Hemostatic Capacity in Hemophilia a Settings in Vitro and In Vivo. *Blood* 134, 96–96.
- Knezevic, A., Gornik, O., Polasek, O., Pucic, M., Redzic, I., Novokmet, M., Rudd, P.M., Wright, A.F., Campbell, H., Rudan, I., et al. (2010). Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology* 20, 959–969.
- Knowles, L.M., Kagiri, D., Bernard, M., Schwarz, E.C., Eichler, H., and Pilch, J. (2019). Macrophage Polarization is Deregulated in Haemophilia. *Thromb. Haemost.* 119, 234–245.
- Köhler, M., and Harris, A. (1988). Pharmacokinetics and haematological effects of desmopressin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 35, 281–285.
- Kohler, H.P., Ichinose, A., Seitz, R., Ariens, R. a. S., Muszbek, L., and Factor XIII And Fibrinogen SSC Subcommittee Of The ISTH (2011). Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. *J. Thromb. Haemost.* 9, 1404–1406.
- Komiyama, Y., Pedersen, A.H., and Kisiel, W. (1990). Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor. *Biochemistry* 29, 9418–9425.
- Konkle, B.A., Ebbesen, L.S., Erhardtsen, E., Bianco, R.P., Lissitchkov, T., Rusen, L., and Serban, M.A. (2007). Randomized, prospective clinical trial of recombinant factor VIIa for secondary prophylaxis in hemophilia patients with inhibitors. *J Thromb Haemost* 5, 1904–1913.
- Konkle, B.A., Shapiro, A.D., Quon, D.V., Staber, J.M., Kulkarni, R., Ragni, M.V., Chhabra, E.S., Poloskey, S., Rice, K., Katragadda, S., et al. (2020). BIVV001 Fusion Protein as Factor VIII Replacement Therapy for Hemophilia A. *N Engl J Med* 383, 1018–1027.

Koster, T., Blann, A.D., Briët, E., Vandenbroucke, J.P., and Rosendaal, F.R. (1995). Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet* *345*, 152–155.

Kramer, R.M., Roberts, E.F., Um, S.L., Börsch-Haubold, A.G., Watson, S.P., Fisher, M.J., and Jakubowski, J.A. (1996). p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J. Biol. Chem.* *271*, 27723–27729.

Kravtsov, D.V., Wu, W., Meijers, J.C.M., Sun, M.-F., Blinder, M.A., Dang, T.P., Wang, H., and Gailani, D. (2004). Dominant factor XI deficiency caused by mutations in the factor XI catalytic domain. *Blood* *104*, 128–134.

Kroner, P.A., Friedman, K.D., Fahs, S.A., Scott, J.P., and Montgomery, R.R. (1991). Abnormal binding of factor VIII is linked with the substitution of glutamine for arginine 91 in von Willebrand factor in a variant form of von Willebrand disease. *J. Biol. Chem.* *266*, 19146–19149.

Kroner, P.A., Kluessendorf, M.L., Scott, J.P., and Montgomery, R.R. (1992). Expressed full-length von Willebrand factor containing missense mutations linked to type IIB von Willebrand disease shows enhanced binding to platelets. *Blood* *79*, 2048–2055.

Kulkarni, R., Presley, R.J., Lusher, J.M., Shapiro, A.D., Gill, J.C., Manco-Johnson, M., Koerper, M.A., Abshire, T.C., DiMichele, D., Hoots, W.K., et al. (2017). Complications of haemophilia in babies (first two years of life): a report from the Centers for Disease Control and Prevention Universal Data Collection System. *Haemophilia* *23*, 207–214.

Kumar, S., Pruthi, R.K., and Nichols, W.L. (2003). Acquired von Willebrand's syndrome: A single institution experience. *American Journal of Hematology* *72*, 243–247.

Kumar Vr, S., Darisipudi, M.N., Steiger, S., Devarapu, S.K., Tato, M., Kukarni, O.P., Mulay, S.R., Thomasova, D., Popper, B., Demleitner, J., et al. (2016). Cathepsin S Cleavage of Protease-Activated Receptor-2 on Endothelial Cells Promotes Microvascular Diabetes Complications. *J Am Soc Nephrol* *27*, 1635–1649.

Kuo, W.L., Stafford, D.W., Cruces, J., Gray, J., and Solera, J. (1995). Chromosomal localization of the gamma-glutamyl carboxylase gene at 2p12. *Genomics* *25*, 746–748.

Kurian, C.J., Drelich, D.A., and Rizk, S. (2020). Successful liver transplant from a hemophilia A donor with no development of hemophilia A in recipient. *J. Thromb. Haemost.* *18*, 853–856.

Lacey, D.C., Achuthan, A., Fleetwood, A.J., Dinh, H., Roiniotis, J., Scholz, G.M., Chang, M.W., Beckman, S.K., Cook, A.D., and Hamilton, J.A. (2012). Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J. Immunol.* *188*, 5752–5765.

Lai, J.D., Cartier, D., Hartholt, R.B., Swystun, L.L., van Velzen, A.S., den Haan, J.M.M., Hough, C., Voorberg, J., and Lillicrap, D. (2018). Early cellular interactions and immune transcriptome profiles in human factor VIII-exposed hemophilia A mice. *J Thromb Haemost* *16*, 533–545.

- Lak, Keihani, Elahi, Peyvandi, and Mannucci (1999). Bleeding and thrombosis in 55 patients with inherited afibrinogenaemia. *British Journal of Haematology* 107, 204–206.
- Lak, M., Peyvandi, F., and Mannucci, P.M. (2000). Clinical manifestations and complications of childbirth and replacement therapy in 385 Iranian patients with type 3 von Willebrand disease. *Br. J. Haematol.* 111, 1236–1239.
- Lam, W., and Moosavi, L. (2020). Physiology, Factor V. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Lancellotti, S., Basso, M., and De Cristofaro, R. (2013). Congenital prothrombin deficiency: an update. *Semin. Thromb. Hemost.* 39, 596–606.
- Lapan, K.A., and Fay, P.J. (1997). Localization of a factor X interactive site in the A1 subunit of factor VIIIa. *J. Biol. Chem.* 272, 2082–2088.
- Larrabee, W.F., Lanier, B.J., and Miekle, D. (1987). Effect of epinephrine on local cutaneous blood flow. *Head Neck Surg* 9, 287–289.
- Larson, E.A., and Taylor, J.A. (2017). Factor VIII Plays a Direct Role in Osteoblast Development. *Blood* 130, 3661–3661.
- Lechler, E. (1999). Use of prothrombin complex concentrates for prophylaxis and treatment of bleeding episodes in patients with hereditary deficiency of prothrombin, factor VII, factor X, protein C protein S, or protein Z. *Thromb. Res.* 95, S39–50.
- Lee, G.Y., Kim, J.-H., Oh, G.T., Lee, B.-H., Kwon, I.C., and Kim, I.-S. (2011). Molecular targeting of atherosclerotic plaques by a stabilin-2-specific peptide ligand. *J Control Release* 155, 211–217.
- Lee, J., Song, J., Kwon, E.-S., Jo, S., Kang, M.K., Kim, Y.J., Hwang, Y., Bae, H., Kang, T.H., Chang, S., et al. (2016). CTHRC1 promotes angiogenesis by recruiting Tie2-expressing monocytes to pancreatic tumors. *Exp Mol Med* 48, e261.
- Leebeek, F.W.G., and Eikenboom, J.C.J. (2016a). Von Willebrand's Disease. *N. Engl. J. Med.* 375, 2067–2080.
- Leebeek, F.W.G., and Eikenboom, J.C.J. (2016b). Von Willebrand's Disease. *N. Engl. J. Med.* 375, 2067–2080.
- Legate, K.R., and Fässler, R. (2009). Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J Cell Sci* 122, 187–198.
- Lehmann, J.C.U., Jablonski-Westrich, D., Haubold, U., Gutierrez-Ramos, J.-C., Springer, T., and Hamann, A. (2003). Overlapping and selective roles of endothelial intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and ICAM-2 in lymphocyte trafficking. *J Immunol* 171, 2588–2593.
- Leissinger, C., Gringeri, A., Antmen, B., Berntorp, E., Biasoli, C., Carpenter, S., Cortesi, P., Jo, H., Kavakli, K., Lassila, R., et al. (2011). Anti-inhibitor coagulant complex prophylaxis in hemophilia with inhibitors. *N Engl J Med* 365, 1684–1692.

- Leissinger, C., Carcao, M., Gill, J.C., Journeycake, J., Singleton, T., and Valentino, L. (2014). Desmopressin (DDAVP) in the management of patients with congenital bleeding disorders. *Haemophilia* 20, 158–167.
- Leite, A.R., Borges-Canha, M., Cardoso, R., Neves, J.S., Castro-Ferreira, R., and Leite-Moreira, A. (2020). Novel Biomarkers for Evaluation of Endothelial Dysfunction. *Angiology* 71, 397–410.
- Lenting, P.J., Donath, M.J., van Mourik, J.A., and Mertens, K. (1994). Identification of a binding site for blood coagulation factor IXa on the light chain of human factor VIII. *J. Biol. Chem.* 269, 7150–7155.
- Lenting, P.J., van Mourik, J.A., and Mertens, K. (1998). The Life Cycle of Coagulation Factor VIII in View of Its Structure and Function. *Blood* 92, 3983–3996.
- Lenting, P.J., Neels, J.G., van den Berg, B.M., Clijsters, P.P., Meijerman, D.W., Pannekoek, H., van Mourik, J.A., Mertens, K., and van Zonneveld, A.J. (1999). The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 274, 23734–23739.
- Lenting, P.J., Christophe, O.D., and Guéguen, P. (2010). The disappearing act of factor VIII. *Haemophilia* 16, 6–15.
- Lenting, P.J., Casari, C., Christophe, O.D., and Denis, C.V. (2012). von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J. Thromb. Haemost.* 10, 2428–2437.
- Lenting, P.J., Christophe, O.D., and Denis, C.V. (2015). von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* 125, 2019–2028.
- Lethagen, S., Carlson, M., and Hillarp, A. (2004). A comparative in vitro evaluation of six von Willebrand factor concentrates. *Haemophilia* 10, 243–249.
- Li, X., and Gabriel, D.A. (1997). The physical exchange of factor VIII (FVIII) between von Willebrand factor and activated platelets and the effect of the FVIII B-domain on platelet binding. *Biochemistry* 36, 10760–10767.
- Li, J., Zhang, L., Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, H., Wei, L., Shen, T., Jiang, C., and Zhu, D. (2016). A20 deficiency leads to angiogenesis of pulmonary artery endothelial cells through stronger NF- κ B activation under hypoxia. *J Cell Mol Med* 20, 1319–1328.
- Li, J.Y., Paragas, N., Ned, R.M., Qiu, A., Viltard, M., Leete, T., Drexler, I.R., Chen, X., Sanna-Cherchi, S., Mohammed, F., et al. (2009). Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. *Dev Cell* 16, 35–46.
- Li, Y., Choi, H., Zhou, Z., Nolasco, L., Pownall, H.J., Voorberg, J., Moake, J.L., and Dong, J.-F. (2008). Covalent regulation of ULVWF string formation and elongation on endothelial cells under flow conditions. *J. Thromb. Haemost.* 6, 1135–1143.
- Liang, J., Zhao, H., Hu, J., Liu, Y., and Li, Z. (2018). SPOCD1 promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis in human osteosarcoma. *Mol Med Rep* 17, 3218–3225.

- Lillis, A.P., Van Duyn, L.B., Murphy-Ullrich, J.E., and Strickland, D.K. (2008). LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev* *88*, 887–918.
- Lissitchkov, T., Matysiak, M., Zawilska, K., Gercheva, L., Antonov, A., Montañes, M., and Paez, A. (2010). An open clinical study assessing the efficacy and safety of Factor IX Grifols, a high-purity Factor IX concentrate, in patients with severe haemophilia B. *Haemophilia* *16*, 240–246.
- Liu, Z., and Khalil, R.A. (2018). Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* *153*, 91–122.
- Loomans, J.I., Kruij, M.J.H.A., Carcao, M., Jackson, S., van Velzen, A.S., Peters, M., Santagostino, E., Platokouki, H., Beckers, E., Voorberg, J., et al. (2018). Desmopressin in moderate hemophilia A patients: a treatment worth considering. *Haematologica* *103*, 550–557.
- López-Colomé, A.M., Lee-Rivera, I., Benavides-Hidalgo, R., and López, E. (2017). Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. *J Hematol Oncol* *10*.
- López-Fernández, M.F., Altisent Roca, C., Álvarez-Román, M.T., Canaro Hirnyk, M.I., Mingot-Castellano, M.E., Jiménez-Yuste, V., Cid Haro, A.R., Pérez-Garrido, R., and Sedano Balbas, C. (2016). Spanish Consensus Guidelines on prophylaxis with bypassing agents in patients with haemophilia and inhibitors. *Thromb Haemost* *115*, 872–895.
- López-Zambrano, M., Rodríguez-Montesinos, J., Crespo-Avilan, G.E., Muñoz-Vega, M., and Preissner, K.T. (2020). Thrombin Promotes Macrophage Polarization into M1-Like Phenotype to Induce Inflammatory Responses. *Thromb Haemost* *120*, 658–670.
- Lynch, D.C., Zimmerman, T.S., Collins, C.J., Brown, M., Morin, M.J., Ling, E.H., and Livingston, D.M. (1985). Molecular cloning of cDNA for human von Willebrand factor: authentication by a new method. *Cell* *41*, 49–56.
- Lyons, S.E., Bruck, M.E., Bowie, E.J., and Ginsburg, D. (1992). Impaired intracellular transport produced by a subset of type IIA von Willebrand disease mutations. *J. Biol. Chem.* *267*, 4424–4430.
- Mackie, E.J., Loh, L.-H., Sivagurunathan, S., Uaesoontrachoon, K., Yoo, H.-J., Wong, D., Georgy, S.R., and Pagel, C.N. (2008). Protease-activated receptors in the musculoskeletal system. *Int J Biochem Cell Biol* *40*, 1169–1184.
- Madge, L.A., and Pober, J.S. (2001). TNF Signaling in Vascular Endothelial Cells. *Experimental and Molecular Pathology* *70*, 317–325.
- Mahlangu, J., Powell, J.S., Ragni, M.V., Chowdary, P., Josephson, N.C., Pabinger, I., Hanabusa, H., Gupta, N., Kulkarni, R., Fogarty, P., et al. (2014). Phase 3 study of recombinant factor VIII Fc fusion protein in severe hemophilia A. *Blood* *123*, 317–325.
- Mahlangu, J., Oldenburg, J., Paz-Priel, I., Negrier, C., Niggli, M., Mancuso, M.E., Schmitt, C., Jiménez-Yuste, V., Kempton, C., Dhalluin, C., et al. (2018). Emicizumab Prophylaxis in Patients Who Have Hemophilia A without Inhibitors. *N Engl J Med* *379*, 811–822.

- Makris, M., Federici, A.B., Mannucci, P.M., Bolton-Maggs, P.H.B., Yee, T.T., Abshire, T., and Berntorp, E. (2015). The natural history of occult or angiodysplastic gastrointestinal bleeding in von Willebrand disease. *Haemophilia* 21, 338–342.
- Manco-Johnson, M.J., Lundin, B., Funk, S., Peterfy, C., Raunig, D., Werk, M., Kempton, C.L., Reding, M.T., Goranov, S., Gercheva, L., et al. (2017). Effect of late prophylaxis in hemophilia on joint status: a randomized trial. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 15, 2115–2124.
- Mancuso, D.J., Tuley, E.A., Westfield, L.A., Worrall, N.K., Shelton-Inloes, B.B., Sorace, J.M., Alevy, Y.G., and Sadler, J.E. (1989). Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 264, 19514–19527.
- Mancuso, D.J., Tuley, E.A., Westfield, L.A., Lester-Mancuso, T.L., Le Beau, M.M., Sorace, J.M., and Sadler, J.E. (1991). Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry* 30, 253–269.
- Mancuso, D.J., Kroner, P.A., Christopherson, P.A., Vokac, E.A., Gill, J.C., and Montgomery, R.R. (1996). Type 2M:Milwaukee-1 von Willebrand disease: an in-frame deletion in the Cys509–Cys695 loop of the von Willebrand factor A1 domain causes deficient binding of von Willebrand factor to platelets. *Blood* 88, 2559–2568.
- Mancuso, M.E., Fischer, K., Santagostino, E., Oldenburg, J., Platokouki, H., Königs, C., Escuriola-Ettingshausen, C., Rivard, G.E., Cid, A.R., Carcao, M., et al. (2017). Risk Factors for the Progression from Low to High Titres in 260 Children with Severe Haemophilia A and Newly Developed Inhibitors. *Thromb Haemost* 117, 2274–2282.
- Mannucci, P.M. (2009). *Hemostatic Drugs* (Massachusetts Medical Society).
- Mannucci, P.M. (2019). New therapies for von Willebrand disease. *Blood Adv* 3, 3481–3487.
- Mannucci, P.M., and Cattaneo, M. (1992). Desmopressin: a nontransfusional treatment of hemophilia and von Willebrand disease. *Haemostasis* 22, 276–280.
- Mannucci, P.M., and Tuddenham, E.G. (2001). The hemophilias—from royal genes to gene therapy. *N. Engl. J. Med.* 344, 1773–1779.
- Mannucci, P.M., Canciani, M.T., Rota, L., and Donovan, B.S. (1981a). Response of factor VIII/von Willebrand factor to DDAVP in healthy subjects and patients with haemophilia A and von Willebrand's disease. *Br. J. Haematol.* 47, 283–293.
- Mannucci, P.M., Ruggeri, Z.M., Ciavarella, N., Kazatchkine, M.D., and Mowbray, J.F. (1981b). Precipitating antibodies to factor VIII/von Willebrand factor in von Willebrand's disease: effects on replacement therapy. *Blood* 57, 25–31.
- Mannucci, P.M., Kempton, C., Millar, C., Romond, E., Shapiro, A., Birschmann, I., Ragni, M.V., Gill, J.C., Yee, T.T., Klamroth, R., et al. (2013). Pharmacokinetics and safety of a novel recombinant human von Willebrand factor manufactured with a plasma-free method: a prospective clinical trial. *Blood* 122, 648–657.

- Manon-Jensen, T., Kjeld, N.G., and Karsdal, M.A. (2016). Collagen-mediated hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* *14*, 438–448.
- Mao, H., Lockyer, P., Townley-Tilson, W.H.D., Xie, L., and Pi, X. (2016). LRP1 Regulates Retinal Angiogenesis by Inhibiting PARP-1 Activity and Endothelial Cell Proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *36*, 350–360.
- Marchetti, G., Caruso, P., Lunghi, B., Pinotti, M., Lapecorella, M., Napolitano, M., Canella, A., Mariani, G., and Bernardi, F. (2008). Vitamin K-induced modification of coagulation phenotype in VKORC1 homozygous deficiency. *J. Thromb. Haemost.* *6*, 797–803.
- Marchioro, T.L., Hougie, C., Ragde, H., Epstein, R.B., and Thomas, E.D. (1969). Hemophilia: role of organ homografts. *Science* *163*, 188–190.
- Mariani, G., Herrmann, F.H., Dolce, A., Batorova, A., Etro, D., Peyvandi, F., Wulff, K., Schved, J.F., Auerswald, G., Ingerslev, J., et al. (2005). Clinical phenotypes and factor VII genotype in congenital factor VII deficiency. *Thromb. Haemost.* *93*, 481–487.
- Marieb, E.N., and Hoehn, K. (2010). *Anatomie et physiologie humaine*.
- Markowska, A.I., Liu, F.-T., and Panjwani, N. (2010). Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J. Exp. Med.* *207*, 1981–1993.
- Marquette, K.A., Pittman, D.D., and Kaufman, R.J. (1995). A 110-amino Acid Region within the A1-domain of Coagulation Factor VIII Inhibits Secretion from Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* *270*, 10297–10303.
- Marti, T., Rösselet, S.J., Titani, K., and Walsh, K.A. (1987). Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry* *26*, 8099–8109.
- Matsui, H., Hegadorn, C., Ozelo, M., Burnett, E., Tuttle, A., Labelle, A., McCray, P.B., Naldini, L., Brown, B., Hough, C., et al. (2011). A microRNA-regulated and GP64-pseudotyped lentiviral vector mediates stable expression of FVIII in a murine model of Hemophilia A. *Mol Ther* *19*, 723–730.
- Matsui, T., Titani, K., and Mizuochi, T. (1992). Structures of the asparagine-linked oligosaccharide chains of human von Willebrand factor. Occurrence of blood group A, B, and H(O) structures. *J. Biol. Chem.* *267*, 8723–8731.
- Mausser-Bunschoten, E.P., Nieuwenhuis, H.K., Roosendaal, G., and van den Berg, H.M. (1995). Low-dose immune tolerance induction in hemophilia A patients with inhibitors. *Blood* *86*, 983–988.
- Mausser-Bunschoten, E.P., Zijl, J.A.C., Mali, W., van Rinsum, A.C., van den Berg, H.M., and Roosendaal, G. (2005). Successful treatment of severe bleeding in hemophilic target joints by selective angiographic embolization. *Blood* *105*, 2654–2657.
- May, R.D., and Fung, M. (2015). Strategies targeting the IL-4/IL-13 axes in disease. *Cytokine* *75*, 89–116.

Mayadas, T.N., and Wagner, D.D. (1989). In vitro multimerization of von Willebrand factor is triggered by low pH. Importance of the propolypeptide and free sulfhydryls. *J. Biol. Chem.* *264*, 13497–13503.

Mazurier, C., and Meyer, D. (1996). Factor VIII binding assay of von Willebrand factor and the diagnosis of type 2N von Willebrand disease--results of an international survey. On behalf of the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb. Haemost.* *76*, 270–274.

Mazurier, C., Dieval, J., Jorieux, S., Delobel, J., and Goudemand, M. (1990). A new von Willebrand factor (vWF) defect in a patient with factor VIII (FVIII) deficiency but with normal levels and multimeric patterns of both plasma and platelet vWF. Characterization of abnormal vWF/FVIII interaction. *Blood* *75*, 20–26.

Mazurkiewicz-Pisarek, A., Płucienniczak, G., Ciach, T., and Płucienniczak, A. (2016). The factor VIII protein and its function. *Acta Biochim. Pol.* *63*, 11–16.

McCann, J.V., Xiao, L., Kim, D.J., Khan, O.F., Kowalski, P.S., Anderson, D.G., Pecot, C.V., Azam, S.H., Parker, J.S., Tsai, Y.S., et al. (2019). Endothelial miR-30c suppresses tumor growth via inhibition of TGF- β -induced Serpine1. *J Clin Invest* *129*, 1654–1670.

McGrath, R.T., McRae, E., Smith, O.P., and O'Donnell, J.S. (2010). Platelet von Willebrand factor--structure, function and biological importance. *Br. J. Haematol.* *148*, 834–843.

McGrath, R.T., van den Biggelaar, M., Byrne, B., O'Sullivan, J.M., Rawley, O., O'Kennedy, R., Voorberg, J., Preston, R.J.S., and O'Donnell, J.S. (2013). Altered glycosylation of platelet-derived von Willebrand factor confers resistance to ADAMTS13 proteolysis. *Blood* *122*, 4107–4110.

McIntosh, J., Lenting, P.J., Rosales, C., Lee, D., Rabbanian, S., Raj, D., Patel, N., Tuddenham, E.G.D., Christophe, O.D., McVey, J.H., et al. (2013). Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. *Blood* *121*, 3335–3344.

McMillan, C.W., and Roberts, H.R. (1966). Congenital combined deficiency of coagulation factors II, VII, IX and X. Report of a case. *N. Engl. J. Med.* *274*, 1313–1315.

McVey, J.H., Rallapalli, P.M., Kembell-Cook, G., Hampshire, D.J., Giansily-Blaizot, M., Gomez, K., Perkins, S.J., and Ludlam, C.A. (2020). The European Association for Haemophilia and Allied Disorders (EAHAD) Coagulation Factor Variant Databases: Important resources for haemostasis clinicians and researchers. *Haemophilia* *26*, 306–313.

Melchiorre, D., Linari, S., Manetti, M., Romano, E., Sofi, F., Matucci-Cerinic, M., Carulli, C., Innocenti, M., Ibba-Manneschi, L., and Castaman, G. (2016). Clinical, instrumental, serological and histological findings suggest that hemophilia B may be less severe than hemophilia A. *Haematologica* *101*, 219–225.

Mendes-Jorge, L., Ramos, D., Valença, A., López-Luppo, M., Pires, V.M.R., Catita, J., Nacher, V., Navarro, M., Carretero, A., Rodriguez-Baeza, A., et al. (2014). L-ferritin binding to scara5: a new iron traffic pathway potentially implicated in retinopathy. *PLoS One* *9*, e106974.

- Menegatti, M., and Peyvandi, F. (2009). Factor X deficiency. *Semin. Thromb. Hemost.* 35, 407–415.
- Menegatti, M., and Peyvandi, F. (2019). Treatment of rare factor deficiencies other than hemophilia. *Blood* 133, 415–424.
- Merlin, S., Famà, R., Borroni, E., Zanolini, D., Brusca, V., Zucchelli, S., and Follenzi, A. (2019). FVIII expression by its native promoter sustains long-term correction avoiding immune response in hemophilic mice. *Blood Adv* 3, 825–838.
- Mertens, G., Cassiman, J.J., Van den Berghe, H., Vermeylen, J., and David, G. (1992). Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells. Core protein characterization and antithrombin III binding properties. *J. Biol. Chem.* 267, 20435–20443.
- Meunier, S., Trossaërt, M., Berger, C., Borel-Derlon, A., Dirat, G., Donadel-Claeyssens, S., Assolant, A.D., Guérois, C., Lutz, P., Rafowicz, A., et al. (2009). [French guidelines. Long-term prophylaxis for severe haemophilia A and B children to prevent haemophilic arthropathy]. *Arch Pediatr* 16, 1571–1578.
- Meunier, S., d’oiron, R., Chambost, H., Dolimier, E., Guillet, B., and ORTHem 15-25 Study Group (2017). Choice of factor VIII/IX regimen in adolescents and young adults with severe or moderately severe haemophilia. A French national observational study (ORTHem 15-25). *Thromb Res* 151, 17–22.
- Mi, Y., Coonce, M., Fiete, D., Steirer, L., Dveksler, G., Townsend, R.R., and Baenziger, J.U. (2016). Functional Consequences of Mannose and Asialoglycoprotein Receptor Ablation. *J Biol Chem* 291, 18700–18717.
- Miao, H.Z., Sirachainan, N., Palmer, L., Kucab, P., Cunningham, M.A., Kaufman, R.J., and Pipe, S.W. (2004). Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion. *Blood* 103, 3412–3419.
- Michaux, G., Pullen, T.J., Haberichter, S.L., and Cutler, D.F. (2006). P-selectin binds to the D’-D3 domains of von Willebrand factor in Weibel-Palade bodies. *Blood* 107, 3922–3924.
- Michiels, J.J., and van Vliet, H.H. (1999). Acquired von Willebrand disease in monoclonal gammopathies: effectiveness of high-dose intravenous gamma globulin. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 5, 152–157.
- Michnick, D.A., Pittman, D.D., Wise, R.J., and Kaufman, R.J. (1994). Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage. *J. Biol. Chem.* 269, 20095–20102.
- Mikaëlsson, M.E., Forsman, N., and Oswaldsson, U.M. (1983). Human factor VIII: a calcium-linked protein complex. *Blood* 62, 1006–1015.
- Millet, P., McCall, C., and Yoza, B. (2013). RelB: an outlier in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 94, 941–951.

- Minagar, A., Long, A., Ma, T., Jackson, T.H., Kelley, R.E., Ostanin, D.V., Sasaki, M., Warren, A.C., Jawahar, A., Cappell, B., et al. (2003). Interferon (IFN)-beta 1a and IFN-beta 1b block IFN-gamma-induced disintegration of endothelial junction integrity and barrier. *Endothelium* *10*, 299–307.
- Mingot-Castellano, M.E. (2019). Clinical pattern of hemophilia and causes of variability. *Blood Coagul. Fibrinolysis* *30*, S4–S6.
- Mital, A. (2016). Acquired von Willebrand Syndrome. *Adv Clin Exp Med* *25*, 1337–1344.
- Mital, A., Prejzner, W., and Hellmann, A. (2015a). Acquired von Willebrand Syndrome During the Course of Myelofibrosis: Analysis of 32 Cases. *Adv Clin Exp Med* *24*, 1001–1006.
- Mital, A., Prejzner, W., Bieniaszewska, M., and Hellmann, A. (2015b). Prevalence of acquired von Willebrand syndrome during essential thrombocythemia: a retrospective analysis of 170 consecutive patients. *Pol. Arch. Med. Wewn.* *125*, 914–920.
- de Moerloose, P., Casini, A., and Neerman-Arbez, M. (2013). Congenital fibrinogen disorders: an update. *Semin. Thromb. Hemost.* *39*, 585–595.
- Mogilner, A., and Keren, K. (2009). The shape of motile cells. *Curr Biol* *19*, R762–771.
- Molinier-Frenkel, V., Prévost-Blondel, A., and Castellano, F. (2019). The IL4I1 Enzyme: A New Player in the Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Cells* *8*.
- Monahan, P.E., and Di Paola, J. (2010). Recombinant factor IX for clinical and research use. *Semin Thromb Hemost* *36*, 498–509.
- Morfini, M., Mannucci, P.M., Mariani, G., Panicucci, F., Petrucci, F., Baicchi, U., Capitanio, A., Ferrini, P.L., and Mandelli, F. (1976). Evaluation of prophylactic replacement therapy in haemophilia B. *Scand J Haematol* *16*, 41–47.
- Morita, H., Kagami, M., Ebata, Y., and Yoshimura, H. (1971). The occurrence of homozygous hemophilia in the female. *Acta Haematol.* *45*, 112–119.
- Muczynski, V., Casari, C., Moreau, F., Aymé, G., Kawecki, C., Legendre, P., Proulle, V., Christophe, O.D., Denis, C.V., and Lenting, P.J. (2018). A factor VIII-nanobody fusion protein forming an ultrastable complex with VWF: effect on clearance and antibody formation. *Blood* *132*, 1193–1197.
- Muller, W.A. (2016). Transendothelial migration: unifying principles from the endothelial perspective. *Immunological Reviews* *273*, 61–75.
- Muller, W.A., and Luscinskas, F.W. (2008). Assays of Transendothelial Migration in vitro. *Methods Enzymol* *443*, 155–176.
- Mullins, E.S., Kombrinck, K.W., Talmage, K.E., Shaw, M.A., Witte, D.P., Ullman, J.M., Degen, S.J., Sun, W., Flick, M.J., and Degen, J.L. (2009). Genetic elimination of prothrombin in adult mice is not compatible with survival and results in spontaneous hemorrhagic events in both heart and brain. *Blood* *113*, 696–704.

Mumford, A.D., Ackroyd, S., Alikhan, R., Bowles, L., Chowdary, P., Grainger, J., Mainwaring, J., Mathias, M., O'Connell, N., and BCSH Committee (2014). Guideline for the diagnosis and management of the rare coagulation disorders: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization guideline on behalf of the British Committee for Standards in Haematology. *Br. J. Haematol.* *167*, 304–326.

Musa, G., Cazorla-Vázquez, S., van Amerongen, M.J., Stemmler, M.P., Eckstein, M., Hartmann, A., Braun, T., Brabletz, T., and Engel, F.B. (2019). Gpr126 (Adgrg6) is expressed in cell types known to be exposed to mechanical stimuli. *Ann N Y Acad Sci* *1456*, 96–108.

Naderi, M., Dorgalaleh, A., Alizadeh, S., Tabibian, S., Hosseini, S., Shamsizadeh, M., and Bamedi, T. (2014). Clinical manifestations and management of life-threatening bleeding in the largest group of patients with severe factor XIII deficiency. *Int. J. Hematol.* *100*, 443–449.

Napolitano, M., Giansily-Blaizot, M., Dolce, A., Schved, J.F., Auerswald, G., Ingerslev, J., Bjerre, J., Altisent, C., Charoenkwan, P., Michaels, L., et al. (2013). Prophylaxis in congenital factor VII deficiency: indications, efficacy and safety. Results from the Seven Treatment Evaluation Registry (STER). *Haematologica* *98*, 538–544.

Natale, C.F., Lafaurie-Janvot, J., Ventre, M., Babataheri, A., and Barakat, A.I. (2019). Focal adhesion clustering drives endothelial cell morphology on patterned surfaces. *J R Soc Interface* *16*.

Nathwani, A.C., Tuddenham, E.G.D., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D.C., Chowdary, P., Riddell, A., Pie, A.J., Harrington, C., et al. (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* *365*, 2357–2365.

Nathwani, A.C., Reiss, U.M., Tuddenham, E.G.D., Rosales, C., Chowdary, P., McIntosh, J., Della Peruta, M., Lheriteau, E., Patel, N., Raj, D., et al. (2014). Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med* *371*, 1994–2004.

Navarrete, A., Dasgupta, S., Delignat, S., Caligiuri, G., Christophe, O.D., Bayry, J., Nicoletti, A., Kaveri, S.V., and Lacroix-Desmazes, S. (2009). Splenic marginal zone antigen-presenting cells are critical for the primary allo-immune response to therapeutic factor VIII in hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* *7*, 1816–1823.

Ndonwi, M., Tuley, E.A., and Broze, G.J., Jr (2010). The Kunitz-3 domain of TFPI- α is required for protein S-dependent enhancement of factor Xa inhibition. *Blood* *116*, 1344–1351.

Negrier, C., Shima, M., and Hoffman, M. (2019). The central role of thrombin in bleeding disorders. *Blood Rev* *38*, 100582.

Newell, J.L., and Fay, P.J. (2007). Proteolysis at Arg740 facilitates subsequent bond cleavages during thrombin-catalyzed activation of factor VIII. *J. Biol. Chem.* *282*, 25367–25375.

Ngo, J.C.K., Huang, M., Roth, D.A., Furie, B.C., and Furie, B. (2008). Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. *Structure* *16*, 597–606.

Nichols, W.L., Hultin, M.B., James, A.H., Manco-Johnson, M.J., Montgomery, R.R., Ortel, T.L., Rick, M.E., Sadler, J.E., Weinstein, M., and Yawn, B.P. (2008). von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia* 14, 171–232.

Nieuwenhuizen, L., Schutgens, R.E.G., Coeleveld, K., Mastbergen, S.C., Roosendaal, G., Biesma, D.H., and Lafeber, F.P.J.G. (2014). Hemarthrosis in hemophilic mice results in alterations in M1-M2 monocyte/macrophage polarization. *Thromb. Res.* 133, 390–395.

Nightingale, T., and Cutler, D. (2013). The secretion of von Willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story. *J. Thromb. Haemost.* 11 Suppl 1, 192–201.

Nilsson (1999). Commentary to Erik von Willebrand's original paper from 1926 'Hereditär pseudoheemofili.' *Haemophilia* 5, 220–221.

Nishino, M., Girma, J.P., Rothschild, C., Fressinaud, E., and Meyer, D. (1989). New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood* 74, 1591–1599.

Nissé, B.S. (1927). The Evidence of Transmission of Haemophilia Through the Male with a New Haemophilic Pedigree. *Annals of Eugenics* 2, 25–40.

Nogami, K., Shima, M., Hosokawa, K., Suzuki, T., Koide, T., Saenko, E.L., Scandella, D., Shibata, M., Kamisue, S., Tanaka, I., et al. (1999). Role of Factor VIII C2 Domain in Factor VIII Binding to Factor Xa. *J. Biol. Chem.* 274, 31000–31007.

Nogami, K., Shima, M., Hosokawa, K., Nagata, M., Koide, T., Saenko, E.L., Tanaka, I., Shibata, M., and Yoshioka, A. (2000). Factor VIII C2 domain contains the thrombin-binding site responsible for thrombin-catalyzed cleavage at Arg1689. *J. Biol. Chem.* 275, 25774–25780.

Nogami, K., Wakabayashi, H., and Fay, P.J. (2003). Mechanisms of factor Xa-catalyzed cleavage of the factor VIIIa A1 subunit resulting in cofactor inactivation. *J. Biol. Chem.* 278, 16502–16509.

Nogami, K., Lapan, K.A., Zhou, Q., Wakabayashi, H., and Fay, P.J. (2004). Identification of a factor Xa-interactive site within residues 337-372 of the factor VIII heavy chain. *J. Biol. Chem.* 279, 15763–15771.

Nogami, K., Saenko, E.L., Takeyama, M., Giddings, J.C., Yoshioka, A., and Shima, M. (2008). Identification of a thrombin-interactive site within the FVIII A2 domain that is responsible for the cleavage at Arg372. *Br J Haematol* 140, 433–443.

Nonaka, K., Kajiura, Y., Bando, M., Sakamoto, E., Inagaki, Y., Lew, J.H., Naruishi, K., Ikuta, T., Yoshida, K., Kobayashi, T., et al. (2018). Advanced glycation end-products increase IL-6 and ICAM-1 expression via RAGE, MAPK and NF- κ B pathways in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 53, 334–344.

Novotny, W.F., Girard, T.J., Miletich, J.P., and Broze, G.J. (1988). Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Blood* 72, 2020–2025.

- Novotny, W.F., Brown, S.G., Miletich, J.P., Rader, D.J., and Broze, G.J. (1991). Plasma antigen levels of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor in patient samples. *Blood* *78*, 387–393.
- Nurden, P., Chretien, F., Poujol, C., Winckler, J., Borel-Derlon, A., and Nurden, A. (2000). Platelet ultrastructural abnormalities in three patients with type 2B von Willebrand disease. *Br J Haematol* *110*, 704–714.
- Nurden, P., Debili, N., Vainchenker, W., Bobe, R., Bredoux, R., Corvazier, E., Combrie, R., Fressinaud, E., Meyer, D., Nurden, A.T., et al. (2006). Impaired megakaryocytopoiesis in type 2B von Willebrand disease with severe thrombocytopenia. *Blood* *108*, 2587–2595.
- Ohmori, T. (2020). Advances in gene therapy for hemophilia: basis, current status, and future perspectives. *Int J Hematol* *111*, 31–41.
- Ojala, J.R.M., Pikkarainen, T., Elmberger, G., and Tryggvason, K. (2013). Progressive reactive lymphoid connective tissue disease and development of autoantibodies in scavenger receptor A5-deficient mice. *Am J Pathol* *182*, 1681–1695.
- Oldenburg, J., von Brederlow, B., Fregin, A., Rost, S., Wolz, W., Eberl, W., Eber, S., Lenz, E., Schwaab, R., Brackmann, H.H., et al. (2000). Congenital deficiency of vitamin K dependent coagulation factors in two families presents as a genetic defect of the vitamin K-epoxide-reductase-complex. *Thromb. Haemost.* *84*, 937–941.
- Oldenburg, J., Mahlangu, J.N., Kim, B., Schmitt, C., Callaghan, M.U., Young, G., Santagostino, E., Kruse-Jarres, R., Negrier, C., Kessler, C., et al. (2017). Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors. *N Engl J Med* *377*, 809–818.
- Opal, S.M., Kessler, C.M., Roemisch, J., and Knaub, S. (2002). Antithrombin, heparin, and heparan sulfate. *Crit. Care Med.* *30*, S325–331.
- O’Sullivan, J.M., Jenkins, P.V., Rawley, O., Gegenbauer, K., Chion, A., Lavin, M., Byrne, B., O’Kennedy, R., Preston, R.J.S., Brophy, T.M., et al. (2016). Galectin-1 and Galectin-3 Constitute Novel-Binding Partners for Factor VIII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *36*, 855–863.
- Otto, J.C. (1996). An account of an hemorrhagic disposition existing in certain families. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 4–6.
- Pagel, C.N., Song, S.-J., Loh, L.H., Tudor, E.M., Murray-Rust, T.A., Pike, R.N., and Mackie, E.J. (2009). Thrombin-stimulated growth factor and cytokine expression in osteoblasts is mediated by protease-activated receptor-1 and prostanoids. *Bone* *44*, 813–821.
- Pal, A., Severin, F., Lommer, B., Shevchenko, A., and Zerial, M. (2006). Huntingtin–HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington’s disease. *J Cell Biol* *172*, 605–618.
- Palla, R., Peyvandi, F., and Shapiro, A.D. (2015). Rare bleeding disorders: diagnosis and treatment. *Blood* *125*, 2052–2061.

- Palta, S., Saroa, R., and Palta, A. (2014). Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth* 58, 515–523.
- Pan, J., Dinh, T.T., Rajaraman, A., Lee, M., Scholz, A., Czupalla, C.J., Kiefel, H., Zhu, L., Xia, L., Morser, J., et al. (2016). Patterns of expression of factor VIII and von Willebrand factor by endothelial cell subsets in vivo. *Blood* 128, 104–109.
- Pannekoek, H., and Voorberg, J. (1989). Molecular cloning, expression and assembly of multimeric von Willebrand factor. *Baillieres Clin. Haematol.* 2, 879–896.
- Parameswaran, R., Dickinson, J.P., Lord, S.D., Keeling, D.M., and Colvin, B.T. (2000). Spontaneous intracranial bleeding in two patients with congenital afibrinogenemia and the role of replacement therapy. *Haemophilia* 6, 705–708.
- Pareti, F.I., Niiya, K., McPherson, J.M., and Ruggeri, Z.M. (1987). Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen types I and III. *J. Biol. Chem.* 262, 13835–13841.
- Paris, L.L., Chihara, R.K., Reyes, L.M., Sidner, R.A., Estrada, J.L., Downey, S.M., Milgrom, D.P., Milgrom, D.A., Tector, A.J., and Burlak, C. (2011). ASGR1 expressed by porcine enriched liver sinusoidal endothelial cells mediates human platelet phagocytosis in vitro. *Xenotransplantation* 18, 245–251.
- Park, Y.H., Lim, J.H., Yi, H.G., Lee, M.H., and Kim, C.S. (2016). Factor V Deficiency in Korean Patients: Clinical and Laboratory Features, Treatment, and Outcome. *J Korean Med Sci* 31, 208–213.
- Parri, M., and Chiarugi, P. (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun Signal* 8, 23.
- Parsons, J.T., Horwitz, A.R., and Schwartz, M.A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 633–643.
- Pasi, K.J., Rangarajan, S., Georgiev, P., Mant, T., Creagh, M.D., Lissitchkov, T., Bevan, D., Austin, S., Hay, C.R., Hegemann, I., et al. (2017). Targeting of Antithrombin in Hemophilia A or B with RNAi Therapy (Massachusetts Medical Society).
- Patel-Hett, S., Martin, E.J., Mohammed, B.M., Rakhe, S., Sun, P., Barrett, J.C., Nolte, M.E., Kuhn, J., Pittman, D.D., Murphy, J.E., et al. (2019). Marstacimab, a tissue factor pathway inhibitor neutralizing antibody, improves coagulation parameters of ex vivo dosed haemophilic blood and plasmas. *Haemophilia* 25, 797–806.
- Pegon, J.N., Kurdi, M., Casari, C., Odouard, S., Denis, C.V., Christophe, O.D., and Lenting, P.J. (2012). Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica* 97, 1855–1863.
- Pellequer, J.-L., Chen, S.W., Saboulard, D., Delcourt, M., Négrier, C., and Plantier, J.-L. (2011). Functional mapping of factor VIII C2 domain. *Thromb. Haemost.* 106, 121–131.

Pendu, R., Terraube, V., Christophe, O.D., Gahmberg, C.G., de Groot, P.G., Lenting, P.J., and Denis, C.V. (2006). P-selectin glycoprotein ligand 1 and beta2-integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor. *Blood* 108, 3746–3752.

Petri, B., Broermann, A., Li, H., Khandoga, A.G., Zarbock, A., Krombach, F., Goerge, T., Schneider, S.W., Jones, C., Nieswandt, B., et al. (2010). von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation. *Blood* 116, 4712–4719.

Peyvandi, F., Mannucci, P.M., Asti, D., Abdoullahi, M., DI Rocco, N., and Sharifian, R. (1997). Clinical manifestations in 28 Italian and Iranian patients with severe factor VII deficiency. *Haemophilia* 3, 242–246.

Peyvandi, F., Tuddenham, E.G., Akhtari, A.M., Lak, M., and Mannucci, P.M. (1998a). Bleeding symptoms in 27 Iranian patients with the combined deficiency of factor V and factor VIII. *Br. J. Haematol.* 100, 773–776.

Peyvandi, F., Mannucci, P.M., Lak, M., Abdoullahi, M., Zeinali, S., Sharifian, R., and Perry, D. (1998b). Congenital factor X deficiency: spectrum of bleeding symptoms in 32 Iranian patients. *Br. J. Haematol.* 102, 626–628.

Peyvandi, F., Haertel, S., Knaub, S., and Mannucci, P.M. (2006). Incidence of bleeding symptoms in 100 patients with inherited afibrinogenemia or hypofibrinogenemia. *J. Thromb. Haemost.* 4, 1634–1637.

Peyvandi, F., Palla, R., Menegatti, M., Siboni, S.M., Halimeh, S., Faeser, B., Pergantou, H., Platokouki, H., Giangrande, P., Peerlinck, K., et al. (2012). Coagulation factor activity and clinical bleeding severity in rare bleeding disorders: results from the European Network of Rare Bleeding Disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 10, 615–621.

Peyvandi, F., Menegatti, M., and Palla, R. (2013). Rare bleeding disorders: worldwide efforts for classification, diagnosis, and management. *Semin. Thromb. Hemost.* 39, 579–584.

Peyvandi, F., Garagiola, I., and Biguzzi, E. (2016a). Advances in the treatment of bleeding disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 14, 2095–2106.

Peyvandi, F., Garagiola, I., and Young, G. (2016b). The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. *Lancet* 388, 187–197.

Peyvandi, F., Ettingshausen, C.E., Goudemand, J., Jiménez-Yuste, V., Santagostino, E., and Makris, M. (2017). New findings on inhibitor development: from registries to clinical studies. *Haemophilia* 23 Suppl 1, 4–13.

Peyvandi, F., Mamaev, A., Wang, J.-D., Stasyshyn, O., Timofeeva, M., Curry, N., Cid, A.R., Yee, T.T., Kavakli, K., Castaman, G., et al. (2019). Phase 3 study of recombinant von Willebrand factor in patients with severe von Willebrand disease who are undergoing elective surgery. *J. Thromb. Haemost.* 17, 52–62.

- Pflanzner, T., Janko, M.C., André-Dohmen, B., Reuss, S., Weggen, S., Roebroek, A.J.M., Kuhlmann, C.R.W., and Pietrzik, C.U. (2011). LRP1 mediates bidirectional transcytosis of amyloid- β across the blood-brain barrier. *Neurobiol Aging* 32, 2323.e1-11.
- Pi, L., Shenoy, A.K., Liu, J., Kim, S., Nelson, N., Xia, H., Hauswirth, W.W., Petersen, B.E., Schultz, G.S., and Scott, E.W. (2012a). CCN2/CTGF regulates neovessel formation via targeting structurally conserved cystine knot motifs in multiple angiogenic regulators. *FASEB J.* 26, 3365–3379.
- Pi, X., Schmitt, C.E., Xie, L., Portbury, A.L., Wu, Y., Lockyer, P., Dyer, L.A., Moser, M., Bu, G., Flynn, E.J., et al. (2012b). LRP1-dependent endocytic mechanism governs the signaling output of the bmp system in endothelial cells and in angiogenesis. *Circ Res* 111, 564–574.
- Pimanda, J.E., Ganderton, T., Maekawa, A., Yap, C.L., Lawler, J., Kershaw, G., Chesterman, C.N., and Hogg, P.J. (2004). Role of thrombospondin-1 in control of von Willebrand factor multimer size in mice. *J. Biol. Chem.* 279, 21439–21448.
- Pipe, S.W. (2009). Functional roles of the factor VIII B domain. *Haemophilia* 15, 1187–1196.
- Pipe, S.W., Morris, J.A., Shah, J., and Kaufman, R.J. (1998). Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin. *J Biol Chem* 273, 8537–8544.
- Pipe, S.W., Montgomery, R.R., Pratt, K.P., Lenting, P.J., and Lillicrap, D. (2016). Life in the shadow of a dominant partner: the FVIII-VWF association and its clinical implications for hemophilia A. *Blood* 128, 2007–2016.
- Plug, I., Mauser-Bunschoten, E.P., Bröcker-Vriends, A.H.J.T., van Amstel, H.K.P., van der Bom, J.G., van Diemen-Homan, J.E.M., Willemse, J., and Rosendaal, F.R. (2006). Bleeding in carriers of hemophilia. *Blood* 108, 52–56.
- Pluthero, F.G., and Kahr, W.H.A. (2018). Imaging Platelets and Megakaryocytes by High-Resolution Laser Fluorescence Microscopy. *Methods Mol. Biol.* 1812, 13–31.
- Polack, B., Calvez, T., Chambost, H., Rothschild, C., Goudemand, J., Claeysens, S., Borel-Derlon, A., Bardoulat, I., Maurel, F., Woronoff-Lemsi, M.-C., et al. (2015). EQOFIX: a combined economic and quality-of-life study of hemophilia B treatments in France. *Transfusion* 55, 1787–1797.
- Pollard, T.D. (2016). Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465.
- Pool, J.G., and Shannon, A.E. (1965). Production of high-potency concentrates of antihemophilic globulin in a closed-bag system. *N. Engl. J. Med.* 273, 1443–1447.
- Powell, J.S. (2015). Longer-acting clotting factor concentrates for hemophilia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 13, S167–S175.

- PrabhuDas, M.R., Baldwin, C.L., Bollyky, P.L., Bowdish, D.M.E., Drickamer, K., Febbraio, M., Herz, J., Kobzik, L., Krieger, M., Loike, J., et al. (2017). A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *J Immunol* 198, 3775–3789.
- Price, G.C., Thompson, S.A., and Kam, P.C.A. (2004). Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *Anaesthesia* 59, 483–492.
- Pryzdial, E.L.G., Lee, F.M.H., Lin, B.H., Carter, R.L.R., Tegegn, T.Z., and Belletrutti, M.J. (2018). Blood coagulation dissected. *Transfus. Apher. Sci.* 57, 449–457.
- Quadri, S.K. (2012). Cross talk between focal adhesion kinase and cadherins: role in regulating endothelial barrier function. *Microvasc Res* 83, 3–11.
- Randi, A.M., and Laffan, M.A. (2017). Von Willebrand factor and angiogenesis: basic and applied issues. *J. Thromb. Haemost.* 15, 13–20.
- Randi, A.M., Smith, K.E., and Castaman, G. (2018). von Willebrand factor regulation of blood vessel formation. *Blood* 132, 132–140.
- Rangarajan, S., Walsh, L., Lester, W., Perry, D., Madan, B., Laffan, M., Yu, H., Vettermann, C., Pierce, G.F., Wong, W.Y., et al. (2017). AAV5-Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. *N Engl J Med* 377, 2519–2530.
- Rao, L.V., and Rapaport, S.I. (1988). Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6687–6691.
- Raso, S., and Hermans, C. (2018). Recombinant factor VIII: past, present and future of treatment of hemophilia A. *Drugs Today (Barc)* 54, 269–281.
- Rastegarlar, G., Pegon, J.N., Casari, C., Odouard, S., Navarrete, A.-M., Saint-Lu, N., van Vlijmen, B.J., Legendre, P., Christophe, O.D., Denis, C.V., et al. (2012). Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Blood* 119, 2126–2134.
- Rayes, J., Hollestelle, M.J., Legendre, P., Marx, I., de Groot, P.G., Christophe, O.D., Lenting, P.J., and Denis, C.V. (2010). Mutation and ADAMTS13-dependent modulation of disease severity in a mouse model for von Willebrand disease type 2B. *Blood* 115, 4870–4877.
- Rehmtulla, A., and Kaufman, R.J. (1992). Preferred sequence requirements for cleavage of pro-von Willebrand factor by propeptide-processing enzymes. *Blood* 79, 2349–2355.
- Ribba, A.S., Loisel, I., Lavergne, J.M., Juhan-Vague, I., Obert, B., Cherel, G., Meyer, D., and Girma, J.P. (2001). Ser968Thr mutation within the A3 domain of von Willebrand factor (VWF) in two related patients leads to a defective binding of VWF to collagen. *Thromb. Haemost.* 86, 848–854.
- Rieser, E., Cordier, S.M., and Walczak, H. (2013). Linear ubiquitination: a newly discovered regulator of cell signalling. *Trends Biochem Sci* 38, 94–102.

- Rivera, J., Lozano, M.L., Navarro-Núñez, L., and Vicente, V. (2009). Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* 94, 700–711.
- Robinson, K.S. (2019). An overview of inherited factor VII deficiency. *Transfus. Apher. Sci.* 58, 569–571.
- Rodeghiero, F., Castaman, G., and Dini, E. (1987). Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 69, 454–459.
- Rodeghiero, F., Castaman, G., and Toso, A. (2009). How I treat von Willebrand disease. *Blood* 114, 1158–1165.
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C.A., and Gurtner, G.C. (2019). Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol. Rev.* 99, 665–706.
- Rodriguez-Merchan, E.C., and Valentino, L.A. (2019). Increased bone resorption in hemophilia. *Blood Rev* 33, 6–10.
- Rogaev, E.I., Grigorenko, A.P., Faskhutdinova, G., Kittler, E.L.W., and Moliaka, Y.K. (2009). Genotype analysis identifies the cause of the “royal disease.” *Science* 326, 817.
- Roggenbuck, D., Mytilinaïou, M.G., Lapin, S.V., Reinhold, D., and Conrad, K. (2012). Asialoglycoprotein receptor (ASGPR): a peculiar target of liver-specific autoimmunity. *Auto Immun Highlights* 3, 119–125.
- Romani de Wit, T., Rondaij, M.G., Hordijk, P.L., Voorberg, J., and van Mourik, J.A. (2003). Real-time imaging of the dynamics and secretory behavior of Weibel-Palade bodies. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 755–761.
- Rose, T., and Di Cera, E. (2002). Three-dimensional modeling of thrombin-fibrinogen interaction. *J. Biol. Chem.* 277, 18875–18880.
- Rosenberg, J.B., Foster, P.A., Kaufman, R.J., Vokac, E.A., Moussalli, M., Kroner, P.A., and Montgomery, R.R. (1998). Intracellular trafficking of factor VIII to von Willebrand factor storage granules. *J. Clin. Invest.* 101, 613–624.
- Rosendaal, F.R., Smit, C., and Briët, E. (1991). Hemophilia treatment in historical perspective: a review of medical and social developments. *Ann. Hematol.* 62, 5–15.
- Rosner, F. (1969). Hemophilia in the Talmud and rabbinic writings. *Ann. Intern. Med.* 70, 833–837.
- Rost, S., Fregin, A., Ivaskевичius, V., Conzelmann, E., Hörtnagel, K., Pelz, H.-J., Lappégard, K., Seifried, E., Scharrer, I., Tuddenham, E.G.D., et al. (2004a). Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427, 537–541.
- Rost, S., Fregin, A., Koch, D., Compes, M., Müller, C.R., and Oldenburg, J. (2004b). Compound heterozygous mutations in the gamma-glutamyl carboxylase gene cause combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Br. J. Haematol.* 126, 546–549.

Royal, S., Schramm, W., Berntorp, E., Giangrande, P., Gringeri, A., Ludlam, C., Kroner, B., Szucs, T., and European haemophilia economics study group (2002). Quality-of-life differences between prophylactic and on-demand factor replacement therapy in European haemophilia patients. *Haemophilia* 8, 44–50.

Ruggeri, Z.M., and Ware, J. (1993). von Willebrand factor. *FASEB J.* 7, 308–316.

Ruggeri, Z.M., and Zimmerman, T.S. (1980). Variant von Willebrand's disease: characterization of two subtypes by analysis of multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor in plasma and platelets. *J. Clin. Invest.* 65, 1318–1325.

Ruggeri, Z.M., Nilsson, I.M., Lombardi, R., Holmberg, L., and Zimmerman, T.S. (1982a). Aberrant multimeric structure of von Willebrand factor in a new variant of von Willebrand's disease (type IIC). *J. Clin. Invest.* 70, 1124–1127.

Ruggeri, Z.M., Mannucci, P.M., Lombardi, R., Federici, A.B., and Zimmerman, T.S. (1982b). Multimeric composition of factor VIII/von Willebrand factor following administration of DDAVP: implications for pathophysiology and therapy of von Willebrand's disease subtypes. *Blood* 59, 1272–1278.

Rydz, N., Swystun, L.L., Notley, C., Paterson, A.D., Riches, J.J., Sponagle, K., Boonyawat, B., Montgomery, R.R., James, P.D., and Lillicrap, D. (2013). The C-type lectin receptor CLEC4M binds, internalizes, and clears von Willebrand factor and contributes to the variation in plasma von Willebrand factor levels. *Blood* 121, 5228–5237.

Sadler, J.E. (1994). A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb. Haemost.* 71, 520–525.

Sadler, J.E., Shelton-Inloes, B.B., Sorace, J.M., Harlan, J.M., Titani, K., and Davie, E.W. (1985). Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. *PNAS* 82, 6394–6398.

Sadler, J.E., Budde, U., Eikenboom, J.C.J., Favaloro, E.J., Hill, F.G.H., Holmberg, L., Ingerslev, J., Lee, C.A., Lillicrap, D., Mannucci, P.M., et al. (2006). Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *J. Thromb. Haemost.* 4, 2103–2114.

Saenko, E.L., and Scandella, D. (1995). A Mechanism for Inhibition of Factor VIII Binding to Phospholipid by von Willebrand Factor. *J. Biol. Chem.* 270, 13826–13833.

Saenko, E.L., Shima, M., and Sarafanov, A.G. (1999a). Role of activation of the coagulation factor VIII in interaction with vWf, phospholipid, and functioning within the factor Xase complex. *Trends Cardiovasc. Med.* 9, 185–192.

Saenko, E.L., Yakhyayev, A.V., Mikhailenko, I., Strickland, D.K., and Sarafanov, A.G. (1999b). Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J. Biol. Chem.* 274, 37685–37692.

- Saint-Lu, N., Oortwijn, B.D., Pegon, J.N., Odouard, S., Christophe, O.D., de Groot, P.G., Denis, C.V., and Lenting, P.J. (2012). Identification of galectin-1 and galectin-3 as novel partners for von Willebrand factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 894–901.
- Saito, M., Asakura, H., Yoshida, T., Ito, K., Okafuji, K., Yoshida, T., and Matsuda, T. (1990). A familial factor XIII subunit B deficiency. *Br. J. Haematol.* 74, 290–294.
- Saleem, M., Qadir, M.I., Perveen, N., Ahmad, B., Saleem, U., Irshad, T., and Ahmad, B. (2013). Inhibitors of apoptotic proteins: new targets for anticancer therapy. *Chem Biol Drug Des* 82, 243–251.
- Šalek, S.Z., Auerswald, G., Benson, G., Dolan, G., Duffy, A., Hermans, C., Jiménez-Yuste, V., Ljung, R., Morfini, M., Santagostino, E., et al. (2017). Beyond stopping the bleed: short-term episodic prophylaxis with recombinant activated factor FVII in haemophilia patients with inhibitors. *Blood Transfus* 15, 77–84.
- Salomon, O., Steinberg, D.M., and Seligshon, U. (2006). Variable bleeding manifestations characterize different types of surgery in patients with severe factor XI deficiency enabling parsimonious use of replacement therapy. *Haemophilia* 12, 490–493.
- Samor, B., Michalski, J.C., Mazurier, C., Goudemand, M., De Waard, P., Vliegenthart, J.F., Strecker, G., and Montreuil, J. (1989). Primary structure of the major O-glycosidically linked carbohydrate unit of human von Willebrand factor. *Glycoconj. J.* 6, 263–270.
- Samuelson Bannow, B., Recht, M., Négrier, C., Hermans, C., Berntorp, E., Eichler, H., Mancuso, M.E., Klamroth, R., O’Hara, J., Santagostino, E., et al. (2019). Factor VIII: Long-established role in haemophilia A and emerging evidence beyond haemostasis. *Blood Rev.* 35, 43–50.
- Sanada, F., Taniyama, Y., Muratsu, J., Otsu, R., Iwabayashi, M., Carracedo, M., Rakugi, H., and Morishita, R. (2016). Activated Factor X Induces Endothelial Cell Senescence Through IGFBP-5. *Scientific Reports* 6, 35580.
- Sanders, Y.V., Fijnvandraat, K., Boender, J., Mauser-Bunschoten, E.P., Bom, J.G. van der, Meris, J. de, Smiers, F.J., Granzen, B., Brons, P., Tamminga, R.Y.J., et al. (2015). Bleeding spectrum in children with moderate or severe von Willebrand disease: Relevance of pediatric-specific bleeding. *American Journal of Hematology* 90, 1142–1148.
- Sandset, P.M., Abildgaard, U., and Larsen, M.L. (1988). Heparin induces release of extrinsic coagulation pathway inhibitor (EPI). *Thromb. Res.* 50, 803–813.
- Sarafanov, A.G., Ananyeva, N.M., Shima, M., and Saenko, E.L. (2001). Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans Participate in Factor VIII Catabolism Mediated by Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein. *J. Biol. Chem.* 276, 11970–11979.
- Saudou, F., and Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. *Neuron* 89, 910–926.
- Sauna, Z.E., Lozier, J.N., Kasper, C.K., Yanover, C., Nichols, T., and Howard, T.E. (2015). The intron-22-inverted F8 locus permits factor VIII synthesis: explanation for low inhibitor risk and a role for pharmacogenomics. *Blood* 125, 223–228.

Schep, S.J., Schutgens, R.E.G., Fischer, K., and Boes, M.L. (2018). Review of immune tolerance induction in hemophilia A. *Blood Rev.* 32, 326–338.

Schmidbauer, S., Witzel, R., Robbel, L., Sebastian, P., Grammel, N., Metzner, H.J., and Schulte, S. (2015). Physicochemical characterisation of rVIII-SingleChain, a novel recombinant single-chain factor VIII. *Thromb Res* 136, 388–395.

Schmidt, A.M., Hori, O., Chen, J.X., Li, J.F., Crandall, J., Zhang, J., Cao, R., Yan, S.D., Brett, J., and Stern, D. (1995). Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 96, 1395–1403.

Schneider, S.W., Nuschele, S., Wixforth, A., Gorzelanny, C., Alexander-Katz, A., Netz, R.R., and Schneider, M.F. (2007). Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 7899–7903.

Schneppenheim, R., Brassard, J., Krey, S., Budde, U., Kunicki, T.J., Holmberg, L., Ware, J., and Ruggeri, Z.M. (1996). Defective dimerization of von Willebrand factor subunits due to a Cys->Arg mutation in type IID von Willebrand disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 3581–3586.

Schneppenheim, R., Budde, U., and Ruggeri, Z.M. (2001). A molecular approach to the classification of von Willebrand disease. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 14, 281–298.

van Schooten, C.J., Shahbazi, S., Groot, E., Oortwijn, B.D., van den Berg, H.M., Denis, C.V., and Lenting, P.J. (2008). Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo. *Blood* 112, 1704–1712.

Schramm, W. (2014). The history of haemophilia - a short review. *Thromb. Res.* 134 *Suppl* 1, S4-9.

Schramm, W., Gringeri, A., Ljung, R., Berger, K., Crispin, A., Bullinger, M., Giangrande, P.L.F., Von Mackensen, S., Mantovani, L.G., Nemes, L., et al. (2012). Haemophilia care in Europe: the ESCHQoL study. *Haemophilia* 18, 729–737.

Sehgal, A., Barros, S., Ivanciu, L., Cooley, B., Qin, J., Racie, T., Hettinger, J., Carioto, M., Jiang, Y., Brodsky, J., et al. (2015). An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nature Medicine* 21, 492–497.

Seligsohn, U., Zivelin, A., and Zwang, E. (1982). Combined factor V and factor VIII deficiency among non-Ashkenazi Jews. *N. Engl. J. Med.* 307, 1191–1195.

Sessa, M., Lorioli, L., Fumagalli, F., Acquati, S., Redaelli, D., Baldoli, C., Canale, S., Lopez, I.D., Morena, F., Calabria, A., et al. (2016). Lentiviral haemopoietic stem-cell gene therapy in early-onset metachromatic leukodystrophy: an ad-hoc analysis of a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet* 388, 476–487.

- Seth Chhabra, E., Liu, T., Kulman, J., Patarroyo-White, S., Yang, B., Lu, Q., Drager, D., Moore, N., Liu, J., Holthaus, A.M., et al. (2020). BIVV001, a new class of factor VIII replacement for hemophilia A that is independent of von Willebrand factor in primates and mice. *Blood* 135, 1484–1496.
- Shah, A., Coyle, T., Lalezari, S., Fischer, K., Kohlstaedde, B., Delesen, H., Radke, S., and Michaels, L.A. (2018). BAY 94-9027, a PEGylated recombinant factor VIII, exhibits a prolonged half-life and higher area under the curve in patients with severe haemophilia A: Comprehensive pharmacokinetic assessment from clinical studies. *Haemophilia* 24, 733–740.
- Shahani, T., Covens, K., Lavend'homme, R., Jazouli, N., Sokal, E., Peerlinck, K., and Jacquemin, M. (2014). Human liver sinusoidal endothelial cells but not hepatocytes contain factor VIII. *J. Thromb. Haemost.* 12, 36–42.
- Shahbazi, S., Lenting, P.J., Fribourg, C., Terraube, V., Denis, C.V., and Christophe, O.D. (2007). Characterization of the interaction between von Willebrand factor and osteoprotegerin. *J. Thromb. Haemost.* 5, 1956–1962.
- Shahi, M., Peymani, A., and Sahmani, M. (2017). Regulation of Bone Metabolism. *Rep Biochem Mol Biol* 5, 73–82.
- Shao, Y., Wu, W., Xu, G., Wang, X., and Ding, Q. (2019). Low factor V level ameliorates bleeding diathesis in patients with combined deficiency of factor V and factor VIII. *Blood* 134, 1745–1754.
- Shapiro, J.P., Guzeloglu-Kayisli, O., Kayisli, U.A., Semerci, N., Huang, S.J., Arlier, S., Larsen, K., Fadda, P., Schatz, F., and Lockwood, C.J. (2017). Thrombin impairs human endometrial endothelial angiogenesis; implications for progestin-only contraceptive-induced abnormal uterine bleeding. *Contraception* 95, 592–601.
- Shapiro, S.E., Nowak, A.A., Wooding, C., Birdsey, G., Laffan, M.A., and McKinnon, T. a. J. (2014). The von Willebrand factor predicted unpaired cysteines are essential for secretion. *J. Thromb. Haemost.* 12, 246–254.
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* 233, 6425–6440.
- Shelton-Inloes, B.B., Chehab, F.F., Mannucci, P.M., Federici, A.B., and Sadler, J.E. (1987). Gene deletions correlate with the development of alloantibodies in von Willebrand disease. *J Clin Invest* 79, 1459–1465.
- Sheu, S.L. (2018). Treatment of melasma using tranexamic acid: what's known and what's next. *Cutis* 101, E7–E8.
- Shi, J., Pipe, S.W., Rasmussen, J.T., Heegaard, C.W., and Gilbert, G.E. (2008). Lactadherin blocks thrombosis and hemostasis in vivo: correlation with platelet phosphatidylserine exposure. *J. Thromb. Haemost.* 6, 1167–1174.

- Shi, M., Wang, L., Zhou, J., Ji, S., Wang, N., Tong, L., Bi, J., Song, Y., Hu, J., and Chen, X. (2018). Direct factor Xa inhibition attenuates acute lung injury progression via modulation of the PAR-2/NF- κ B signaling pathway. *Am J Transl Res* 10, 2335–2349.
- Shi, Q., Wilcox, D.A., Fahs, S.A., Weiler, H., Wells, C.W., Cooley, B.C., Desai, D., Morateck, P.A., Gorski, J., and Montgomery, R.R. (2006). Factor VIII ectopically targeted to platelets is therapeutic in hemophilia A with high-titer inhibitory antibodies. *J. Clin. Invest.* 116, 1974–1982.
- Siaka, C., Rugeri, L., Caron, C., and Goudemand, J. (2003). A new ELISA assay for diagnosis of acquired von Willebrand syndrome. *Haemophilia* 9, 303–308.
- Siddiqui, J.A., and Partridge, N.C. (2017). CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein 1 and Parathyroid Hormone Action on Bone. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8, 49.
- Siedlecki, C.A., Lestini, B.J., Kottke-Marchant, K.K., Eppell, S.J., Wilson, D.L., and Marchant, R.E. (1996). Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* 88, 2939–2950.
- Sieg, D.J., Hauck, C.R., Ilic, D., Klingbeil, C.K., Schaefer, E., Damsky, C.H., and Schlaepfer, D.D. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2, 249–256.
- Siew, D.-A., Mangel, J., Laudenschlager, L., Schembri, S., and Minuk, L. (2014). Desmopressin responsiveness at a capped dose of 15 μ g in type 1 von Willebrand disease and mild hemophilia A. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 25, 820–823.
- Silberstein, L.E., Abrahm, J., and Shattil, S.J. (1987). The efficacy of intensive plasma exchange in acquired von Willebrand's disease. *Transfusion* 27, 234–237.
- Simone, J.V., Cornet, J.A., and Abildgaard, C.F. (1968). Acquired von Willebrand's syndrome in systemic lupus erythematosus. *Blood* 31, 806–812.
- Siragusa, M., and Fleming, I. (2016). The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction. *Pflugers Arch* 468, 1125–1137.
- Sjöblom, B., Salmazo, A., and Djinović-Carugo, K. (2008). Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* 65, 2688–2701.
- Soeda, T., Nogami, K., Matsumoto, T., Ogiwara, K., and Shima, M. (2010). Mechanisms of factor VIIa-catalyzed activation of factor VIII. *J. Thromb. Haemost.* 8, 2494–2503.
- Somjen, D., Sharfman, Z.T., Katzburg, S., Sharon, O., Maman, E., Salai, M., Stern, N., and Dolkart, O. (2017). Rivaroxaban significantly inhibits the stimulatory effects of bone-modulating hormones: In vitro study of primary female osteoblasts. *Connect Tissue Res* 58, 215–220.
- Song, M.-J., Kim, H.-J., Yoo, K.-Y., Park, I.-A., Lee, K.-O., Ki, C.-S., and Kim, S.-H. (2011). Molecular characterization of female hemophilia A by multiplex ligation-dependent probe amplification analysis and X-chromosome inactivation study. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 22, 211–214.

- Soni, D., Wang, D.-M., Regmi, S.C., Mittal, M., Vogel, S.M., Schlüter, D., and Tiruppathi, C. (2018). Deubiquitinase function of A20 maintains and repairs endothelial barrier after lung vascular injury. *Cell Death Discov* 4, 60.
- Soute, B.A., Ulrich, M.M., Watson, A.D., Maddison, J.E., Ebberink, R.H., and Vermeer, C. (1992). Congenital deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors due to a defective vitamin K-dependent carboxylase in Devon Rex cats. *Thromb. Haemost.* 68, 521–525.
- Sporn, L.A., Chavin, S.I., Marder, V.J., and Wagner, D.D. (1985). Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J. Clin. Invest.* 76, 1102–1106.
- Sporn, L.A., Marder, V.J., and Wagner, D.D. (1986). Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell* 46, 185–190.
- Springer, T.A. (2011). Biology and physics of von Willebrand factor concatamers. *J. Thromb. Haemost.* 9 Suppl 1, 130–143.
- Springer, T.A. (2014). von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood* 124, 1412–1425.
- Srivastava, A., Brewer, A.K., Mauser-Bunschoten, E.P., Key, N.S., Kitchen, S., Llinas, A., Ludlam, C.A., Mahlangu, J.N., Mulder, K., Poon, M.C., et al. (2013). Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia* 19, e1–e47.
- Starke, R.D., Ferraro, F., Paschalaki, K.E., Dryden, N.H., McKinnon, T.A.J., Sutton, R.E., Payne, E.M., Haskard, D.O., Hughes, A.D., Cutler, D.F., et al. (2011). Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood* 117, 1071–1080.
- Stephensen, D., and Rodriguez-Merchan, E.C. (2013). Orthopaedic co-morbidities in the elderly haemophilia population: a review. *Haemophilia* 19, 166–173.
- Storck, J., Küsters, B., and Zimmermann, E.R. (1995). The tethered ligand receptor is the responsible receptor for the thrombin induced release of von Willebrand factor from endothelial cells (HUVEC). *Thromb. Res.* 77, 249–258.
- Storck, S.E., Meister, S., Nahrath, J., Meißner, J.N., Schubert, N., Di Spiezio, A., Baches, S., Vandenbroucke, R.E., Bouter, Y., Prikulis, I., et al. (2016). Endothelial LRP1 transports amyloid- β (1-42) across the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 126, 123–136.
- Stratikos, E., and Gettins, P.G. (1999). Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into beta-sheet A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 4808–4813.
- Sun, H., Zhang, H., Li, K., Wu, H., Zhan, X., Fang, F., Qin, Y., and Wei, Y. (2019). ESM-1 promotes adhesion between monocytes and endothelial cells under intermittent hypoxia. *J Cell Physiol* 234, 1512–1521.
- Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P.J., and Nagata, S. (2010). Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 468, 834–838.

Svitkina, T. (2018). The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10.

Swystun, L.L., Lai, J.D., Notley, C., Georgescu, I., Paine, A.S., Mewburn, J., Nesbitt, K., Schledzewski, K., Géraud, C., Kzhyshkowska, J., et al. (2018). The endothelial cell receptor stabilin-2 regulates VWF-FVIII complex half-life and immunogenicity. *J. Clin. Invest.* 128, 4057–4073.

Swystun, L.L., Notley, C., Georgescu, I., Lai, J.D., Nesbitt, K., James, P.D., and Lillicrap, D. (2019a). The endothelial lectin clearance receptor CLEC4M binds and internalizes factor VIII in a VWF-dependent and independent manner. *J. Thromb. Haemost.* 17, 681–694.

Swystun, L.L., Ogiwara, K., Lai, J.D., Ojala, J.R.M., Rawley, O., Lassalle, F., Notley, C., Rengby, O., Michels, A., Nesbitt, K., et al. (2019b). The scavenger receptor SCARA5 is an endocytic receptor for von Willebrand factor expressed by littoral cells in the human spleen. *J Thromb Haemost* 17, 1384–1396.

Sztukowska, M., Gallinaro, L., Cattini, M.G., Pontara, E., Sartorello, F., Daidone, V., Padriani, R., Pagnan, A., and Casonato, A. (2008). Von Willebrand factor propeptide makes it easy to identify the shorter Von Willebrand factor survival in patients with type 1 and type Vicenza von Willebrand disease. *Br. J. Haematol.* 143, 107–114.

Tabibian, S., Shiravand, Y., Shams, M., Safa, M., Gholami, M.S., Heydari, F., Ahmadi, A., Rashidpanah, J., and Dorgalaleh, A. (2019). A Comprehensive Overview of Coagulation Factor V and Congenital Factor V Deficiency. *Semin. Thromb. Hemost.* 45, 523–543.

Taves, S., Sun, J., Livingston, E.W., Chen, X., Amiaud, J., Brion, R., Hannah, W.B., Bateman, T.A., Heymann, D., and Monahan, P.E. (2019). Hemophilia A and B mice, but not VWF-/-mice, display bone defects in congenital development and remodeling after injury. *Sci Rep* 9, 14428.

Taylor, H.J., Goldscheitter, G., and Taylor, J.A. (2018). The Role of Thrombin Deficiency on Skeletal Health. *Blood* 132, 5012–5012.

Tefferi, A., and Nichols, W.L. (1997). Acquired von Willebrand disease: concise review of occurrence, diagnosis, pathogenesis, and treatment. *Am. J. Med.* 103, 536–540.

Teitel, J., Berntorp, E., Collins, P., D'oirion, R., Ewenstein, B., Gomperts, E., Goudemand, J., Gringeri, A., Key, N., Leissingner, C., et al. (2007). A systematic approach to controlling problem bleeds in patients with severe congenital haemophilia A and high-titre inhibitors. *Haemophilia* 13, 256–263.

Tellides George and Pober Jordan S. (2007). Interferon- γ Axis in Graft Arteriosclerosis. *Circulation Research* 100, 622–632.

Terraube, V., O'Donnell, J.S., and Jenkins, P.V. (2010). Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance. *Haemophilia* 16, 3–13.

Thalji, N., and Camire, R.M. (2013). Parahemophilia: new insights into factor v deficiency. *Semin. Thromb. Hemost.* 39, 607–612.

- Thiagarajan, P., and Benedict, C.R. (1997). Inhibition of arterial thrombosis by recombinant annexin V in a rabbit carotid artery injury model. *Circulation* 96, 2339–2347.
- Thijssen, V.L., Hulsmans, S., and Griffioen, A.W. (2008). The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol* 172, 545–553.
- Thompson, A.R. (2003). Structure and function of the factor VIII gene and protein. *Semin. Thromb. Hemost.* 29, 11–22.
- Tiede, A., Rand, J.H., Budde, U., Ganser, A., and Federici, A.B. (2011). How I treat the acquired von Willebrand syndrome. *Blood* 117, 6777–6785.
- Titani, K., Kumar, S., Takio, K., Ericsson, L.H., Wade, R.D., Ashida, K., Walsh, K.A., Chopek, M.W., Sadler, J.E., and Fujikawa, K. (1986). Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry* 25, 3171–3184.
- Todoroki, N., Watanabe, Y., Akaike, T., Katagiri, Y., Tanoue, K., Yamazaki, H., Tsuji, T., Toyoshima, S., and Osawa, T. (1991). Enhancement by IL-1 beta and IFN-gamma of platelet activation: adhesion to leukocytes via GMP-140/PADGEM protein (CD62). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 756–761.
- Toni, R., Di Conza, G., Barbaro, F., Zini, N., Consolini, E., Dallatana, D., Antoniel, M., Quarantini, E., Quarantini, M., Maioli, S., et al. (2020). Microtopography of Immune Cells in Osteoporosis and Bone Lesions by Endocrine Disruptors. *Front Immunol* 11, 1737.
- Toschi, V., and Baudo, F. (2010). Diagnosis, laboratory aspects and management of acquired hemophilia A. *Intern Emerg Med* 5, 325–333.
- Tsai, H.M. (1996). Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 87, 4235–4244.
- Tsai, H.M., Nagel, R.L., Hatcher, V.B., Seaton, A.C., and Sussman, I.I. (1991). The high molecular weight form of endothelial cell von Willebrand factor is released by the regulated pathway. *Br. J. Haematol.* 79, 239–245.
- Tuddenham, E.G., Lane, R.S., Rotblat, F., Johnson, A.J., Snape, T.J., Middleton, S., and Kernoff, P.B. (1982). Response to infusions of polyelectrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human haemophilia A and von Willebrand's disease. *Br. J. Haematol.* 52, 259–267.
- Tudpor, K., van der Eerden, B.C.J., Jongwattapanisan, P., Roelofs, J.J.T.H., van Leeuwen, J.P.T.M., Bindels, R.J.M., and Hoenderop, J.G.J. (2015). Thrombin receptor deficiency leads to a high bone mass phenotype by decreasing the RANKL/OPG ratio. *Bone* 72, 14–22.
- Turecek, P.L., Mitterer, A., Matthiessen, H.P., Gritsch, H., Varadi, K., Siekmann, J., Schneckner, K., Plaimauer, B., Kaliwoda, M., Purtscher, M., et al. (2009). Development of a plasma- and albumin-free recombinant von Willebrand factor. *Hamostaseologie* 29 Suppl 1, S32-38.

Ulivieri, F.M., Rebagliati, G.A.A., Piodi, L.P., Solimeno, L.P., Pasta, G., Boccalandro, E., Fasulo, M.R., Mancuso, M.E., and Santagostino, E. (2018). Usefulness of bone microarchitectural and geometric DXA-derived parameters in haemophilic patients. *Haemophilia* 24, 980–987.

United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation (2003). Guidelines on the selection and use of therapeutic products to treat haemophilia and other hereditary bleeding disorders. *Haemophilia* 9, 1–23.

Valentijn, K.M., van Driel, L.F., Mourik, M.J., Hendriks, G.-J., Arends, T.J., Koster, A.J., and Valentijn, J.A. (2010). Multigranular exocytosis of Weibel-Palade bodies in vascular endothelial cells. *Blood* 116, 1807–1816.

Valentino, L.A. (2010). Assessing the benefits of FEIBA prophylaxis in haemophilia patients with inhibitors. *Haemophilia* 16, 263–271.

Valentino, L.A., and Khair, K. (2020). Prophylaxis for hemophilia A without inhibitors: treatment options and considerations. *Expert Rev Hematol* 13, 731–743.

Valleix, S., Jc, J., S, E., Rl, J., P, F., D, B., and M, D. (1999). Expression of Human F8B, a Gene Nested Within the Coagulation Factor VIII Gene, Produces Multiple Eye Defects and Developmental Alterations in Chimeric and Transgenic Mice.

Vandenhoute, E., Drolez, A., Sevin, E., Gosselet, F., Mysiorek, C., and Dehouck, M.-P. (2016). Adapting coculture in vitro models of the blood–brain barrier for use in cancer research: maintaining an appropriate endothelial monolayer for the assessment of transendothelial migration. *Laboratory Investigation* 96, 588–598.

Varga-Szabo, D., Braun, A., and Nieswandt, B. (2009). Calcium signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 7, 1057–1066.

Vasse, M. (2011). The protein Z/protein Z-dependent protease inhibitor complex. *Hamostaseologie* 31, 155–164.

Veltkamp, J.J., Asfaou, E., van de Torren, K., van der Does, J.A., van Tilburg, N.H., and Pauwels, E.K. (1974). Extrahepatic factor VIII synthesis. Lung transplants in hemophilic dogs. *Transplantation* 18, 56–62.

Venkateswarlu, D. (2010). Structural investigation of zymogenic and activated forms of human blood coagulation factor VIII: a computational molecular dynamics study. *BMC Struct Biol* 10, 7.

Veronese, F.M., and Pasut, G. (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today* 10, 1451–1458.

Verweij, C.L., de Vries, C.J.M., Distel, B., van Zonneveld, A.-J., van Kessel, A.G., van Mourik, J.A., and Pannekoek, H. (1985). Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibody probes for colony-screening and mapping of the chromosomal gene. *Nucleic Acids Res* 13, 4699–4717.

- Verweij, C.L., Diergaarde, P.J., Hart, M., and Pannekoek, H. (1986). Full-length von Willebrand factor (vWF) cDNA encodes a highly repetitive protein considerably larger than the mature vWF subunit. *EMBO J.* *5*, 1839–1847.
- Wagner, D.D. (1990). Cell biology of von Willebrand factor. *Annu. Rev. Cell Biol.* *6*, 217–246.
- Wagner, D.D., Olmsted, J.B., and Marder, V.J. (1982). Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* *95*, 355–360.
- Wagner, D.D., Lawrence, S.O., Ohlsson-Wilhelm, B.M., Fay, P.J., and Marder, V.J. (1987). Topology and order of formation of interchain disulfide bonds in von Willebrand factor. *Blood* *69*, 27–32.
- Wakabayashi, H., Koszelak, M.E., Matri, M., and Fay, P.J. (2001). Metal ion-independent association of factor VIII subunits and the roles of calcium and copper ions for cofactor activity and inter-subunit affinity. *Biochemistry* *40*, 10293–10300.
- Walsh, C.E., Jiménez-Yuste, V., Auerswald, G., and Grancha, S. (2016). The burden of inhibitors in haemophilia patients. *Thromb Haemost* *116 Suppl 1*, S10-17.
- Wang, I.-M., Lin, H., Goldman, S.J., and Kobayashi, M. (2004). STAT-1 is activated by IL-4 and IL-13 in multiple cell types. *Mol Immunol* *41*, 873–884.
- Wang, Q., Dong, B., Firman, J., Roberts, S., Moore, A.R., Cao, W., Diao, Y., Kapranov, P., Xu, R., and Xiao, W. (2014). Efficient production of dual recombinant adeno-associated viral vectors for factor VIII delivery. *Hum Gene Ther Methods* *25*, 261–268.
- Wang, W., Wang, Y.J., and Kelner, D.N. (2003). Coagulation factor VIII: structure and stability. *Int J Pharm* *259*, 1–15.
- Warren, D.L., Morrissey, J.H., and Neuenschwander, P.F. (1999). Proteolysis of blood coagulation factor VIII by the factor VIIa-tissue factor complex: generation of an inactive factor VIII cofactor. *Biochemistry* *38*, 6529–6536.
- Waters, E.K., Sigh, J., Friedrich, U., Hilden, I., and Sørensen, B.B. (2017). Concizumab, an anti-tissue factor pathway inhibitor antibody, induces increased thrombin generation in plasma from haemophilia patients and healthy subjects measured by the thrombin generation assay. *Haemophilia* *23*, 769–776.
- Waugh, D.J.J., and Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* *14*, 6735–6741.
- Webster, W.P., Zukoski, C.F., Hutchin, P., Reddick, R.L., Mandel, S.R., and Penick, G.D. (1971). Plasma factor VIII synthesis and control as revealed by canine organ transplantation. *Am. J. Physiol.* *220*, 1147–1154.
- de Wee, E.M., Sanders, Y.V., Mauser-Bunschoten, E.P., van der Bom, J.G., Degenaar-Dujardin, M.E.L., Eikenboom, J., de Goede-Bolder, A., Laros-van Gorkom, B.A.P., Meijer, K., Hamulyák, K., et al. (2012). Determinants of bleeding phenotype in adult patients with moderate or severe von Willebrand disease. *Thromb. Haemost.* *108*, 683–692.

Weis, S.M., and Cheresh, D.A. (2011). αV integrins in angiogenesis and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, a006478.

Weiss, H.J., Rogers, J., and Brand, H. (1973). Properties of the platelet retention (von Willebrand) factor and its similarity to the antihemophilic factor (AHF). *Blood* 41, 809–815.

Weitzmann, M.N., Roser-Page, S., Vikulina, T., Weiss, D., Hao, L., Baldwin, W.H., Yu, K., Del Mazo Arbona, N., McGee-Lawrence, M.E., Meeks, S.L., et al. (2019). Reduced bone formation in males and increased bone resorption in females drive bone loss in hemophilia A mice. *Blood Adv* 3, 288–300.

Wilkinson, R.D.A., Williams, R., Scott, C.J., and Burden, R.E. (2015). Cathepsin S: therapeutic, diagnostic, and prognostic potential. *Biol Chem* 396, 867–882.

Winter, W.E., Flax, S.D., and Harris, N.S. (2017). Coagulation Testing in the Core Laboratory. *Lab Med* 48, 295–313.

Wion, K.L., Kelly, D., Summerfield, J.A., Tuddenham, E.G., and Lawn, R.M. (1985). Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature* 317, 726–729.

Wohner, N., Muczynski, V., Mohamadi, A., Legendre, P., Proulle, V., Aymé, G., Christophe, O.D., Lenting, P.J., Denis, C.V., and Casari, C. (2018). Macrophage scavenger receptor SR-A1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Haematologica* 103, 728–737.

Wood, W.I., Capon, D.J., Simonsen, C.C., Eaton, D.L., Gitschier, J., Keyt, B., Seeburg, P.H., Smith, D.H., Hollingshead, P., Wion, K.L., et al. (1984). Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 312, 330–337.

World Federation of Haemophilia World Federation of Haemophilia. 54.

Wright, A.E. (1893). On a Method of Determining the Condition of Blood Coagulability for Clinical and Experimental Purposes, and on the Effect of the Administration of Calcium Salts in Haemophilia and Actual or Threatened Haemorrhage: [Preliminary Communication]. *Br Med J* 2, 223–225.

Wu, Q.Y., Drouet, L., Carrier, J.L., Rothschild, C., Berard, M., Rouault, C., Caen, J.P., and Meyer, D. (1987). Differential distribution of von Willebrand factor in endothelial cells. Comparison between normal pigs and pigs with von Willebrand disease. *Arteriosclerosis* 7, 47–54.

www.legifrance.gouv.fr/ Extension AMM HEMLIBRA.

Xu, H., Cao, Y., Yang, X., Cai, P., Kang, L., Zhu, X., Luo, H., Lu, L., Wei, L., Bai, X., et al. (2017). ADAMTS13 controls vascular remodeling by modifying VWF reactivity during stroke recovery. *Blood* 130, 11–22.

Yamamoto, K., de Waard, V., Fearn, C., and Loskutoff, D.J. (1998). Tissue distribution and regulation of murine von Willebrand factor gene expression in vivo. *Blood* 92, 2791–2801.

- Yamamoto, T., Saeki, Y., Kurasawa, M., Kuroda, S., Arase, S., and Sasaki, H. (2008). Effect of RNA interference of tight junction-related molecules on intercellular barrier function in cultured human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 300, 517–524.
- Yang, C., Zhang, Z.H., Li, Z.J., Yang, R.C., Qian, G.Q., and Han, Z.C. (2004). Enhancement of neovascularization with cord blood CD133+ cell-derived endothelial progenitor cell transplantation. *Thromb Haemost* 91, 1202–1212.
- Yarovoi, H.V., Kufirin, D., Eslin, D.E., Thornton, M.A., Haberichter, S.L., Shi, Q., Zhu, H., Camire, R., Fakharzadeh, S.S., Kowalska, M.A., et al. (2003). Factor VIII ectopically expressed in platelets: efficacy in hemophilia A treatment. *Blood* 102, 4006–4013.
- Yasar Yildiz, S., Kuru, P., Toksoy Oner, E., and Agirbasli, M. (2014). Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1. *ScientificWorldJournal* 2014, 858293.
- Yau, J.W., Teoh, H., and Verma, S. (2015). Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovasc Disord* 15, 130.
- You, K., Su, F., Liu, L., Lv, X., Zhang, J., Zhang, Y., and Liu, B. (2017). SCARA5 plays a critical role in the progression and metastasis of breast cancer by inactivating the ERK1/2, STAT3, and AKT signaling pathways. *Mol Cell Biochem* 435, 47–58.
- Young, G., Auerswald, G., Jimenez-Yuste, V., Konkle, B.A., Lambert, T., Morfini, M., Santagostino, E., and Blanchette, V. (2011). When should prophylaxis therapy in inhibitor patients be considered? *Haemophilia* 17, e849-857.
- Young, G., Auerswald, G., Jimenez-Yuste, V., Lambert, T., Morfini, M., Santagostino, E., and Blanchette, V. (2012). PRO-PACT: retrospective observational study on the prophylactic use of recombinant factor VIIIa in hemophilia patients with inhibitors. *Thromb Res* 130, 864–870.
- Young, G., Sidonio, R.F., Liesner, R., Oldenburg, J., Chang, T., Uguen, M., Dhalluin, C., Schmitt, C., Levy, G.G., Shima, M., et al. (2017). HAVEN 2 Updated Analysis: Multicenter, Open-Label, Phase 3 Study to Evaluate Efficacy, Safety and Pharmacokinetics of Subcutaneous Administration of Emicizumab Prophylaxis in Pediatric Patients with Hemophilia A with Inhibitors. *Blood* 130, 85–85.
- Young, G., Liesner, R., Chang, T., Sidonio, R., Oldenburg, J., Jiménez-Yuste, V., Mahlangu, J., Kruse-Jarres, R., Wang, M., Uguen, M., et al. (2019). A multicenter, open-label phase 3 study of emicizumab prophylaxis in children with hemophilia A with inhibitors. *Blood* 134, 2127–2138.
- Young, P.A., Migliorini, M., and Strickland, D.K. (2016). Evidence That Factor VIII Forms a Bivalent Complex with the Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor-related Protein 1 (LRP1): IDENTIFICATION OF CLUSTER IV ON LRP1 AS THE MAJOR BINDING SITE. *J. Biol. Chem.* 291, 26035–26044.
- Zelechowska, M.G., van Mourik, J.A., and Brodniewicz-Proba, T. (1985). Ultrastructural localization of factor VIII procoagulant antigen in human liver hepatocytes. *Nature* 317, 729–730.

- Zetterberg, E., Palmblad, J., Wallensten, R., Morfini, M., Melchiorre, D., and Holmström, M. (2014). Angiogenesis is increased in advanced haemophilic joint disease and characterised by normal pericyte coverage. *Eur J Haematol* 92, 256–262.
- Zhang, B., Kaufman, R.J., and Ginsburg, D. (2005). LMAN1 and MCFD2 form a cargo receptor complex and interact with coagulation factor VIII in the early secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 25881–25886.
- Zhang, B., McGee, B., Yamaoka, J.S., Guglielmone, H., Downes, K.A., Minoldo, S., Jarchum, G., Peyvandi, F., de Bosch, N.B., Ruiz-Saez, A., et al. (2006). Combined deficiency of factor V and factor VIII is due to mutations in either LMAN1 or MCFD2. *Blood* 107, 1903–1907.
- Zhang, Z.P., Lindstedt, M., Falk, G., Blombäck, M., Egberg, N., and Anvret, M. (1992). Nonsense mutations of the von Willebrand factor gene in patients with von Willebrand disease type III and type I. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 850–858.
- Zhou, Y.-F., and Springer, T.A. (2014). Highly reinforced structure of a C-terminal dimerization domain in von Willebrand factor. *Blood* 123, 1785–1793.
- Zhou, S., Shen, Y., Zheng, M., Wang, L., Che, R., Hu, W., and Li, P. (2017). DNA methylation of METTL7A gene body regulates its transcriptional level in thyroid cancer. *Oncotarget* 8, 34652–34660.
- Zhou, Y.-F., Eng, E.T., Nishida, N., Lu, C., Walz, T., and Springer, T.A. (2011). A pH-regulated dimeric bouquet in the structure of von Willebrand factor. *EMBO J.* 30, 4098–4111.
- Zhou, Y.-F., Eng, E.T., Zhu, J., Lu, C., Walz, T., and Springer, T.A. (2012). Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood* 120, 449–458.
- Zimmerman, B., and Valentino, L.A. (2013). Hemophilia: in review. *Pediatr Rev* 34, 289–294; quiz 295.
- Zimmerman, T.S., Dent, J.A., Ruggeri, Z.M., and Nannini, L.H. (1986). Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (types IIC, IID, and IIE). *J. Clin. Invest.* 77, 947–951.
- Zimmermann, M.A., Oldenburg, J., Müller, C.R., and Rost, S. (2014). Expression studies of mutant factor VIII alleles with premature termination codons with regard to inhibitor formation. *Haemophilia* 20, e215-221.
- Zuo, P., Zuo, Z., Wang, X., Chen, L., Zheng, Y., Ma, G., and Zhou, Q. (2015). Factor Xa induces pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages via protease-activated receptor-2 activation. *Am J Transl Res* 7, 2326–2334.

Titre : Rôles extra-coagulants du FVIII sur les cellules endothéliales et les monocytes dans un contexte d'hémophilie A

Mots clés : Facteur VIII, Hémophilie A, cellule endothéliale, monocyte

Résumé : L'hémophilie A est un trouble de la coagulation héréditaire, causé par une altération fonctionnelle et/ou quantitative de l'expression du facteur de coagulation VIII. Le traitement de l'hémophilie A consiste en l'injection de FVIII de substitution. Toutefois, les patients développent fréquemment des anticorps inhibiteurs, rendant le traitement inefficace. Pour pallier ce problème, un anticorps bispécifique monoclonal, exprimant une activité cofacteur équivalente au FVIII a été développé. Ce traitement remédie au problème lié à l'inhibiteur et au trouble de la coagulation. En pratiques cliniques, la question de l'utilisation systématique de ce traitement chez l'ensemble des cas sévères se pose. Or, outre le trouble de la coagulation, il est observé chez les hémophiles A une perte osseuse, une

altération de l'inflammation et du système vasculaire. Des observations à partir d'études cliniques sur l'hémophilie A, ainsi que des études *in vitro* et *in vivo* révèlent un rôle potentiel extra-hémostatique du FVIII. Cette thèse étudie l'effet du FVIII recombinant sur des cellules endothéliales et des monocytes pour mieux appréhender son rôle extra-coagulant et affiner les approches thérapeutiques dans l'hémophilie A. Une étude transcriptomique et protéomique, suivie d'une analyse fonctionnelle a été réalisée sur les cellules endothéliales. Puis, le lien entre le système immunitaire et le système vasculaire a été analysé, par l'étude de l'effet du FVIII sur le recrutement, la perméabilité endothéliale et la transmigration monocyttaire.

Title : Extra-coagulant roles of FVIII on endothelial cells and monocytes, in hemophilia A

Keywords : Factor VIII, Hemophilia A, endothelial cell, monocyte

Abstract: Hemophilia A is an inherited bleeding disorder caused by deficient activity/quantity of blood coagulation factor VIII (FVIII). Hemophilia A treatment consists of substitution FVIII injections. However, patients show circulating FVIII inhibitor, making treatment ineffective. To bypass this problem, a bispecific monoclonal antibody, mimicking FVIII coagulant activity, has been recently developed. This treatment partially fixes the problem related to FVIII inhibitor, and coagulation troubles. Hemophilia patients and studies using animal models have revealed that if the bleeding disorder is caused by deficient activity of FVIII, direct biological activities of FVIII are suspected

outside the scope of hemostasis as angiogenesis, or bone remodeling. Indeed, hemophilia A patients show osteopenia, altered inflammation and vascular fragility. This thesis study FVIII effects on endothelial cells and monocytes to better understand its extra-hemostatic functions, and to better define the therapeutic options in hemophilia A. Transcriptomic and proteomic studies, combined to functional analysis on endothelial cells were carried out. The functional link between immune and endothelial cells was analyzed, by studying the FVIII effects on endothelial permeability and on monocyte rolling and transmigration.