

LES ANTICOAGULANTS DU FUTUR

L'héparine et les antagonistes de la vitamine K, comme la warfarine, ont été les principales armes dans l'arsenal thérapeutique anti-thrombotique. En dépit du progrès apporté par ces anticoagulants traditionnels depuis quelques décennies, leurs limitations ont encouragé le développement de nombreuses molécules nouvelles plus efficaces et dépourvues d'effets secondaires afin d'améliorer la prophylaxie antithrombotique en chirurgie et de faire disparaître les embolies pulmonaires fatales. Ainsi, diverses protéines anticoagulantes isolées à partir de nombreux genres d'organismes sont des candidats potentiels. Certaines d'entre elles sont disponibles pour la recherche hémato-logique et peuvent être utilisées aussi en situation clinique. Toutefois, ces anticoagulants diffèrent non seulement par leurs structures, mais aussi par leurs sites d'action. La diversité des modes d'action des différents anticoagulants sur la cascade de coagulation est assez bien connue. L'activation du facteur X est un point commun entre la voie intrinsèque et extrinsèque de la coagulation du sang. Le facteur X activé (FXa) est la seule enzyme qui catalyse la transformation de la prothrombine en thrombine, l'enzyme clé dans la cascade de la coagulation ; les inhibiteurs de cette étape sont donc d'un intérêt pharmacologique considérable. Toute une panoplie de produits efficaces existe désormais pour combattre l'un des fléaux principaux surtout chez les personnes âgées que sont les maladies cardio-vasculaires.

Les arthropodes hématophages comme les tiques, les punaises et les moustiques, ainsi que les sangsues et les chauves-souris vampires, contiennent une variété de composés bioactifs dans leur salive qui leur permettent de se nourrir du sang en contournant les voies normales hémostatiques de l'hôte. La salive de ces parasites contient, entre autres inhibiteurs, l'antithromboxane, l'antisé-rotinine et plusieurs composants de prostaglandine qui empêchent l'agrégation plaquettaire et la contraction des vaisseaux sanguins. La coagulation du sang se fait par les voies intrinsèque et extrinsèque qui, par le biais de mécanismes indépendants, conduisent à la conversion du facteur X en facteur Xa (FXa). FXa convertit la prothrombine en thrombine, l'enzyme qui produit la fibrine à partir du fibrinogène. Les plaquettes peuvent subir l'agrégation par au moins trois voies, induites par des agonistes de l'agrégation, la thrombine, l'ADP ou le collagène. Chacun de ces médiateurs peut potentialiser l'action des deux autres, mais chacun peut induire indépendamment une agrégation plaquettaire complète.

Récemment, des inhibiteurs du facteur de coagulation sanguine FXa ont été caractérisés chez la tique *Ornithodoros moubata*, chez la mouche noire *Simulium vittatum* et chez la sangsue *Hirudo medicinalis*.

Les poux sont de petits insectes et leurs glandes salivaires ne peuvent stocker que des quantités limitées de protéines. Leur trompe est très étroite et ils doivent se nourrir plusieurs fois par jour. Par conséquent, leurs glandes salivaires sont dotées d'un inhibiteur de la thrombine puissant, l'inhibi-teur du facteur Xa et d'une activité apyrase (ATP-diphosphatase) qui inhibe l'agrégation plaquet-taire chez l'hôte par hydrolyse de l'ADP ce qui permet à ces insectes de surmonter les mécanismes hémostatiques de l'hôte et empêche le blocage des vaisseaux par le sang coagulé. L'activité apy-rase, réduit les niveaux de l'ADP et empêche ainsi l'agrégation des plaquettes sur le site de l'ali-mentation. L'activité anti-thrombine des poux est due à une protéine de masse moléculaire d'en-viron 7 kDa.

L'utilisation des sangsues dans le traitement de maladies humaines est connue depuis l'Antiquité. Aujourd'hui, la thérapie moderne par les sangsues repose sur des principes scientifiques. En effet, plusieurs molécules anticoagulantes, inhibant spécifiquement le FXa, ont été identifiées dans les glandes salivaires des sangsues. L'hirudine, un inhibiteur de la thrombine spécifique de la sangsue *Hirudo medicinalis*, est connue depuis de nombreuses années, et une forme recombinante de ce

peptide a été produite lors des études cliniques dans les indications de la thrombose artérielle et veineuse. Un autre inhibiteur naturel, l'antistatine, une protéine de 119 résidus d'acides aminés, a été isolée de la sangsue mexicaine *Haementeria officinalis*. La vizottine, inhibiteur salivaire de FXa, issu de la sangsue *Haementeria vizottoi*, semble exercer son action à travers une liaison directe au site actif de FXa de façon dépendante du temps.

Parmi les autres molécules anticoagulantes issues des sangsues, on citera la ghilantene (*Haementeria ghilianii*), la lefaxine (*Haementeria depressa*) et la therostasine (*Theromyzon tessulatum*).

Une protéine extraite des chauves-souris vampires suscite l'espoir de sauver des milliers de personnes des effets des crises cardiaques. Des chercheurs de Rhone-Poulenc ont en effet découvert dans la salive des chauves-souris vampires une protéine qui empêche le sang de coaguler pendant que le sinistre animal mord ses victimes. D'où l'idée d'utiliser cette substance pour dissoudre les caillots sanguins à l'origine des infarctus. Les effets sont spectaculaires : cet anticoagulant débouche les artères deux fois plus vite que le TPA (*Tissue Plasminogen Activator*), considéré jusqu'à présent comme le plus efficace des nouveaux produits anti-infarctus. Rhône Poulenc est détenteur d'un brevet pour un médicament produit à partir de cette protéine de chauves-souris vampires et baptisé fort justement draculine.

La draculine est une glycoprotéine contenue dans la salive des chauves-souris vampires *Desmodus rotundus* et possédant un pouvoir anticoagulant pour le sang humain. Sa masse moléculaire telle que déterminée par SDS-PAGE sans réduction est d'environ 83 kDa. Le polypeptide réduit présente une migration plus lente. Son profil d'éluion par exclusion stérique en donne un pic unique, symétrique correspondant à 88,5 kDa. La focalisation isoélectrique révèle une protéine acide avec un pI de 4,1 à 4,2. L'analyse des acides aminés est compatible avec un polypeptide à chaîne unique de 411 résidus et d'environ 80 kDa.

La draculine inhibe les formes activées de facteurs de coagulation IX et X du sang des animaux à sang chaud, mais n'agit pas sur la thrombine, la trypsine, la chymotrypsine et n'exprime pas d'activité fibrinolytique. L'inhibition est immédiate et pas facilement réversible, avec une stoechiométrie de deux molécules de draculine par molécule de facteur IXa ou Xa. L'activité inhibitrice contre chaque facteur n'est pas affectée par la présence de l'autre. La draculine se lie quantitativement aux facteurs Xa ou IXa immobilisés. L'étude du mécanisme cinétique de l'action de la draculine sur le Factor X activé (FXa) montre que l'inhibition est de type non compétitif contrairement à d'autres inhibiteurs naturels. Le fait que la draculine établit un équilibre relativement rapide avec FXa, dans une gamme de concentrations similaires d'enzyme et d'inhibiteur, et qu'aucune phase de latence n'est observée à aucune des concentrations de draculine testées, permet de ranger la draculine dans la catégorie des inhibiteurs dont l'attachement est fort. L'absence de clivage de la draculine par FXa, même après de longues périodes de temps (jusqu'à 90 h) est en accord avec le mode non compétitif d'inhibition, un fait qui pourrait être potentiellement avantageux pour l'alimentation de la chauve-souris vampire. Lorsque la chauve-souris a entaillé de ses incisives la peau d'un animal, son sang s'écoule sans coaguler, ce qui lui permet de le laper.

L'activité anticoagulante de la draculine dépend fortement d'une glycosylation particulière de la chaîne polypeptidique. Cet anticoagulant est cent fois plus puissant que les autres anticoagulants connus, et sera prescrit pour les patients atteints d'attaques cardiaques.

Pour fabriquer la draculine, les chercheurs n'auront pas à collecter la précieuse protéine à partir d'élevages de chauves-souris vampires car le gène a été introduit dans des cellules en culture. On peut ainsi fabriquer actuellement par la technologie de l'ADN recombinant les quantités d'anticoagulants nécessaires aux essais à grande échelle, ce qui permettra ensuite de passer à la production du médicament. Le brevet de la draculine a été déposé dans 80 pays.

Un autre composant retrouvé dans la salive des chauves-souris, le LPSD (activateur du plasminogène salivaire de *Desmodus rotundus*) fait l'objet d'intenses recherches.

L'ankylostome hématophage *Ancylostoma caninum*, un nématode qui parasite le chien, produit une famille de petites protéines anticoagulantes, de 75 à 84 résidus d'acides aminés, appelées NAP (*Nematode Anticoagulant Protein*), qui ont fait l'objet d'un important développement de médicaments antithrombotiques. Une de ces protéines anticoagulantes, la NAP5, est le plus puissant inhibiteur naturel de FXa identifié à ce jour. Une autre protéine, la NAPc2, est active par voie parentérale avec une demi-vie de 50 h, a fait la preuve de son activité antithrombotique chez l'Homme dans une étude consacrée à la prophylaxie des accidents thromboemboliques (TE) après prothèse totale du genou.

Par ailleurs, un peptide anticoagulant a été isolé de l'étoile de mer *Acanthaster planci*. La masse moléculaire de cette substance, appelée plancinine, a été estimée à 7,5 kDa.

Enfin des chercheurs de la société Genentech ont analysé la structure d'une protéine extraite du venin mortel d'une vipère de Malaisie. Cette substance, appelée kistrine, inhibe la coagulation du sang en se liant à certains facteurs de coagulation.

Les nouveaux anticoagulants sont nombreux et d'origine diverse mais souvent animale. De nombreuses molécules ont été développées en recherchant un anticoagulant ne présentant pas les inconvénients de l'héparine : administration orale et non parentérale, pas de surveillance, un dosage unique et des interactions médicamenteuses réduites. Dans un avenir proche, une nouvelle classe de médicaments, les antithrombines directes administrées par voie orale, pourrait révolutionner le traitement anticoagulant.