

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Evaluation biologique de coumarines en tant qu'inhibiteurs de protéases à sérine de la cascade de la coagulation

Robert, Severine Henry

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**Evaluation biologique de coumarines en tant qu'inhibiteurs de protéases à
sérine de la cascade de la coagulation**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences Biologiques**

Séverine ROBERT

Juin 2004

Evaluation biologique de coumarines en tant qu'inhibiteurs de protéases à sérine de la cascade de la coagulation

ROBERT Séverine

Résumé

Les maladies cardiovasculaires représentent une des causes principales de mortalité à travers le monde. Celles-ci partagent le même processus physiopathologique d'agrégation plaquettaire et d'activation de la cascade de la coagulation au niveau d'un site de lésion vasculaire. Les thérapies antiplaquettaires et anticoagulantes sont donc largement utilisées dans la prévention et le traitement des accidents cardiovasculaires.

Dans le cadre de ce mémoire, une évaluation biologique *in vitro* de coumarines 3,6-disubstituées en tant qu'inhibiteurs de protéases à sérine de la cascade de la coagulation, et plus particulièrement de la thrombine et du FXa, a été réalisée. Celle-ci s'est focalisée sur deux axes : l'étude du pouvoir inhibiteur des coumarines d'une part et l'étude de leur mécanisme d'inhibition d'autre part.

Des tests de criblage sur enzymes isolées nous ont tout d'abord permis de sélectionner les composés possédant le meilleur potentiel inhibiteur de thrombine et de FXa. La détermination des constantes cinétiques k_i et K_I de ces composés a montré que la molécule possédant un ester 2,5-dichloro-phényle en position 3 et une fonction chlorométhyle en position 6 était le composé le plus actif sur thrombine avec un k_i/K_I d'environ $37000 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Il est suivi des dérivés *m*-bromo-phényle et *m*-chloro-phényle présentant des pouvoirs inhibiteurs proches (10540 et $7720 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ respectivement). Ces composés possèdent également un faible pouvoir inhibiteur de FXa (220 , 430 et $620 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ respectivement).

Notre mécanisme d'inhibition hypothétique selon lequel l'inactivation résulterait de la formation d'un alkyle-enzyme a ensuite été vérifié et ce, à la fois pour la thrombine et le FXa. Pour atteindre ce but, la caractérisation des complexes enzyme-inhibiteur a été réalisée grâce à des expériences de réactivation enzymatique et à la mesure par spectrométrie de masse du poids de l'adduit présent sur l'enzyme inactivée. La détermination du site de fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme a également été investiguée grâce à des digestions enzymatiques et à l'analyse des peptides obtenus par spectrométrie de masse.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2004

Promoteur: Professeur B. Masereel

Avant de commencer ce mémoire, je voudrais remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réussite de ce travail et de ces quatre années d'étude.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Bernard Masereel de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir permis de mener à bien ce mémoire. Merci aussi pour ce défi des JFB 2004, pour votre confiance et pour le temps passé à corriger ce manuscrit.

Ensuite, je souhaite remercier chaleureusement le Docteur Lionel Pochet pour avoir éclairé ce mémoire de son savoir et de ses conseils avisés. Malgré ses nombreuses occupations, il a toujours trouvé le temps de m'écouter, de m'aider et de me conseiller tout en me laissant acquérir de l'autonomie.

Je désire également exprimer ma sincère reconnaissance à Raphaël Frédérick. Mes premiers pas dans le laboratoire, c'est à lui que je les dois. Il a rapidement réussi à me mettre à l'aise et à m'intégrer au sein de l'équipe.

Ensuite, je voudrais remercier Marc Dieu de l'Unité de Recherche en Biologie Cellulaire pour tout le temps qu'il a consacré aux digestions enzymatiques et aux analyses en spectrométrie de masse. Merci d'avoir intégré avec tant de motivation notre projet.

Je remercie également tous les membres du département, Carine, Anne-Marie, Piera, Stéphanie, Marie-Pierre mais aussi Caroline, l'autre mémorante, qui ont fait de ces cinq mois une réelle aventure humaine. J'ai aimé partager le laboratoire (et les multiples bureaux !) avec vous. Les pauses café, les repas de midi (entre frites, sandwiches et cornets de pâtes), les anniversaires, le repas de Noël et la chandeleur sont autant de moments agréables qui ont égaillé toutes ces longues journées d'expériences et de rédaction.

Je tiens également à remercier tout particulièrement mes parents pour le soutien qu'ils m'ont apporté durant ces études. Je n'ai pas été facile à vivre (surtout en période d'examens) mais vous m'avez inlassablement épaulée, conseillée et entourée de votre amour. Merci aussi à mon frère Sébastien et à tous les membres de ma famille pour leur gentillesse et pour avoir toujours cru en moi.

Enfin, je ne peux terminer ces remerciements sans exprimer mon profond amour et ma gratitude à Julien. Tout au long de ces quatre années, tu as toujours été là à mes côtés pour me soutenir, m'encourager et me réconforter dans les périodes les plus difficiles. Bien des fois j'ai eu envie de baisser les bras mais tu as toujours su me donner la force et le courage de continuer et d'aller jusqu'au bout de mes rêves... Tout simplement, merci.

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	1
I.1. Les maladies cardiovasculaires	1
I.1.1. Epidémiologie	1
I.1.2. Physiopathologie	1
I.1.2.1. Introduction : l'hémostase et la balance hémostatique.....	1
I.1.2.2. L'athérombose	2
I.1.2.2.1. Développement et évolution des plaques athérosclérotiques	2
I.1.2.2.2. Implication des plaquettes dans la formation du thrombus	2
I.1.2.2.3. Implication de la cascade de la coagulation dans la formation du thrombus	3
I.2. La cascade de la coagulation	3
I.2.1. Vue classique de la cascade de la coagulation	3
I.2.1.1. Initiation	4
I.2.1.2. Propagation.....	5
I.2.1.3. Terminaison.....	5
I.2.1.4. Elimination	6
I.2.1.5. Réparation	7
I.2.2. Le modèle cellulaire de la cascade de la coagulation.....	7
I.2.2.1. Initiation	7
I.2.2.2. Amplification	8
I.2.2.3. Propagation.....	8
I.3. Les traitements antithrombotiques.....	8
I.3.1. Thérapies conventionnelles	9
I.3.1.1. Les antiagrégants plaquettaires	9
I.3.1.2. Les agents fibrinolytiques	9
I.3.1.3. Les anticoagulants	9
I.3.1.3.1. Les héparines.....	9
I.3.1.3.2. Les antagonistes de la vitamine K.....	10
I.3.2. Nouvelles approches antithrombotiques	11
I.4. Les protéases à sérine.....	12
I.4.1. Introduction	12
I.4.2. Classification des protéases.....	12
I.4.3. Structure des protéases à sérine.....	13
I.4.3.1. Le domaine catalytique	13
I.4.3.2. Le domaine de reconnaissance du substrat	13
I.4.3.2.1. Le site S_1	13
I.4.3.2.2. Le site de liaison du polypeptide	14
I.4.3.2.3. Les sites S_2-S_n et $S'_1-S'_n$	14
I.4.3.3. Le domaine d'activation du zymogène	14
I.4.4. Mécanisme d'action des protéases à sérine.....	15
I.4.5. Enzymes clés de la cascade de la coagulation.....	15
I.4.5.1. La thrombine	15
I.4.5.1.1. Structure et mécanisme d'action	15
I.4.5.1.2. Rôles physiopathologiques	16
I.4.5.1.3. Principaux inhibiteurs	16

I.4.5.2.	Le facteur Xa	17
I.4.5.2.1.	<i>Structure et mécanisme d'action</i>	17
I.4.5.2.2.	<i>Rôles physiopathologiques</i>	18
I.4.5.2.3.	<i>Principaux inhibiteurs</i>	18
I.4.5.3.	Le complexe facteur VIIa/facteur tissulaire	18
I.4.5.3.1.	<i>Structure et mécanisme d'action</i>	18
I.4.5.3.2.	<i>Rôles physiopathologiques</i>	19
I.4.5.3.3.	<i>Principaux inhibiteurs</i>	19
I.5.	Objectifs et présentation du travail	19
II.	MATERIEL ET METHODES	22
II.1.	Etudes enzymatiques	22
II.1.1.	Matériel	22
II.1.2.	Méthodes	22
II.1.2.1.	Principe général des études enzymatiques	22
II.1.2.2.	Test de criblage	22
II.1.2.3.	Détermination des paramètres cinétiques d'inactivation k_i et K_I	23
II.1.2.3.1.	<i>Interaction enzyme-inhibiteur</i>	23
II.1.2.3.2.	<i>Méthode des prélèvements ou méthode discontinue</i>	24
II.1.2.3.3.	<i>Méthode de compétition ou méthode continue</i>	25
II.1.2.4.	Détermination de la constante de Michaelis-Menten des substrats chromogènes	29
II.1.2.5.	Réactivation enzymatique	29
II.2.	Etude par spectrométrie de masse	30
II.2.1.	Préparation des complexes enzyme-inhibiteur	30
II.2.1.1.	Matériel	30
II.2.1.2.	Méthode	30
II.2.2.	Mesure du poids de l'adduit	30
II.2.2.1.	Matériel	30
II.2.2.2.	Méthode	30
II.2.3.	Digestions enzymatiques	31
II.2.3.1.	Matériel	31
II.2.3.2.	Méthodes	31
II.2.4.	Analyse des peptides obtenus par digestion enzymatique	31
II.2.4.1.	Matériel	31
II.2.4.2.	Méthodes	31
III.	RESULTATS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES	32
III.1.	Etude du pouvoir inhibiteur des coumarines	32
III.1.1.	Etude du pouvoir inhibiteur des coumarines vis-à-vis de la thrombine	32
III.1.1.1.	Données préliminaires : test de criblage	32
III.1.1.1.1.	<i>Modulation de la chaîne latérale en position 3</i>	32
III.1.1.1.2.	<i>Remplacement du groupement chlorométhyle en position 6</i>	34
III.1.1.1.3.	<i>Etude du lien entre la coumarine et la chaîne latérale en 3</i>	34
III.1.1.1.4.	<i>Conclusions</i>	34
III.1.1.2.	Etude des paramètres cinétiques d'inactivation	34
III.1.1.2.1.	<i>Détermination de la constante de Michaelis-Menten du Chromozym TH</i>	35

III.1.1.2.2. Détermination des constantes cinétiques d'inactivation k_i et K_I	36
III.1.2. Etude du pouvoir inhibiteur des coumarines vis-à-vis du facteur Xa	37
III.1.2.1. Test de criblage	37
III.1.2.1.1. Modulation de la chaîne latérale en position 3	37
III.1.2.1.2. Remplacement du groupement chlorométhyle.....	39
III.1.2.1.3. Modulation du lien entre la coumarine et la chaîne latérale en 3.....	39
III.1.2.1.4. Conclusions.....	39
III.1.2.2. Etude des paramètres cinétiques d'inactivation.....	39
III.1.2.2.1. Détermination de la constante de Michaelis-Menten du Chromozym X.....	40
III.1.2.2.2. Détermination des constantes cinétiques d'inactivation k_i et K_I	40
III.1.3. Comparaison du pouvoir inhibiteur des coumarines vis-à-vis de la thrombine et du facteur Xa	42
III.2. Etude du mécanisme d'inhibition des coumarines.....	43
III.2.1. Hypothèse du mécanisme d'inhibition	43
III.2.2. Caractérisation des interactions enzyme-inhibiteur	44
III.2.3. Caractérisation des complexes enzyme-inhibiteur par spectrométrie de masse ..	44
III.2.3.1. Mesure du poids de l'adduit	44
III.2.3.2. Détermination du site de fixation de l'inhibiteur	47
III.2.3.2.1. Approche théorique.....	47
III.2.3.2.2. Résultats expérimentaux	47
III.3. Conclusions et perspectives	49
III.3.1. Conclusions	49
III.3.2. Perspectives.....	50
IV. BIBLIOGRAPHIE	53

I. INTRODUCTION

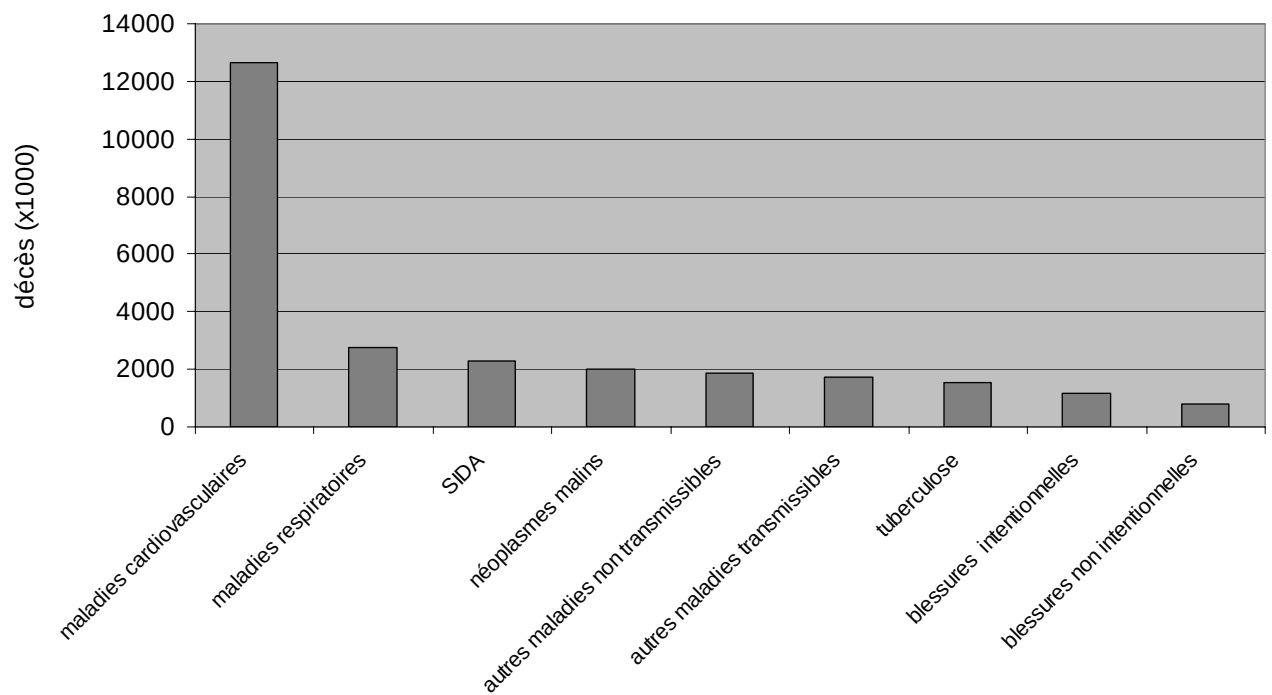


Figure 1 : Causes principales de mortalité chez les adultes à travers le monde en 2002

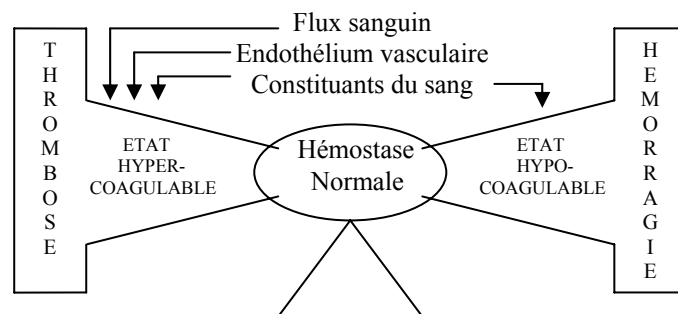


Figure 2 : Balance hémostatique

I. INTRODUCTION

I.1. Les maladies cardiovasculaires

I.1.1.Epidémiologie

Les maladies cardiovasculaires représentent une des causes majeures de mortalité. En 2002, ce type de pathologie était responsable de plus de 12 millions de décès à travers le monde (Figure 1). Dans les pays développés, elles sont la première cause de mortalité. Mais, étonnamment, elles le sont également dans certains pays en voie de développement, où elles sont responsables d'un tiers des décès. Le tabac, un régime alimentaire inapproprié et le manque d'activité physique sont autant de comportements menant au développement des maladies cardiovasculaires. La plupart des populations, dans presque tous les pays, sont menacées en raison de niveaux élevés de ces facteurs de risque. Seul environ 5 % des adultes des pays riches sont considérés comme étant à faible risque thrombotique avec un niveau de risque optimal. Les maladies cardiovasculaires représentent donc un problème de santé publique mondial [Beaglehole, et al., 2003].

I.1.2.Physiopathologie

I.1.2.1. Introduction : l'hémostase et la balance hémostatique

L'hémostase constitue l'ensemble des mécanismes qui permettent la cessation de l'écoulement du sang lors d'une perte d'intégrité vasculaire. Elle repose sur la coopérativité des plaquettes et des facteurs de la coagulation ainsi que sur des propriétés spécifiques aux vaisseaux et tissus du site de lésion. Elle est généralement divisée en quatre phases : la constriction du vaisseau blessé pour diminuer le flot sanguin en aval de la blessure, la formation d'un clou plaquettaire pour arrêter l'écoulement du sang (hémostase primaire), la génération d'un réseau de fibrine pour former un thrombus stable (hémostase secondaire) et la dissolution du caillot (fibrinolyse) [Murray, et al., 2002].

Toutefois, la découverte de nombreux facteurs et voies contribuant à la formation et à la dégradation du caillot sanguin ou jouant un rôle régulateur dans l'hémostase, a mis l'accent sur la double fonction du système hémostatique. En effet, d'une part, celui-ci assure la formation rapide d'un clou hémostatique en cas de rupture d'une paroi vasculaire afin de prévenir la perte de sang, tandis que d'autre part, ce même système est essentiel pour maintenir la fluidité du sang afin de conserver une circulation et une perfusion correcte des organes [Levi, 1999]. Il y a plus de 40 ans, Astrup proposait déjà la notion d'un équilibre entre la tendance du sang à coaguler et à rester fluide, qu'il étendit au fait que la coagulation et la fibrinolyse existaient sous forme d'une balance [Gaffney, et al., 1999]. Cette balance est contrôlée par le flux sanguin produit par le cycle cardiaque ainsi que par les constituants de l'endothélium vasculaire et du sang lui-même (Figure 2). Toute dérégulation de l'un de ces composants aboutit à un déséquilibre de la balance hémostatique normale qui peut ensuite évoluer vers un état pathologique d'hypo- ou d'hyper-coagulabilité. Ainsi, les hémorragies, résultant des états d'hypocoagulabilité, sont principalement liées à une diminution d'activité des facteurs procoagulants (hémophilies) et aux thrombocytopénies. Quant aux thromboses, consécutives aux états d'hypercoagulabilité, elles peuvent être dues à une modification du flux sanguin (stase, turbulence...), à une lésion de l'endothélium ou encore à une

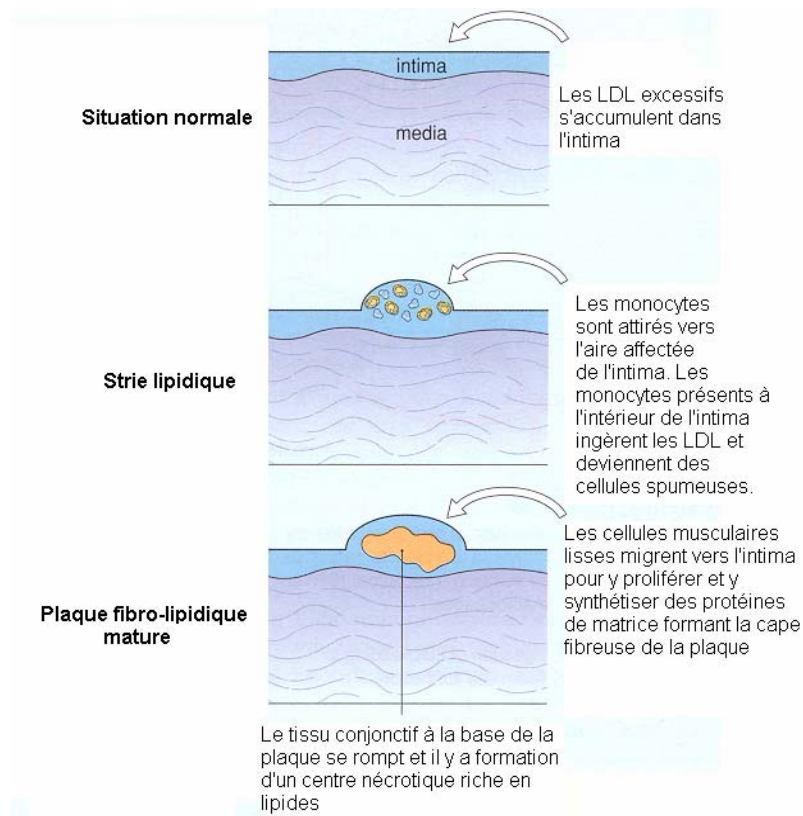


Figure 3 : Développement d'une plaque athérosclérotique [Woolf, 1998]

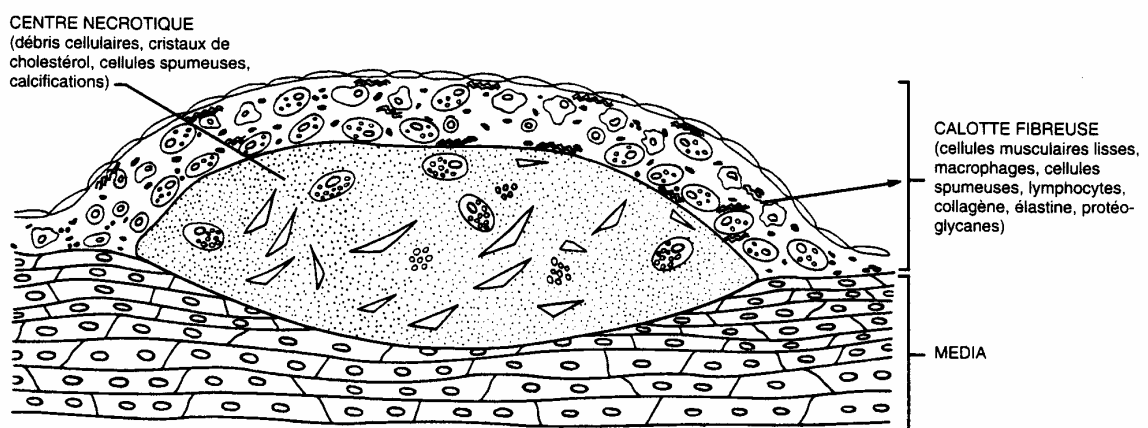


Figure 4 : Structure d'une plaque fibrolipidique [Cotran, et al., 1996]

modification des constituants du sang (efficacité réduite des inhibiteurs de la coagulation, activité réduite du système fibrinolytique...) [Rasche, 2001].

I.1.2.2. L'athéromatose

D'une manière générale, toutes les maladies cardiovasculaires partagent le même processus physiopathologique de l'athéromatose. Celle-ci est définie par la rupture d'une lésion athérosclérotique présente dans la paroi d'un vaisseau sanguin, suivie de la formation d'un thrombus [Viles-Gonzales & Badimon, 2004].

I.1.2.2.1. Développement et évolution des plaques athérosclérotiques

L'athérosclérose est une pathologie caractérisée par l'épaississement et le durcissement des artères musculaires de gros et moyen calibre ainsi que des artères élastiques. Elle commence par l'accumulation excessive au niveau de l'intima de lipoprotéines de faible densité (LDL) riches en cholestérol provenant du plasma (Figure 3). Des monocytes sont ensuite attirés vers cette région et se transforment en cellules spumeuses suite à l'ingestion de ces LDL. On parle alors de strie lipidique. Les cellules musculaires lisses sont également attirées vers l'intima où elles prolifèrent. La synthèse concomitante de protéines de matrice et de fibres de collagène aboutit à la formation d'une coiffe de tissu conjonctif fibreux. A la base de la lésion, un centre nécrotique comprenant des débris nécrotiques, des lipides extracellulaires et des macrophages spumeux se développe. On parle alors de plaque fibro-lipidique (Figure 4) [Cotran, et al., 1996; Woolf, 1998].

Ces lésions athéromateuses sont au départ relativement dispersées, mais au fur et à mesure que la maladie progresse, elles deviennent de plus en plus nombreuses et confluent pour recouvrir la totalité de la surface de l'intima des artères atteintes. Lorsque les plaques augmentent de volume, elles progressent à la fois vers la lumière de l'artère et vers la média. Ainsi, l'athérome est responsable d'une réduction de la circulation artérielle et d'un affaiblissement de la paroi vasculaire [Cotran, et al., 1996].

Lorsqu'une plaque athérosclérotique se rompt, son centre nécrotique lipidique hautement thrombogène est exposé au flux sanguin et fournit un substrat puissant pour l'activation de la cascade de la coagulation [Zaman, et al., 2000] et de l'agrégation plaquettaire. La formation subséquente d'un thrombus occlusif riche en plaquettes peut alors être responsable d'un syndrome ischémique aigu. Le thrombus peut également être non occlusif, s'incorporer dans la plaque et contribuer à l'épaississement de celle-ci [Cotran, et al., 1996].

I.1.2.2.2. Implication des plaquettes dans la formation du thrombus

Il existe différents mécanismes physiologiques qui permettent d'empêcher l'activation plaquettaire en conditions normales (Figure 5). Les plaquettes circulantes sont habituellement dans un état inactif sous l'effet de la prostacycline (PGI_2) et du monoxyde d'azote (NO) libérés par les cellules endothéliales qui bordent les parois des vaisseaux sanguins. Celles-ci expriment également la CD39 ADPase qui dégrade rapidement l'adénosine diphosphate (ADP), un inducteur potentiel de l'activation plaquettaire, en adénosine monophosphate (AMP) [Bhatt & Topol, 2003].

Lors de la rupture d'une plaque athérosclérotique, il y a exposition de différentes substances thrombogènes du subendothélium auxquelles les plaquettes circulantes adhèrent rapidement. Cette adhésion se fait via des interactions entre le facteur de von Willebrand (vWF), qui a été libéré par les cellules endothéliales et immobilisé sur le collagène du subendothélium, et son récepteur plaquettaire la glycoprotéine Ib-IX (GP Ib-IX). Une liaison directe des plaquettes à

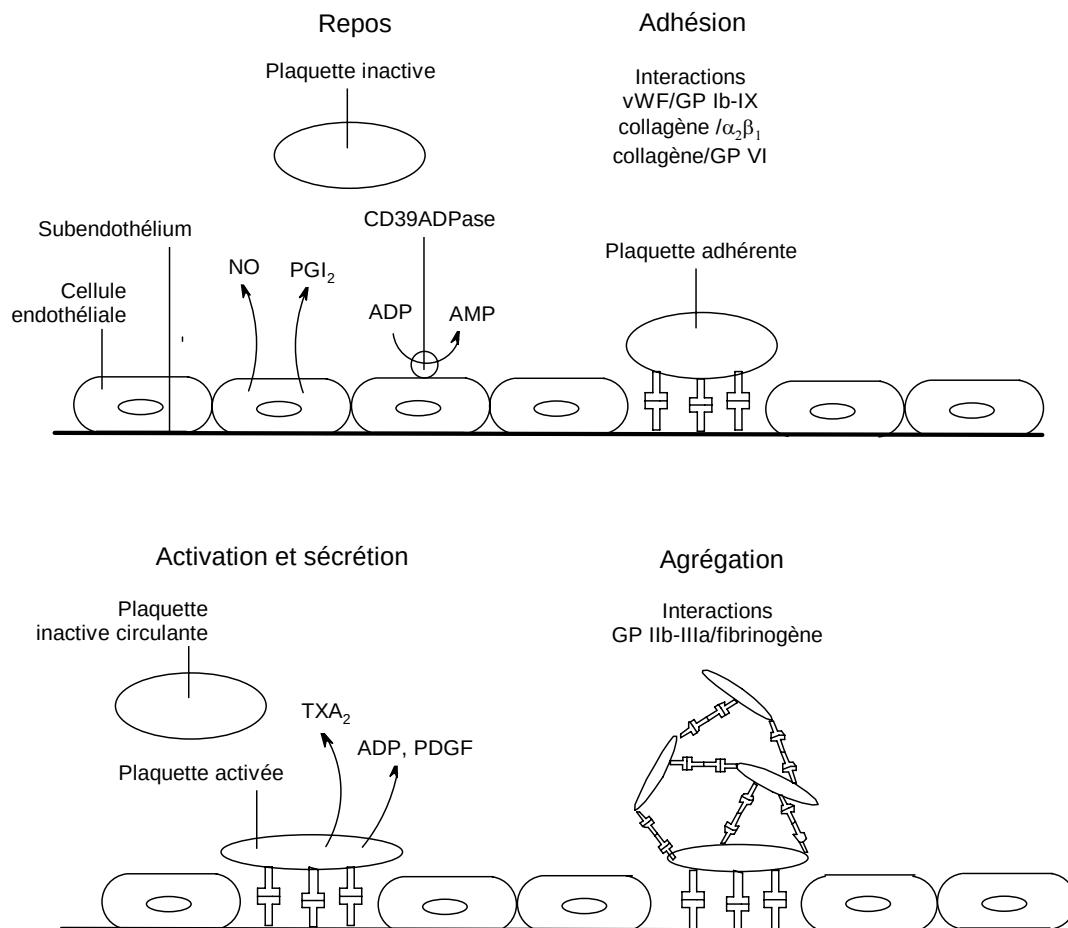


Figure 5 : Processus d'agrégation plaquettaire

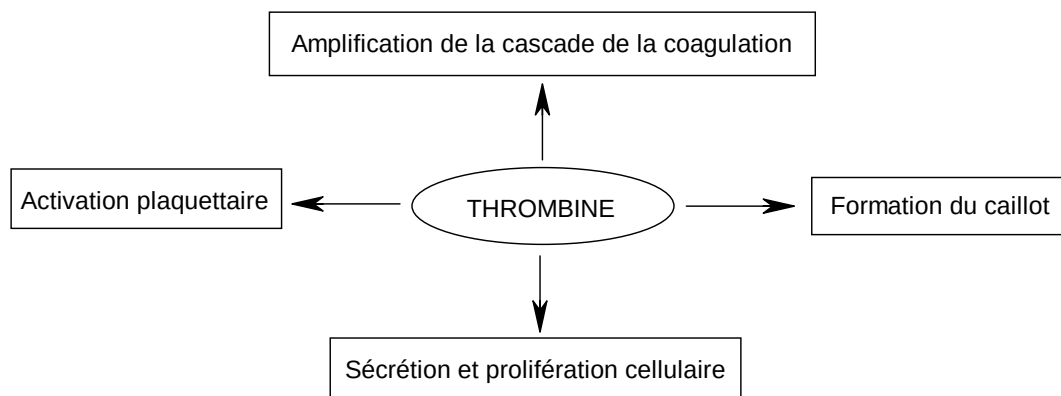


Figure 6 : Rôle central de la thrombine dans la thrombogenèse

la matrice de collagène peut également se produire via l'intégrine plaquettaire $\alpha_2\beta_1$. La glycoprotéine VI (GP VI), un autre récepteur plaquettaire, contribue au renforcement de l'adhésion des plaquettes au collagène [Gresele & Agnelli, 2002]. Toutes ces interactions aboutissent à l'activation des plaquettes. Il y a alors libération de thromboxane A_2 (TXA₂), de facteur activateur de plaquettes (PAF), d'ADP ainsi que d'autres médiateurs thrombotiques qui provoquent le recrutement des plaquettes circulantes dans le thrombus en croissance. Les plaquettes activées exposent également la glycoprotéine IIb-IIIa (GP IIb-IIIa) à laquelle se lie le fibrinogène. Celui-ci sert de lien entre les plaquettes avant d'être clivé en fibrine lors du processus de coagulation. La fibrine forme alors un réseau stable autour du thrombus plaquettaire [Bhatt & Topol, 2003].

I.1.2.2.3. Implication de la cascade de la coagulation dans la formation du thrombus

Lors de la rupture d'une plaque athérosclérotique, l'accumulation de récepteurs et de surfaces membranaires favorise la liaison des protéines procoagulantes circulantes et la formation de complexes comprenant des enzymes de la coagulation, des cofacteurs protéiques non enzymatiques, des ions calcium (Ca^{2+}) et des composants de membrane cellulaire. La formation de ces complexes est initiée par l'exposition du facteur tissulaire (TF), une glycoprotéine de membrane présente dans le centre nécrotique de la plaque athérosclérotique. Tous ces complexes concourent à la formation de thrombine, l'effecteur de la cascade de la coagulation et l'un des activateurs plaquettaires les plus puissants [Jenny & Mann, 2003].

La thrombine joue un rôle central dans la thrombogenèse (Figure 6). En effet, elle convertit le fibrinogène en fibrine et active le facteur XIII (FXIII) qui stabilise le réseau de fibrine. Elle entretient et amplifie le processus de coagulation en activant le facteur V (FV) et le facteur VIII (FVIII), les cofacteurs clés de sa production. De plus, en interagissant avec ses récepteurs plaquettaires PAR1 et PAR4 (« protease-activated receptor »), elle active efficacement les plaquettes, ce qui mène à la croissance du thrombus. Elle peut également stimuler la prolifération des cellules musculaires lisses et la synthèse de cytokines inflammatoires qui contribuent au maintien du processus inflammatoire en attirant les monocytes vers l'endothélium lésé. La production de thrombine est donc à la fois impliquée dans la progression chronique de l'athérosclérose et dans sa conversion en événements aigus [Pothula, et al., 2000].

Afin de mieux comprendre le rôle clé joué par la cascade de la coagulation dans la formation du thrombus, celle-ci sera détaillée dans le point suivant grâce à deux modèles : le modèle classique et le modèle cellulaire.

I.2. La cascade de la coagulation

I.2.1. Vue classique de la cascade de la coagulation

La cascade de la coagulation a été initialement décrite comme une série de réactions protéolytiques séquentielles et amplifiées se produisant en « phase fluide », c'est à dire dans le flux sanguin [Wiiger & Prydz, 2000]. En effet, les facteurs de la coagulation sont des protéases à sérine (voir section I.4.) synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, ou zymogènes. A chaque étape de la cascade, un zymogène est converti par le facteur précédent en sa forme active par clivage d'une ou plusieurs liaisons peptidiques. Ce phénomène implique de nombreuses protéases à sérine (facteurs XII, XI, IX, X, VII, VIII, V et

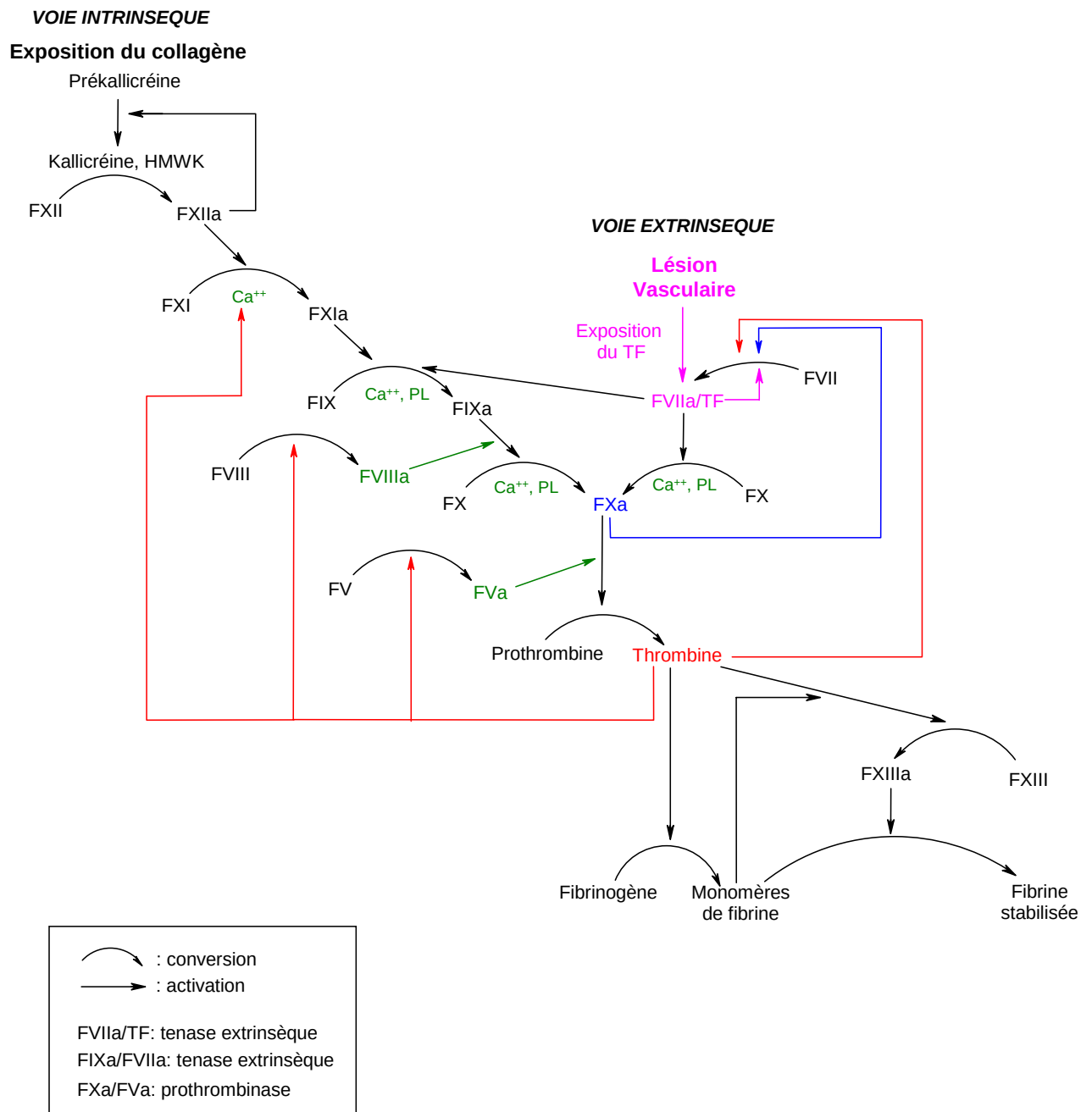


Figure 7 : Vue classique de la cascade de la coagulation

thrombine) et aboutit à la formation de fibrine via deux voies classiquement définies comme les voies intrinsèque et extrinsèque [Murray, et al., 2002].

Cependant, la cascade de la coagulation est, en réalité, un réseau complexe de processus physiques, biochimiques et cellulaires entremêlés contribuant à l'hémostase. La réponse de coagulation se produit essentiellement au niveau des surfaces cellulaires des plaquettes activées et des cellules subendothéliales lésées. Celles-ci promeuvent la fixation des protéines procoagulantes circulantes et initient la formation de complexes multicomposants associés aux membranes.

Les différents processus de la réponse de coagulation peuvent se décomposer en cinq étapes principales : l'initiation de l'événement par une blessure vasculaire, la propagation de la réponse procoagulante, la terminaison de la réponse après formation du caillot, l'élimination du caillot ainsi que la réparation et la régénération du tissu endommagé. Tous ces processus se déroulent de telle façon que la réponse de coagulation est localisée à l'aire de la blessure, amplifiée à un degré approprié selon la gravité de la lésion, atténuée afin d'empêcher une activation systémique et modulée pour permettre les processus de réparation subséquents [Jenny & Mann, 2003].

I.2.1.1. Initiation

La voie extrinsèque de la coagulation est déclenchée par la liaison du facteur VII activé (FVIIa) au TF (Figure 7). Le TF est une glycoprotéine de membrane associée aux phospholipides. En conditions normales, il est exprimé de façon constitutive sur les surfaces cellulaires extravasculaires. En cas de sepsis, il peut également être présenté par les cellules sanguines et endothéliales stimulées par des cytokines inflammatoires. Le FVIIa, activé par la thrombine ou le facteur X activé (FXa), circule continuellement en petite quantité dans le plasma et exerce à lui seul une activité enzymatique faible. La liaison du FVIIa au TF provoque une modification allostérique du site actif du FVIIa qui voit ainsi son activité protéolytique fortement augmentée. Le complexe FVIIa/TF peut également activer de faibles quantités additionnelles de facteur VII (FVII), lié ou non au TF, via un mécanisme autocatalytique. Lors d'une blessure vasculaire ou d'une rupture de plaque athérosclérotique, le FVIIa complexé au TF associé au subendothélium lésé déclenche immédiatement la réponse de coagulation. En effet, ce complexe forme, avec les phospholipides membranaires et le Ca^{2+} , la tenase extrinsèque qui permet de convertir le facteur X (FX) et le facteur IX (FIX) en FXa et en facteur IX activé (FIXa), respectivement [Broze, 2003; Jenny & Mann, 2003].

Le FIX peut également être activé par la voie intrinsèque de la coagulation. Celle-ci commence par une phase d'activation de contact dans laquelle la prékallikréine, le kinogène de haut poids moléculaire (HMWK), le facteur XII (FXII) et le facteur XI (FXI) sont exposés à une surface activante chargée négativement. Le collagène de la surface du vaisseau sanguin lésé constitue probablement ce site *in vivo*. Lorsqu'il y a assemblage des composants de la phase de contact sur la surface activante, le FXII est converti en FXII activé (FXIIa) par la kallikréine. Ce FXIIa peut alors d'une part, maintenir son activation en clivant la prékallikréine pour générer de nouveau de la kallikréine et peut, d'autre part, en présence de Ca^{2+} , cliver le FXI en facteur XI activé (FXIa). Le FXIa active ensuite, en présence de Ca^{2+} , le FIX en FIXa. Celui-ci se lie à la surface des plaquettes activées, où il forme, avec le facteur VIII activé (FVIIIa) et le Ca^{2+} , la tenase intrinsèque. Toutefois, cette voie intrinsèque n'interviendrait qu'après initiation de la coagulation par la voie extrinsèque et serait

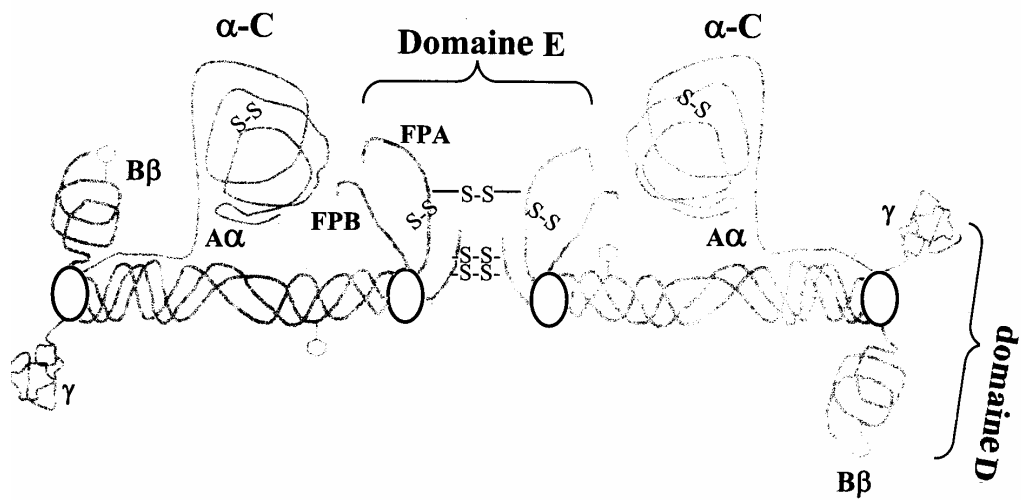


Figure 8 : Molécule de fibrinogène [Greenberg & Lai, 2003]

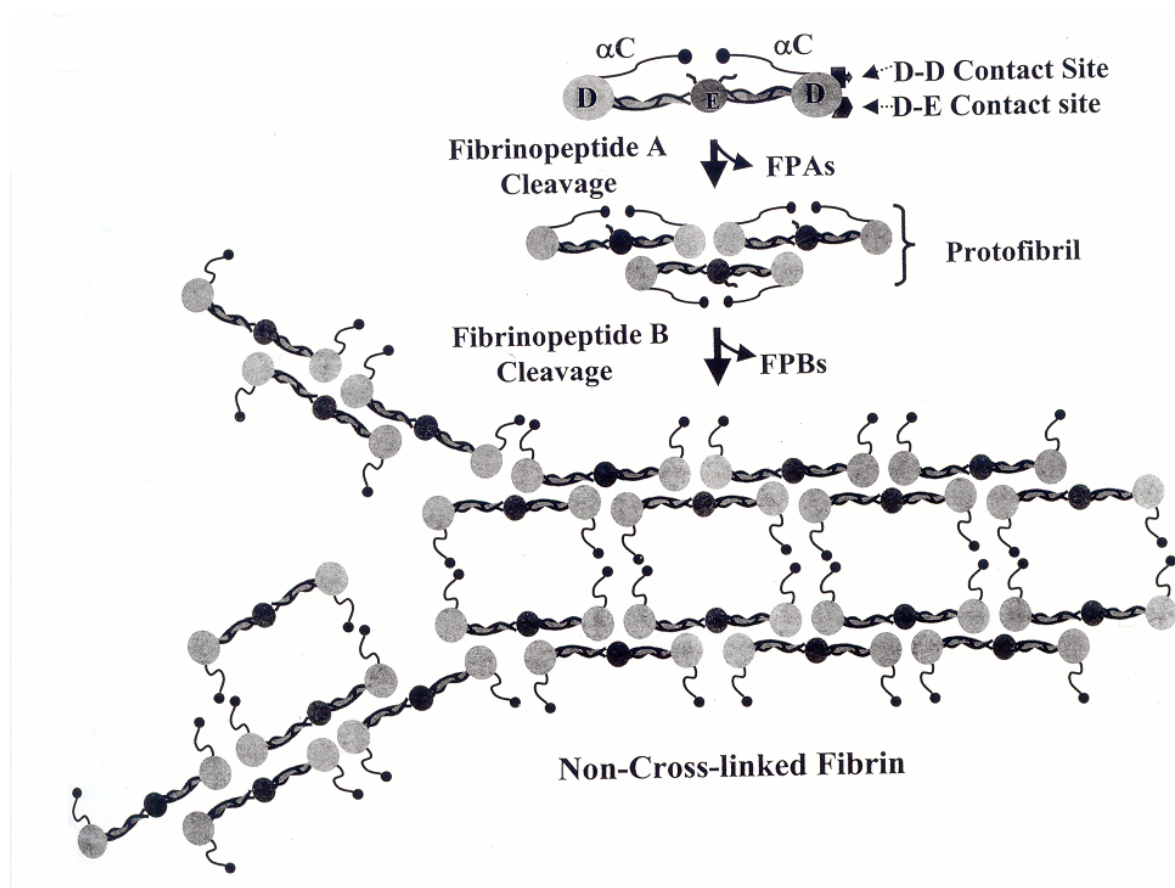


Figure 9 : Formation de la fibrine [Greenberg & Lai, 2003]

principalement impliquée dans le maintien de la formation de fibrine au niveau du thrombus, c'est-à-dire dans l'étape de propagation [Davie, 1995; Murray, et al., 2002].

En présence de Ca^{2+} , le FXa qui peut être activé à la fois par les tenases extrinsèque et intrinsèque se lie au facteur V activé (FVa) à la surface des plaquettes activées pour former le complexe prothrombinase. Celui-ci active alors efficacement la prothrombine en thrombine.

I.2.1.2. Propagation

La coagulation est propagée via une activité maximale de tous les complexes procoagulants enzymatiques assemblés au niveau de la matrice subendothéliale et des plaquettes et aboutit à une génération massive de thrombine (Figure 7).

La thrombine convertit le fibrinogène soluble en une matrice de fibrine insoluble qui arrête l'écoulement du sang. Le fibrinogène est une glycoprotéine trinodulaire composée de deux parties symétriques (Figure 8). Chaque partie comprend trois chaînes polypeptidiques distinctes appelées $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ et γ . Le nodule central, ou domaine E, contient les extrémités N-terminales des six chaînes polypeptidiques qui sont reliées entre elles par des ponts disulfures. Les domaines D forment les nodules externes et comprennent les extrémités C-terminales des chaînes $\text{B}\beta$ et γ . Un domaine globulaire additionnel, appelé $\alpha\text{-C}$, représente l'extrémité C-terminale de la chaîne $\text{A}\alpha$. La thrombine, en clivant les chaînes $\text{A}\alpha$ et $\text{B}\beta$ du fibrinogène, libère les fibrinopeptides A et B (FPA et FPB) des extrémités N-terminales et expose des nouveaux sites de liaisons intramoléculaires au niveau du domaine E (Figure 9). Le monomère de fibrine ainsi formé peut interagir avec les monomères adjacents via des contacts D/E, D/D et $\alpha\text{-C}/\alpha\text{-C}$, ce qui aboutit à la formation d'un réseau stable de fibrine entourant le thrombus plaquettaire [Greenberg & Lai, 2003].

La thrombine se lie ensuite à la fibrine via son exosite de liaison anionique, ce qui la protège de son inactivation par l'antithrombine III (AT III) (voir section I.2.1.3). Elle joue alors un double rôle dans la propagation et la stabilisation de la fibrine en catalysant la conversion du fibrinogène en fibrine et l'activation du FXIII, ou facteur stabilisateur de fibrine. Cette enzyme renforce la matrice de fibrine via la formation de liaisons covalentes entre les différents monomères. La fibrine amplifie la production du facteur XIII activé (FXIIIa) par la thrombine (Figure 7). Cette boucle de rétroaction permet au FXIIIa de ne pas être produit avant que son substrat ne soit disponible. Il existe également un inhibiteur de fibrinolyse activable par la thrombine (TAFI) protégeant le caillot de fibrine de la dégradation durant la phase de terminaison de la coagulation [Greenberg & Lai, 2003].

De plus, la thrombine participe à un mécanisme de rétroaction positive lui permettant d'entretenir sa production via l'activation des FV, FVII, FVIII et FXI (Figure 7) mais aussi, via l'activation des plaquettes circulantes afin de fournir plus de surfaces cellulaires nécessaires à l'assemblage des complexes procoagulants [Jenny & Mann, 2003].

La phase de propagation de la coagulation aboutit donc, via la production d'une quantité importante de thrombine, à la formation d'un caillot stable au niveau du site de lésion et à l'arrêt de la perte de sang.

I.2.1.3. Terminaison

En impliquant les processus inhibiteurs constitutifs ainsi qu'un processus inhibiteur dynamique initié par la coagulation elle-même, la terminaison de la réponse de coagulation mène à l'inhibition des complexes enzymatiques procoagulants, soit par inhibition directe des

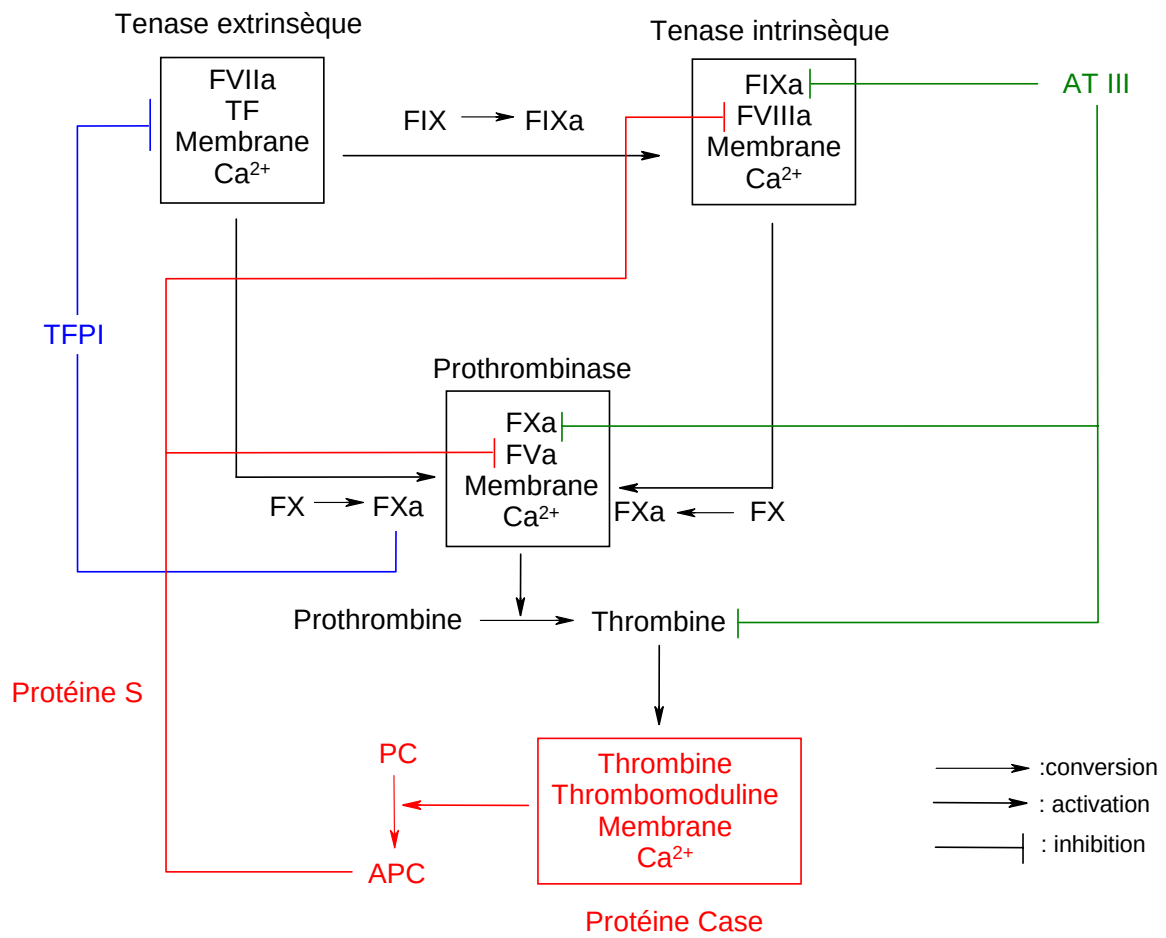


Figure 10 : Le système anticoagulant

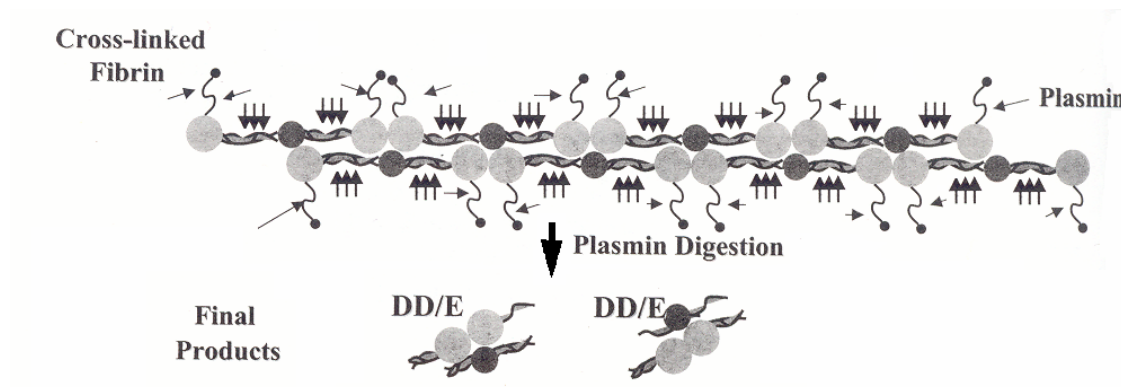


Figure 11 : Dégradation de la fibrine [Greenberg & Lai, 2003]

protéases, soit par inactivation de leurs cofacteurs (Figure 10) [Davie, 1995; Jenny & Mann, 2003; Simmonds, et al., 2003].

Le système inhibiteur constitutif consiste principalement en deux inhibiteurs de protéases circulants : l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) et l'antithrombine III (AT III). Le TFPI circulant à des concentrations relativement faibles dans le sang inactive la tenase extrinsèque via un mécanisme dépendant du FXa. En effet, il se lie de façon non covalente au FXa et le complexe TFPI/FXa formé inhibe le complexe FVIIa/TF. La présence de cet inhibiteur justifie vraisemblablement la courte durée de vie de la voie extrinsèque. L'AT III appartient à la famille des serpins (« serine protease inhibitor »). Elle circule à haute concentration dans le sang et inhibe la plupart des enzymes procoagulantes (thrombine, FXa, FIXa, FXIa et XIIa) en bloquant l'accès à leur site actif. Toutefois, l'inhibition de la thrombine et du FXa est probablement son rôle le plus important. L'action inhibitrice de l'AT III peut être augmentée par l'héparan sulfate, un protéoglycane présent à la surface des cellules endothéliales et constituant un mécanisme antithrombogène naturel.

La voie de la protéine C inhibe quant à elle les événements procoagulants via un système inhibiteur dynamique. La première étape consiste en la liaison de la thrombine à la thrombomoduline, une protéine membranaire présente à la surface des cellules endothéliales et des plaquettes, pour former le complexe thrombine/thrombomoduline (ou protéine Case). Celui-ci convertit alors la protéine C (PC) en protéine C activée (APC) via une protéolyse limitée. L'APC inactive la prothrombinase et la tenase intrinsèque en clivant leurs cofacteurs respectifs, le FVa et le FVIIIa. Ces réactions sont catalysées par un cofacteur non enzymatique, la protéine S. La formation de la protéine Case et de l'APC est un processus dynamique car elle est directement liée à la génération de thrombine. Celle-ci possède donc des activités pro- et anticoagulante distinctes. Ainsi, lorsque la thrombine forme un complexe avec son cofacteur anticoagulant, la thrombomoduline, sa réactivité change de sorte qu'elle perd son rôle procoagulant d'activation des plaquettes et des cofacteurs ainsi que de clivage du fibrinogène, pour jouer un rôle anticoagulant en activant de la voie de la protéine C.

La phase de terminaison est donc l'événement critique contrôlant l'extension du réseau de fibrine. L'arrêt du processus de coagulation, après la formation d'un caillot adéquat, est nécessaire afin d'empêcher l'apparition d'événements thrombotiques indésirables suite à une formation systémique excessive de thrombi.

I.2.1.4. Elimination

L'élimination du caillot, ou fibrinolyse, est une étape essentielle dans le processus de réparation du tissu. La dégradation de la fibrine nécessite l'action de la plasmine. Celle-ci dissout le thrombus en clivant la matrice de fibrine en peptides solubles de fibrine de type DD/E (Figure 11) [Greenberg & Lai, 2003].

Le système fibrinolytique est composé de différentes protéines qui interagissent de manière à réguler la production de plasmine. Celle-ci est formée à partir d'un zymogène circulant, le plasminogène. Ce dernier se lie à la fibrine et est incorporé dans le caillot en formation. Il est alors converti en plasmine grâce à l'action de l'activateur de plasminogène de type tissulaire (tPA) et de l'activateur de plasminogène de type urinaire ou urokinase (uPA) (Figure 12). Ces protéases à sérine sont sécrétées par les cellules endothéliales suite à la lésion vasculaire et activées lors de leur fixation sur le réseau de fibrine. La production de plasmine reste ainsi localisée au niveau du réseau de fibrine du thrombus [Murray, et al., 2002].

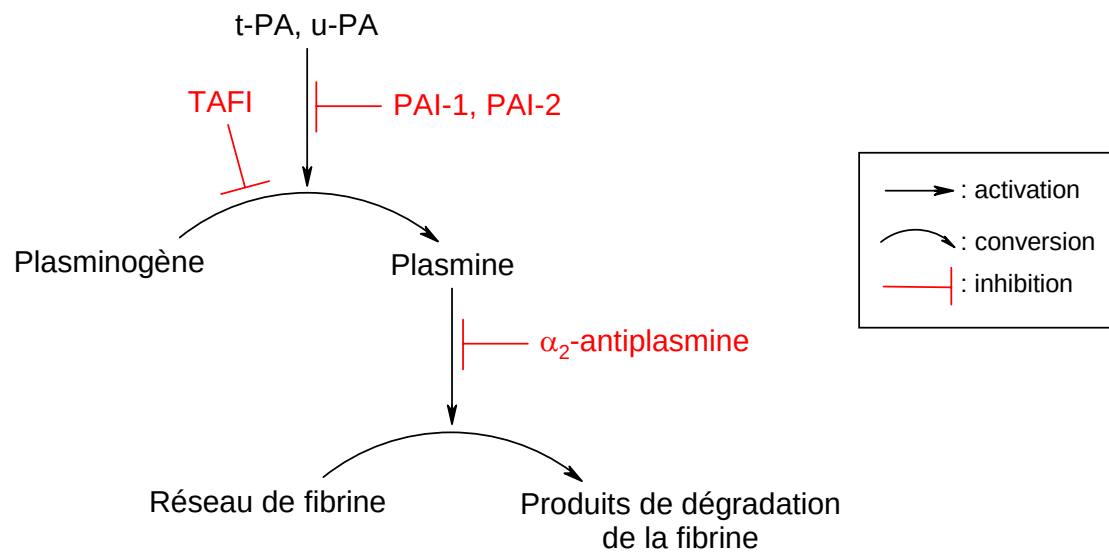


Figure 12 : Le système fibrinolytique

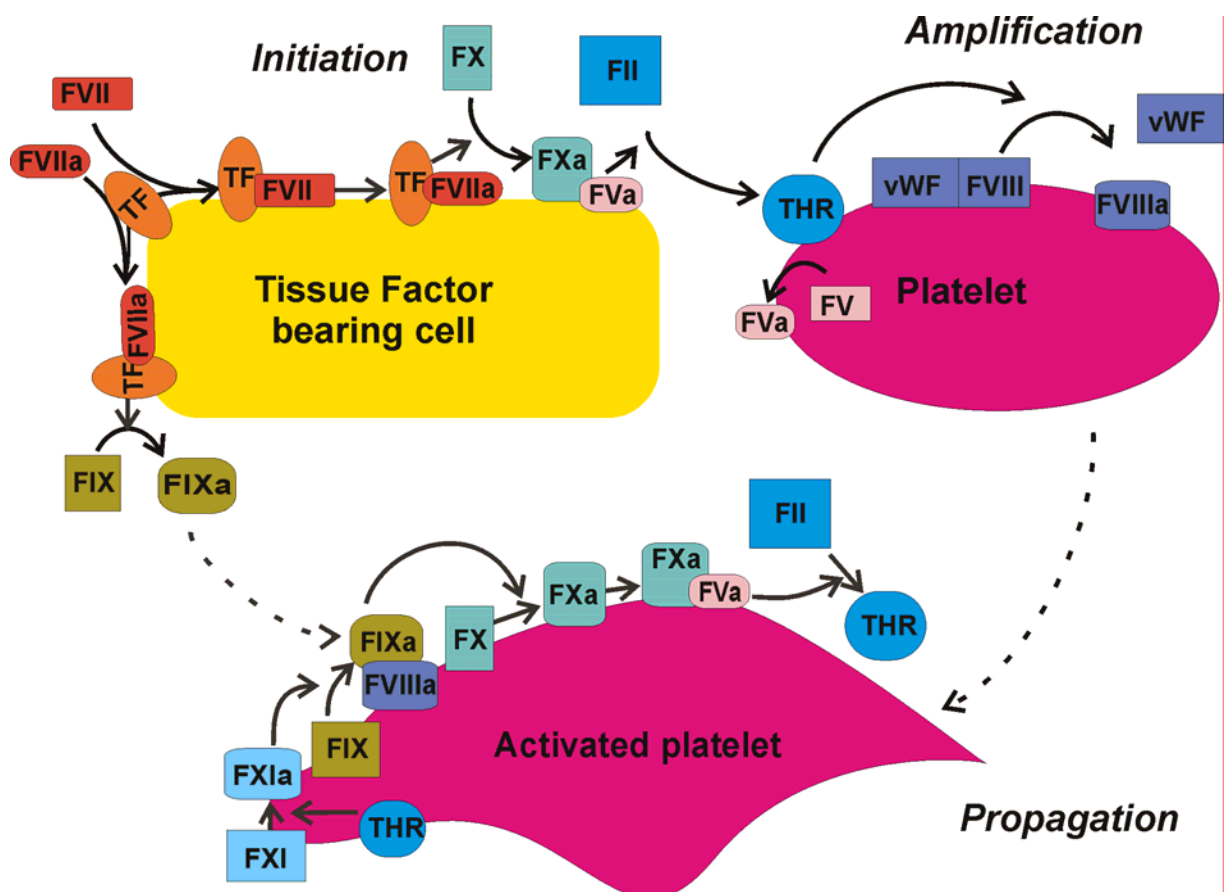


Figure 13 : Modèle cellulaire de la cascade de la coagulation

La conversion du plasminogène est inhibée par les inhibiteurs des activateurs du plasminogène de type 1 et 2 (PAI 1 et 2) sécrétés par les cellules endothéliales. Ceux-ci interagissent avec le tPA et l'uPA liés ou non à la fibrine. Le TAFI, produit par le complexe thrombomoduline/thrombine, en interagissant avec la fibrine, diminue également la production de plasmine en limitant l'association du plasminogène à la fibrine. La plasmine libre circulante peut quant à elle être inactivée par l' α_2 -antiplasmine plasmatique, un autre membre de la famille des serpins (Figure 12) [Vaughan & Declerck, 2003].

L'activité de la plasmine est donc requise non seulement pour la protéolyse de la matrice de fibrine. Mais elle l'est également pour l'activation de diverses métalloprotéases de matrice. Celles-ci, en dégradant les composants du tissu endommagé, permettent la migration cellulaire lors des étapes finales de réparation vasculaire [Jenny & Mann, 2003].

I.2.1.5. Réparation

La réparation et la régénération du tissu endommagé constituent les étapes finales du processus de coagulation. Celles-ci requièrent l'activité de la plasmine qui va stimuler les métalloprotéases de matrice pour permettre la migration cellulaire dans la région endommagée. L'activité de la thrombine est également importante dans cette étape. En effet, celle-ci est un facteur de croissance et un chémoattractant pour les fibroblastes, les macrophages et les cellules musculaires lisses. De plus, l'activation plaquettaire induite par la thrombine aboutit à la libération de composés vasoactifs et de facteurs de croissance. La thrombine favorise également la production de facteurs de croissance au niveau de l'endothélium. Tous ces facteurs de croissance stimulent la migration et la prolifération de nombreux types cellulaires. Ceux-ci vont recréer au niveau de la région endommagée les éléments endothéliaux et subendothéliaux requis pour former une surface vasculaire antithrombogène [Jenny & Mann, 2003].

I.2.2. Le modèle cellulaire de la cascade de la coagulation

Contrairement aux phénomènes *in vitro*, certaines observations cliniques *in vivo* ne peuvent être décrites par le modèle classique de la coagulation exposé ci-dessus. De plus, l'avancement des connaissances tend à donner plus d'importance aux surfaces cellulaires où les événements importants de la cascade de la coagulation se produisent. Un modèle cellulaire de la cascade de la coagulation, intégrant les observations cliniques, a donc été proposé. Celui-ci considère que le processus de coagulation n'est pas contrôlé par les concentrations des protéines pro- et anticoagulantes mais bien par les composants cellulaires. Ainsi, l'expression de récepteurs cellulaires pour les protéines localiserait les réactions protéolytiques sur différentes surfaces cellulaires et servirait à contrôler la réponse de coagulation. Dans ce modèle cellulaire, le processus d'hémostase est décrit en trois phases : l'initiation, l'amplification et la propagation (Figure 13) [Hoffman & Monroe, 2001; Veldman, et al., 2003].

I.2.2.1. Initiation

La phase d'initiation est déclenchée par l'exposition au flux sanguin d'une cellule portant le TF, tel un fibroblaste de la matrice subendothéliale, une cellule endothéliale ou encore un leucocyte mononucléaire en cas de sepsis. Le FVII circulant se lie alors fortement au TF et est rapidement activé par des protéases appartenant ou non à la cascade de la coagulation. Le complexe TF/FVIIa résultant active ensuite le FX en FXa. Ce dernier, seul ou complexé au FVa, produit de petites quantités de thrombine au niveau de la surface de la cellule portant le

TF. Ces petites quantités de thrombine sont indispensables à l'activation des plaquettes, du FV et du FVIII lors de la phase d'amplification.

I.2.2.2. Amplification

Lors de la blessure vasculaire, les plaquettes circulantes entrent en contact avec les tissus extravasculaires et se lient rapidement aux protéines de matrice exposée au niveau du site de lésion. Ce processus de liaison active partiellement les plaquettes et les localise près des cellules portant le TF. Les petites quantités de thrombine produites dans la phase d'initiation à la surface de ces dernières amplifient alors le signal procoagulant initial en se liant aux récepteurs plaquettaires PAR. Il en résulte une activation totale des plaquettes adhérentes qui changent alors de forme. Celles-ci libèrent le FV de leurs granules α afin qu'il soit converti en FVa par la thrombine. D'autres molécules de thrombine liées aux récepteurs GP Ib-IX des plaquettes adhérentes libèrent le FVIII du vWF et l'active en FVIIIa. Celui-ci reste lié à la surface des plaquettes. Le processus de coagulation s'est ainsi déplacé des cellules portant le TF vers les plaquettes activées. Celles-ci accumulent à leur surface les cofacteurs activés FVa et FVIIIa et sont prêtes à supporter l'assemblage des complexes procoagulants afin d'engendrer une génération massive de thrombine.

I.2.2.3. Propagation

Lors de la phase de propagation, les complexes tenase (FIXa/FVIIIa) et prothrombinase (FXa/FVa) sont assemblés sur la surface des plaquettes activées. Le FIX peut être activé lors de la phase d'initiation par le complexe FVIIa/TF au niveau des cellules portant le TF et migrer ensuite vers la surface des plaquettes activées. Il peut également être converti en FIXa par le FXIa directement au niveau de la surface plaquettaire lors de la phase de propagation. Ce FXIa a été activé par la thrombine. Une fois le complexe FIXa/FVIIIa formé, il clive le FX en FXa qui se lie directement au FVa pour former la prothrombinase. Ce complexe produit alors une génération massive de thrombine. Ces quantités très importantes de thrombine vont pouvoir former le caillot hémostatique de fibrine.

L'hémostase primaire, le système de coagulation et le système fibrinolytique sont ainsi connus dans leurs caractéristiques principales. Cependant, beaucoup de questions importantes telles que l'interaction et la régulation précise de ces différents mécanismes *in vivo* subsistent. L'impact de ces connaissances sur le développement de nouveaux traitements contre les thromboses et les hémorragies reste également à déterminer [Levi, 1999].

I.3. Les traitements antithrombotiques

Trois approches majeures sont employées dans le traitement des maladies cardiovasculaires : l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la dissolution des thrombi et l'inhibition de la cascade de la coagulation. Les agents antithrombotiques se répartissent ainsi traditionnellement en trois grands groupes : les antiagrégants plaquettaires, les agents fibrinolytiques et les anticoagulants. Les points suivants aborderont, d'une façon non exhaustive, les thérapies conventionnelles les plus couramment utilisées ainsi que les nouvelles thérapies en cours d'évaluation.

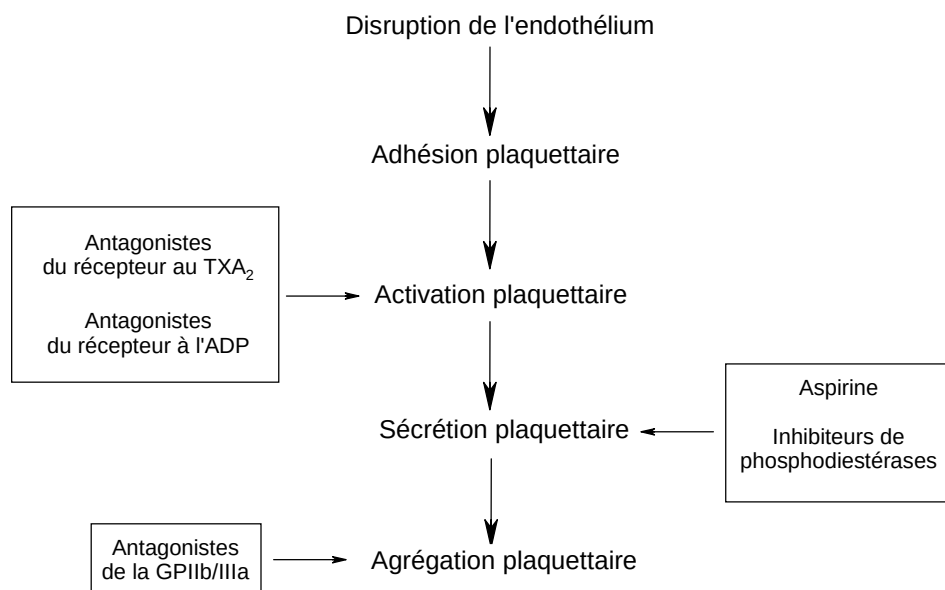


Figure 14 : Etapes ciblées par les agents antiplaquettaires

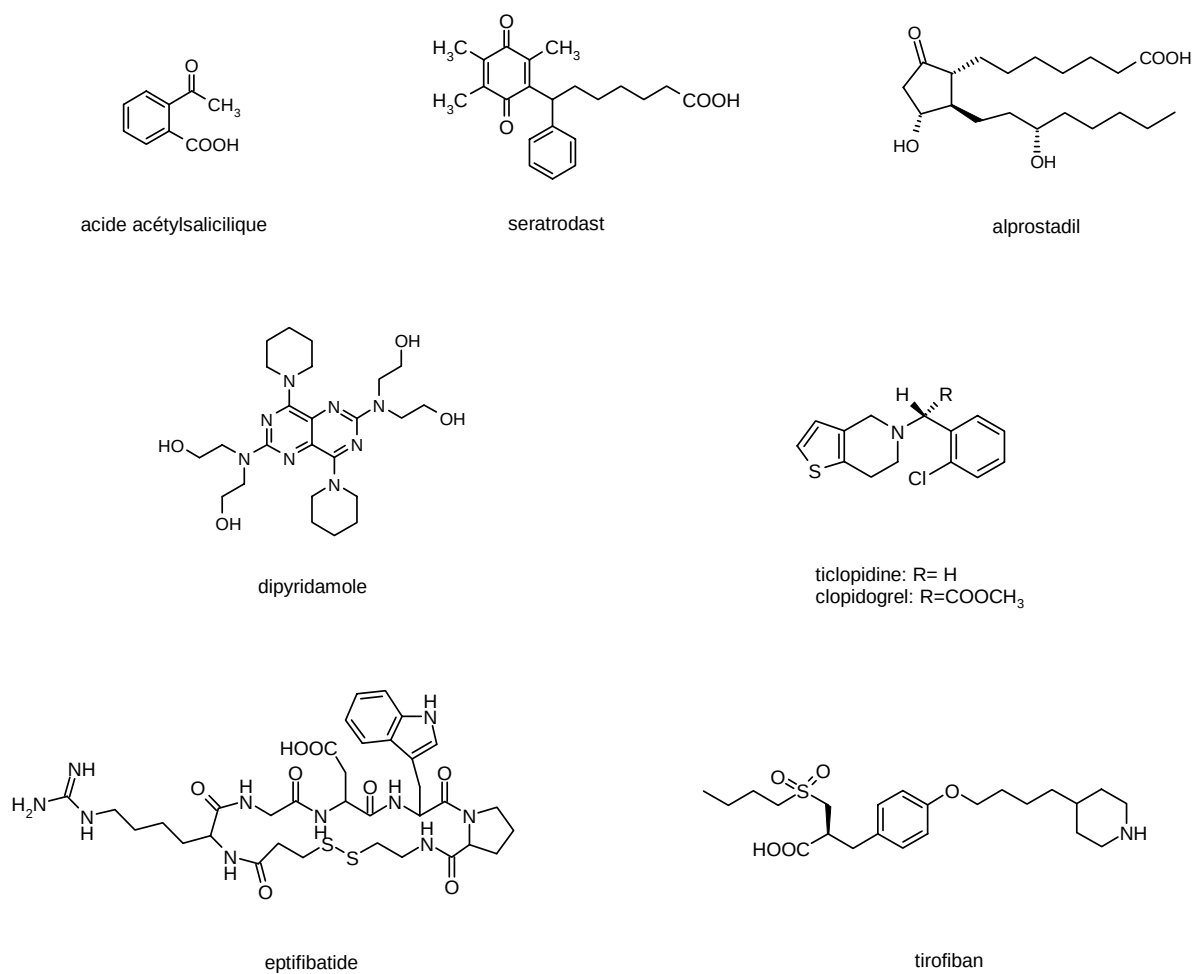


Figure 15 : Quelques antiagrégants plaquettaires

I.3.1. Thérapies conventionnelles

I.3.1.1. Les antiagrégants plaquettaires

De nombreux antiagrégants plaquettaires ont été développés afin d'interagir spécifiquement à différents niveaux dans les processus d'activation, de sécrétion et d'agrégation plaquettaires (Figure 14) [Cazenave, et al., 1998; Dogne, et al., 2002; Gonzalez, 1998; Majerus, et al., 1995]. Parmi ceux-ci, l'aspirine, ou acide acétylsalicylique, est l'agent antiplaquettaire le plus largement utilisé et servant souvent de composé de référence (Figure 15). En acétylant la cyclooxygénase, elle inhibe l'activation plaquettaire induite par le TXA₂. L'inhibition de l'activation plaquettaire est également visé par les inhibiteurs du récepteur plaquettaire au TXA₂ (seratrodast, Bronica[®]) et par les inhibiteurs de phosphodiesterases nucléotidiques (dipyridamole, Persantin[®]). Ceux-ci, en augmentant la concentration en adénosine monophosphate cyclique (AMPc), provoqueraient une inhibition de la phospholipase A₂, la première enzyme du métabolisme de l'acide arachidonique. Certaines prostaglandines et leurs analogues (alprostadil, Prostin[®]) jouent également sur la concentration en AMPc en activant l'adénylate cyclase membranaire. L'efficacité de ces médicaments reste toutefois limitée puisqu'ils ne bloquent pas l'activation plaquettaire induite par d'autres agonistes importants tels que la thrombine, le collagène ou encore l'ADP. L'action de ce dernier est ciblée par les thiénoypyridines (ticlopidine, Ticlid[®]; clopidogrel, Plavix[®]) qui modifient irréversiblement son récepteur plaquettaire. Il existe également des antagonistes du récepteur plaquettaire GP IIb-IIIa (abciximab, ReoPro[®]; eptifibatide, Integrilin[®]; tirofiban, Aggrastat[®]). Contrairement à la plupart des agents antiplaquettaires qui agissent sur une étape spécifique du métabolisme plaquettaire, ces derniers inhibent la voie finale commune de l'agrégation plaquettaire en empêchant la liaison du fibrinogène au récepteur GP IIb-IIIa.

I.3.1.2. Les agents fibrinolytiques

Les agents fibrinolytiques ou thrombolytiques tels que la streptokinase (Streptase[®]), l'urokinase (Urokinase[®], Actosolv[®]), la rétéplase (Rapilysin[®]), la ténecteplase (Metalyse[®]) et l'altéplase (Actilyse[®]) peuvent dissoudre les thrombi pathologiques récents. Ils sont utilisés uniquement en milieu hospitalier en cas d'infarctus du myocarde aigu, d'embolie pulmonaire grave et de thrombose veineuse profonde étendue. Ces traitements nécessitent une surveillance stricte du malade en raison du risque important d'hémorragie résultant d'un état lytique systémique. Celui-ci peut faire suite à la formation systémique de plasmine et produire une fibrinogénolyse généralisée et la destruction de facteurs de la coagulation, spécialement le FV et le FVIII [Bachmann, 1998; Majerus, et al., 1995].

I.3.1.3. Les anticoagulants

Les agents anticoagulants sont fréquemment utilisés dans la prévention et le traitement de la thrombose soit par administration d'anticoagulants d'action directe et rapide (les héparines), soit par administration d'anticoagulants d'action indirecte et retardée (les antagonistes de la vitamine K) [Bachmann, 1998; Majerus, et al., 1995]. Les points suivants décriront les substances actuellement disponibles sur le marché en mettant l'accent sur leur mécanisme d'action, leur efficacité, leurs effets secondaires et leurs limitations.

I.3.1.3.1. Les héparines

L'héparine est un glycosaminoglycane de 5 à 30 kilodaltons (kDa) hautement sulfaté présent dans les granules sécrétoires des mastocytes (Figure 16). Bien que la fonction physiologique de cette héparine endogène soit inconnue, un glycosaminoglycane apparenté, l'héparan sulfate

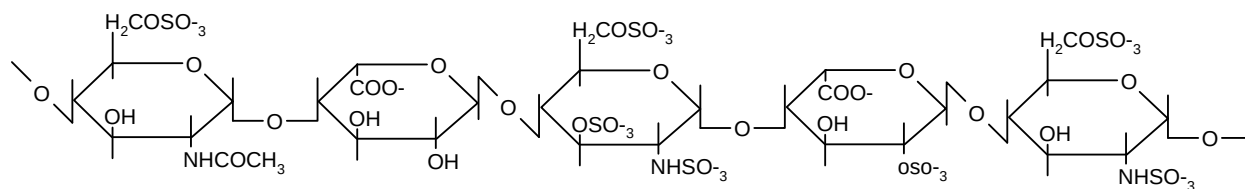


Figure 16 : Structure du site de liaison de l'héparine à l'AT III

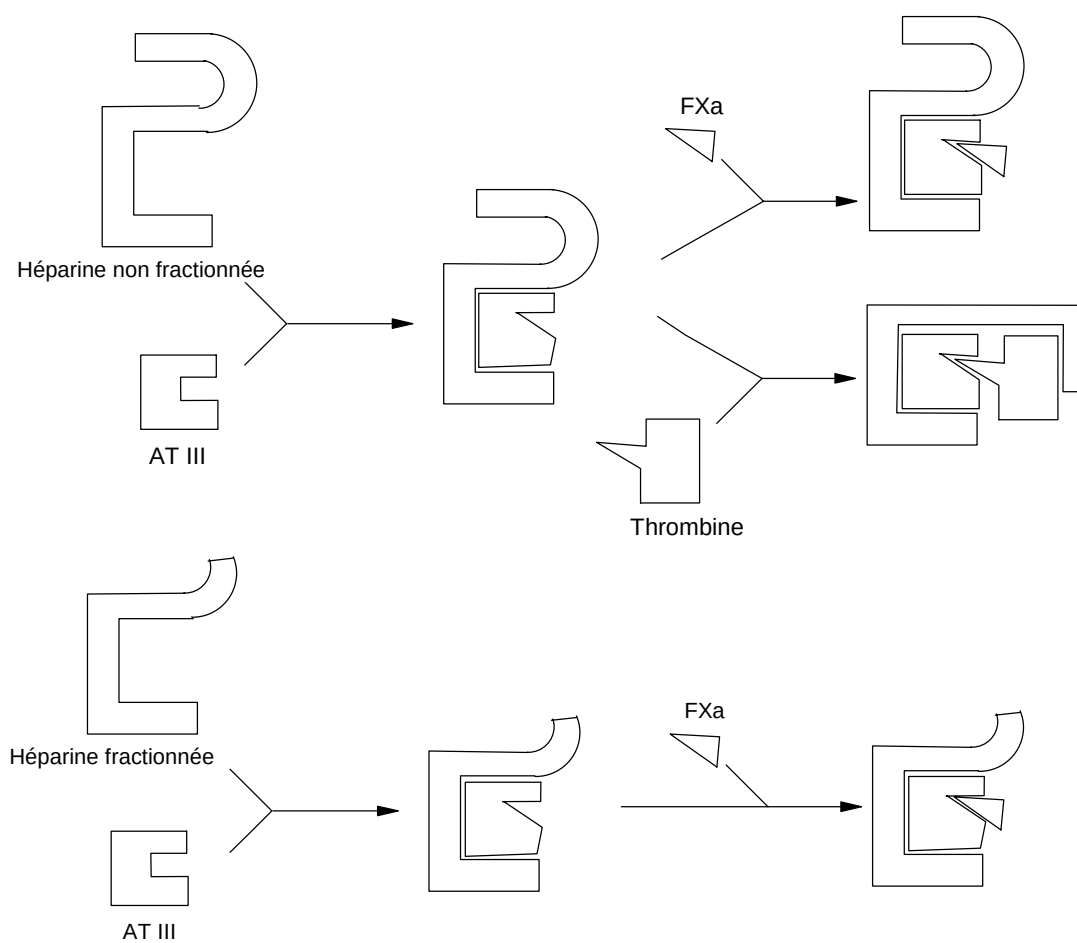


Figure 17 : Mode d'action de l'héparine

a quant à lui été reconnu pour exercer un mécanisme antithrombotique naturel en interagissant avec l'AT III circulante. Cet héparan sulfate est présent à la surface des cellules endothéliales et de la matrice extracellulaire [Bachmann, 1998; Majerus, et al., 1995].

L'effet anticoagulant de l'héparine est dû à sa liaison à l'AT III. En effet, l'héparine favorise la réaction entre l'AT III et la thrombine (ou le FXa) en servant d'intermédiaire catalytique. Cette liaison induit un changement conformationnel au niveau du site actif de l'AT III qui voit ainsi son action inhibitrice envers la thrombine et le FXa fortement augmentée.

L'effet pharmacodynamique des héparines dépend de la longueur des chaînes oligosaccharidiques. L'héparine dite non fractionnée (Héparine[®], Calparine[®]), largement utilisée en clinique, a un poids moléculaire moyen d'environ 15 kDa et catalyse principalement la réaction thrombine-AT III (Figure 17). Elle est utilisée dans le traitement et la prévention de l'embolie pulmonaire et de la thrombose veineuse profonde. Les héparines de faible poids moléculaire telles que l'énoxaparine (Clexane[®]), la nadroparine (Fraxiparine[®]), la tinzaparine (Innohep[®]) et la daltéparine (Fragmin[®]), obtenues par dépolymérisation chimique ou enzymatique de l'héparine non fractionnée, ont une longueur insuffisante pour catalyser l'inhibition de la thrombine mais produisent un effet anticoagulant à travers l'inhibition du FXa.

Malgré un effet anticoagulant puissant obtenu grâce aux héparines, il existe plusieurs inconvénients à leur utilisation. D'une manière générale, les héparines fractionnées ou non ont une faible activité envers la thrombine liée à la fibrine ainsi qu'envers le FXa lié aux plaquettes. Elles ne sont pas absorbées au niveau du tractus gastro-intestinal et doivent donc être administrées par voie parentérale.

L'héparine dite non fractionnée présente des profils pharmacocinétique et pharmacodynamique hétérogènes qui nécessitent une surveillance médicale stricte. Elle se lie en effet de façon non spécifique aux protéines plasmatiques, aux plaquettes ainsi qu'aux ostéoblastes et ostéoclastes. Ces liaisons limitent ainsi la quantité d'héparine pouvant interagir avec l'AT III mais provoquent également des effets secondaires importants. L'hémorragie, rencontrée chez 30 % des patients sous traitement, reste l'effet indésirable majeur. Une thrombocytopénie modérée et transitoire peut également s'observer chez environ 20 % des malades alors qu'une thrombocytopénie sévère se développe chez moins d'1 % de ceux-ci. Cette thrombopénie est souvent accompagnée d'une extension de la thrombose de base et est marquée par l'apparition d'occlusions thrombotiques artérielles aiguës. Il faut également noter que lorsque le traitement anticoagulant est stoppé, l'extension du thrombus est observée chez 29 à 47 % des patients traités à l'héparine pendant 5 à 14 jours. De plus, l'utilisation prolongée de l'héparine provoque le développement d'une ostéoporose chez plus d'un tiers des malades [Bachmann, 1998].

Les héparines de bas poids moléculaire, en raison d'une diminution des liaisons non spécifiques, présentent des profils pharmacocinétique et pharmacodynamique plus favorables et plus prédictibles. Elles nécessitent moins de surveillance médicale et présentent des risques plus faibles de thrombocytopénie et d'ostéoporose [Bachmann, 1998; Majerus, et al., 1995].

I.3.1.3.2. Les antagonistes de la vitamine K

Le FVII, le FIX, le FX, la thrombine et les protéines anticoagulantes C et S sont synthétisés principalement dans le foie. Ils sont biologiquement inactifs jusqu'à ce que les résidus glutamates aminotermiaux soient carboxylés. Les résidus γ -carboxyglutamates (Gla)

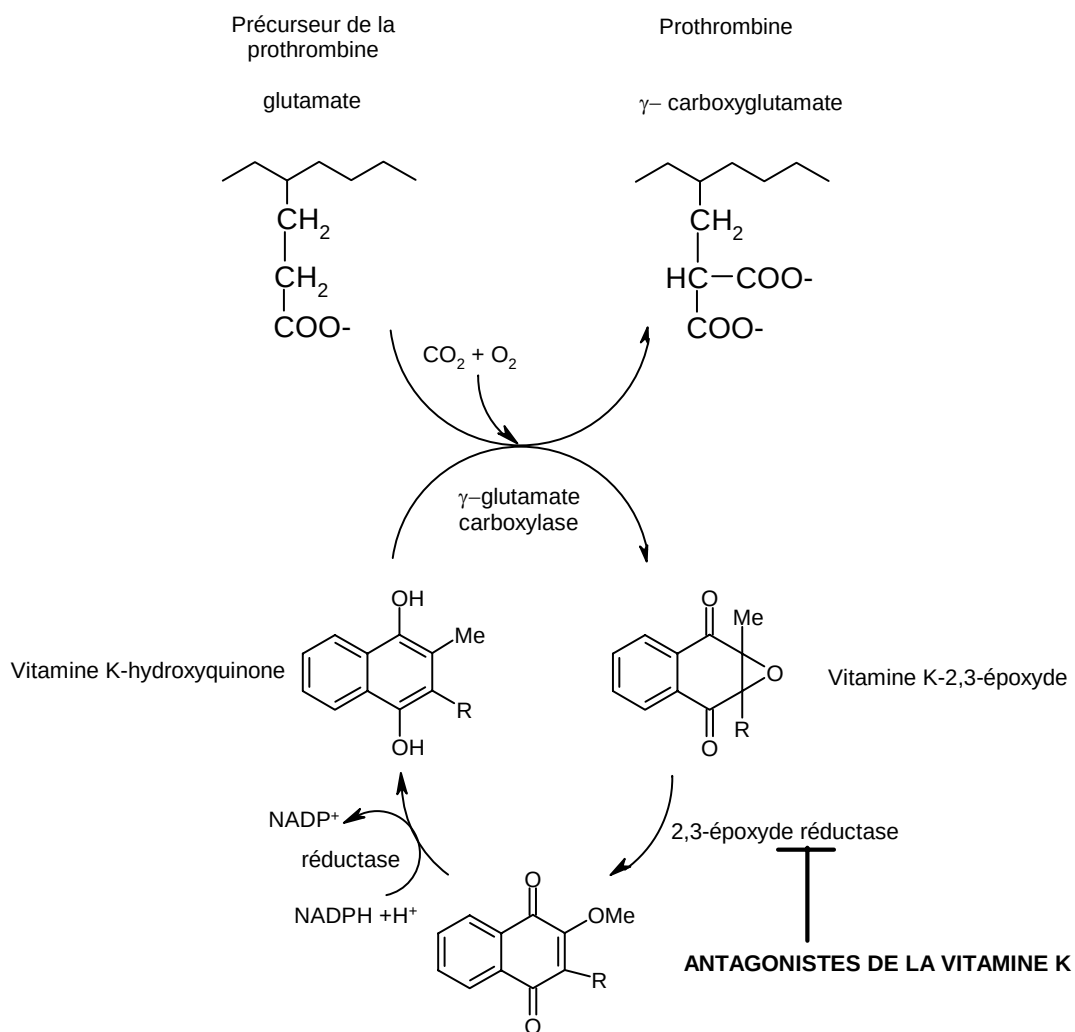


Figure 18 : Mode d'action des antagonistes de la vitamine K

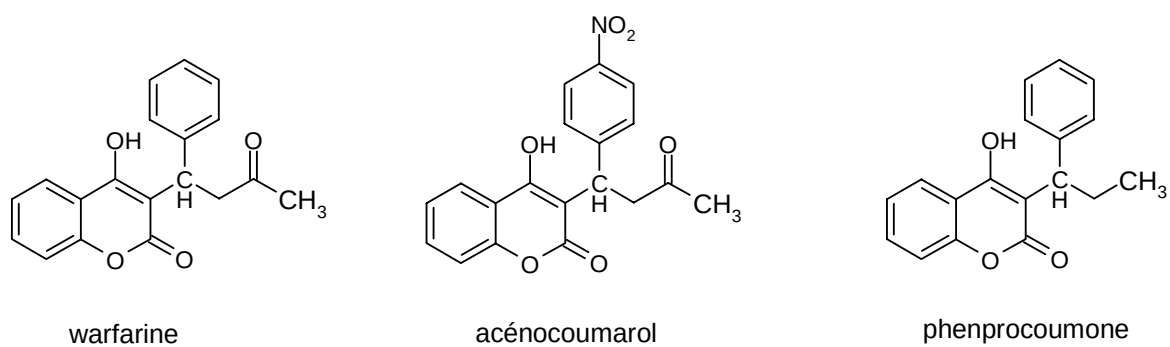


Figure 19 : Principales hydroxycoumarines utilisées comme agents anticoagulants

confèrent en effet à ces protéines des propriétés de liaison au Ca^{2+} qui sont essentielles pour leur assemblage en complexes catalytiques efficaces. Cette réaction nécessite, outre la forme précurseur de la protéine cible, du dioxyde de carbone (CO_2), de l'oxygène (O_2) et de la vitamine K réduite. En effet, la carboxylation du précurseur est directement liée à l'oxydation de la vitamine K en époxyde (Figure 18). La vitamine K réduite sous forme hydroxyquinone doit donc être continuellement régénérée à partir de l'époxyde pour permettre la carboxylation et la synthèse de protéines biologiquement compétentes. Bien que peu de détails soient connus sur les réductases spécifiques impliquées dans le recyclage de la vitamine K, les hydroxycoumarines telles que la warfarine (Marevan[®]), l'acénocoumarol (Sintrom[®]) et le phenprocoumone (Marcoumar[®]) (Figure 19) utilisées dans la prévention des maladies cardiovasculaires, bloquent leur action. Ces anticoagulants oraux n'ont pas d'effet sur les protéines déjà carboxylées présentes dans la circulation. Ainsi, le temps nécessaire pour que l'activité de chaque facteur dans le plasma atteigne un nouvel équilibre après l'initiation du traitement dépend du temps de demi-vie de chaque facteur. L'administration d'hydroxycoumarines induira donc dans un premier temps une baisse de la concentration plasmatique du FVII et de la protéine C, les deux protéines dont la demi-vie est la plus courte (5 à 6 heures). Il en résultera un état d'hypercoagulabilité latente puisque le FVII n'est que peu impliqué dans la coagulation du sang à l'intérieur des vaisseaux et que l'abaissement de la protéine C entraîne une diminution importante du potentiel anticoagulant du plasma. En règle générale, étant donné la longue demi-vie de certains facteurs, et en particulier celle de la thrombine (50 heures), le degré d'hypocoagulabilité désiré et l'effet antithrombotique ne seront atteints qu'après deux à trois jours de traitement [Bachmann, 1998; Majerus, et al., 1995].

L'action anticoagulante de tous les médicaments de type hydroxycoumarine est similaire mais ceux-ci se différencient principalement par leur puissance et leur durée d'action. Les doses thérapeutiques de ces composés entraînent une diminution de 30 à 50 % du taux de chaque facteur de la coagulation vitamine K-dépendant synthétisé par le foie. Il n'y a donc pas de sélectivité évidente de ces composés bien que le bénéfice antithrombotique mais aussi le risque hémorragique du traitement puissent être corrélés aux taux fonctionnels de prothrombine et, à un moindre degré, au taux de FX.

Comme pour les héparines, l'effet indésirable le plus fréquemment observé avec ces anticoagulants oraux est l'hémorragie. Leur administration demande une surveillance particulière en raison du nombre élevé de facteurs pouvant modifier leur action. Tout d'abord, une modification de l'apport en vitamine K suite à un changement de régime alimentaire peut fortement influencer les besoins en hydroxycoumarines. Ensuite, les affections hépatiques peuvent dans certains cas perturber la synthèse des précurseurs de la coagulation et potentialiser l'action de ces coumarines. Il en est de même pour les situations d'hypermétabolisme qui augmentent le catabolisme des facteurs de la coagulation. Enfin, un des problèmes majeurs rencontrés avec ces composés provient de l'existence de très nombreuses interactions médicamenteuses [Bachmann, 1998; Majerus, et al., 1995].

I.3.2. Nouvelles approches antithrombotiques

À côté de ces thérapies conventionnelles couramment utilisées, de nouvelles approches pour le traitement de la thrombose sont constamment évaluées dans le but de fournir des médicaments plus efficaces, plus sûrs et comportant moins de limitations d'utilisation.

Les nouveaux agents antiplaquettaires, en cours d'investigation, tentent d'empêcher les interactions GP Ib-IX/vWF, $\alpha_2\beta_1$ /collagène, GP VI/collagène mais aussi l'activation

Tableau 1: Les différentes classes d'endopeptidases : exemples, fonctions physiologiques et implications pathologiques

Classes	Enzymes	Fonctions	Pathologies
Endopeptidases à sérine	C3 et C5 convertases	Activation du système du complément	Inflammation
	Élastase leucocytaire	Dégradation des protéines des tissus conjonctifs	Inflammation, maladies pulmonaires
	Tryptase	Phagocytose	Asthme
Endopeptidases à cystéine	Cathepsines K et L	Résorption des os	Ostéoporose
	Caspase-1	Production d'Il-1	Inflammation
	Calpaïnes	Fonctions inconnues	Maladie d'Alzheimer, dystrophie musculaire, cataracte, arthrite
Endopeptidases à acides aspartiques	Protéase HIV-1	Réplication du HIV	SIDA
	Rénine	Production d'angiotensine I	Hypertension
	Cathepsine D	Turnover protéique	Cancer, maladie d'Alzheimer
Métallopeptidases	ACE	Production d'angiotensine II	Hypertension
	Endopeptidase neutre	Libération d'ANP	Hypertension
	Métalloprotéases de matrice	Reconstruction de la matrice cellulaire	Inflammation, cancer, dystrophie musculaire

Il-1 : interleukine-1 ; HIV : virus d'immunodéficience humaine ; SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise ; ACE : enzyme de conversion de l'angiotensinogène ; ANP : peptide natriurétique atrial

plaquettaire induite par la thrombine impliquant les récepteurs PAR1 et PAR4. D'autres approches pour l'inhibition de la fonction plaquettaire se focalisent sur la conception d'agents donneurs de NO et d'antagonistes directs sélectifs des différentes isoformes du récepteur plaquettaire à l'ADP [Bhatt & Topol, 2003; Gresele & Agnelli, 2002].

Le développement de nouveaux agents anticoagulants s'oriente vers la production de facteurs et de cofacteurs anticoagulants endogènes recombinants tels que la protéine C activée (Ceprotin® ; drotrécogine alfa, Xigris®) et la thrombomoduline. De nombreuses recherches en cours visent également la conception d'inhibiteurs puissants et sélectifs de facteurs de la coagulation, et en particulier, de la thrombine, du FXa et du FVIIa [Gresele & Agnelli, 2002; Hirsh & Weitz, 1999]. Ces composés seront présentés ultérieurement (voir section I.4.5).

Cette dernière approche, adoptée dans ce travail, nécessite une bonne connaissance des facteurs de la coagulation mais aussi, d'une façon plus générale, des protéases à sérine. Le point suivant donnera tout d'abord une vue d'ensemble sur les différents types de protéases et leur intérêt thérapeutique. Ensuite, les protéases à sérine seront abordées plus précisément au point de vue de leur structure et de leur mécanisme d'action. Enfin, les enzymes clés de la cascade de la coagulation étudiées dans ce travail et constituant des cibles attractives pour le développement d'agents antithrombotiques seront détaillées en mettant l'accent sur leur structure, leur mécanisme d'action, leur importance physiopathologique et leurs principaux inhibiteurs.

I.4. Les protéases à sérine

I.4.1. Introduction

Les protéases ou enzymes protéolytiques forment un des groupes d'enzymes les plus grands et les plus importants. En catalysant sélectivement l'hydrolyse de liens peptidiques, elles participent à de nombreux processus physiologiques essentiels tels que le « turnover » des protéines, la digestion, la coagulation sanguine, la réparation de lésion, la fertilisation, la croissance, la différenciation cellulaire, la transduction du signal, la réponse immune et l'apoptose. Une protéolyse incontrôlée, non régulée et indésirable peut mener à divers états pathologiques tels que l'emphysème pulmonaire, les infections virales, le cancer, la maladie d'Alzheimer, l'inflammation, l'arthrite rhumatoïde... Les inhibiteurs de protéases présentent donc une utilité potentielle considérable pour l'intervention thérapeutique dans de nombreuses pathologies [Powers, et al., 2002].

I.4.2. Classification des protéases

Les protéases, ou peptidases, sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques (classe 3.4 selon le « Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology » [IUBMB, 1992]). Celles-ci sont subdivisées en exopeptidases (classe 3.4.11-19) qui agissent uniquement au niveau d'une terminaison d'une chaîne polypeptidique et en endopeptidases (classes 3.4.21-24 et 3.4.99) qui agissent quant à elles au sein même de cet enchaînement peptidique.

Les endopeptidases sont classées en différents sous-groupes selon leur mécanisme catalytique. Parmi celles-ci se trouvent, les endopeptidases à sérine (classe 3.4.21), à cystéine (classe 3.4.22), à acides aspartiques (classe 3.4.23), à thréonine (classe 3.4.25) et les métalloendopeptidases (classe 3.4.24). Les endopeptidases qui ne peuvent être rangées dans aucune de ces sous-classes sont incluses dans la classe 3.4.99. Les différentes enzymes

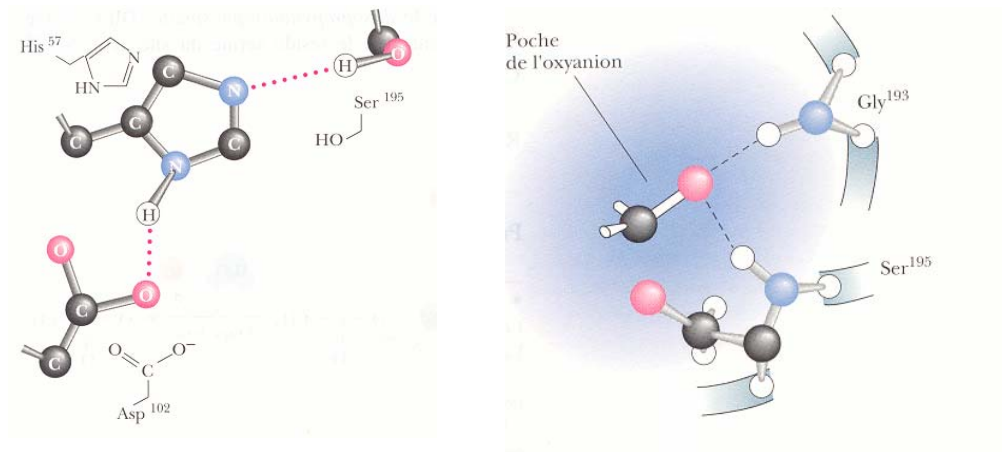


Figure 20 : Triade catalytique (à gauche) et poche oxyanionique (à droite) de la chymotrypsine [Garrett & Grisham, 2000]

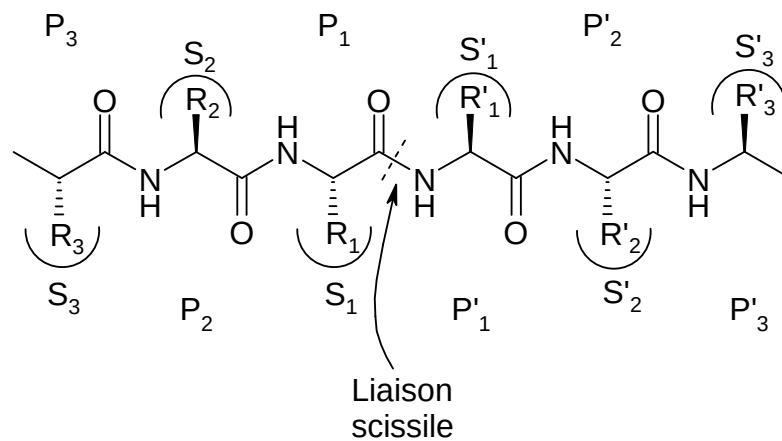


Figure 21: Domaine de reconnaissance du substrat selon Schechter et Berger

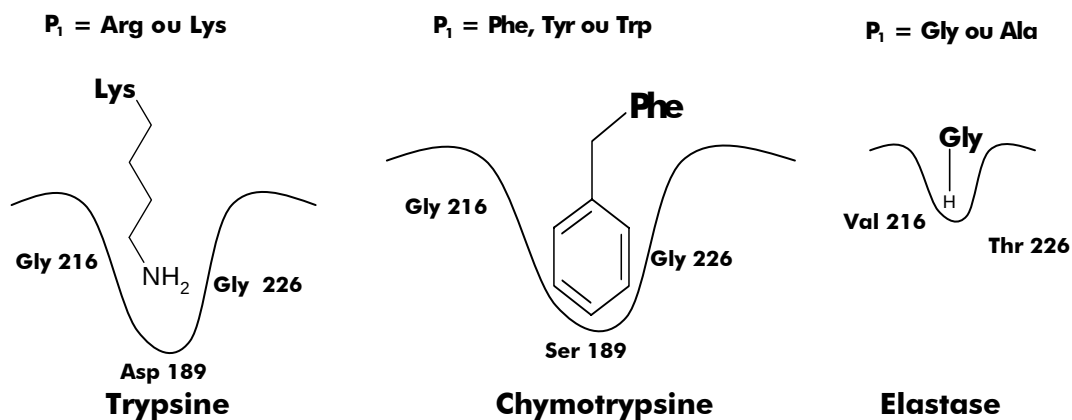


Figure 22 : Spécificité primaire des protéases à sérine

étudiées dans ce mémoire appartiennent à la classe des endopeptidases à sérine (classe 3.4.21) et sont désignées sous le terme de protéases à sérine. Le Tableau 1 reprend les différentes classes de protéases ainsi que quelques exemples d'enzymes avec leurs fonctions physiologiques et leurs implications pathologiques [Leung, et al., 2000].

I.4.3. Structure des protéases à sérine

Par facilité, la structure des protéases à sérine est généralement divisée en trois domaines principaux : le domaine catalytique, le domaine de reconnaissance du substrat et le domaine d'activation du zymogène. Cependant, cette organisation considère que les processus de catalyse, de reconnaissance du substrat et d'activation du zymogène sont des processus indépendants, alors qu'ils mettent en jeu des caractéristiques structurales communes de l'enzyme et qu'ils sont intimement liés.

La chymotrypsine représente la protéase à sérine la plus étudiée et la mieux connue à ce jour. Elle sert généralement d'enzyme de référence bien qu'elle ne soit pas une cible attractive pour le développement de nouveaux médicaments, puisqu'elle n'intervient de façon majeure dans aucune pathologie (excepté la pancréatite aiguë pour laquelle d'autres traitements sont préférés). Les résidus enzymatiques seront donc désignés dans les paragraphes suivants selon la notation du chymotrypsinogène, sauf mention contraire.

I.4.3.1. Le domaine catalytique

Le site actif de toutes les protéases à sérine comprend une triade catalytique formée par l'Asp102, l'His57 et la Ser195. Ces trois acides aminés forment entre eux un réseau de liaisons hydrogènes. Le résidu aspartate, noyé dans un environnement très hydrophobe (Ala55, Cys58 et Ile99), entre en liaison avec l'histidine elle-même liée à la sérine (Figure 20, à gauche). Le domaine catalytique comprend également un « trou oxyanionique » formé par les groupements NH du squelette principal de la Gly193 et de la Ser195. Ces acides aminés forment ainsi une poche de charge positive qui stabilise l'oxyanion des intermédiaires tétraédriques formés lors de la réaction d'hydrolyse (voir section I.4.4) (Figure 20, à droite) [Garrett & Grisham, 2000; Hedstrom, 2002].

I.4.3.2. Le domaine de reconnaissance du substrat

Les protéases à sérine sont des enzymes très abondantes qui régulent finement de nombreux processus physiologiques importants. Afin de pouvoir exercer correctement cette régulation, elles ont besoin d'une grande spécificité vis-à-vis de leur(s) substrat(s). Ainsi, le domaine de reconnaissance du substrat comprend à la fois le site de liaison du polypeptide et les poches de liaison pour les chaînes latérales du substrat [Hedstrom, 2002]. Une façon commode de décrire ces interactions est de diviser l'ensemble des acides aminés de l'enzyme au contact du substrat en différents sous-sites, chaque sous-site correspondant à la région qui interagit avec un résidu du substrat. Par convention, les résidus du substrat sont notés $P_1, P_2 \dots P_n$ de la liaison scissile vers le côté acyle du complexe enzyme-substrat et $P'_1, P'_2 \dots P'_n$ de la liaison scissile vers le groupe partant du substrat. Les sous-sites correspondants de l'enzyme sont numérotés $S_1, S_2 \dots S_n$ de la liaison scissile vers l'extrémité N-terminale et $S'_1, S'_2 \dots S'_n$ de la liaison scissile vers l'extrémité C-terminale (Figure 21) [Schechter & Berger, 1967].

I.4.3.2.1. Le site S_1

La spécificité primaire des protéases à sérine est liée à la configuration de la poche S_1 adjacente à la Ser195. Cette poche est constituée des résidus 189-192, 214-216 et 224-228. En se focalisant sur la nature des résidus 189, 216 et 226, les protéases à sérine peuvent être

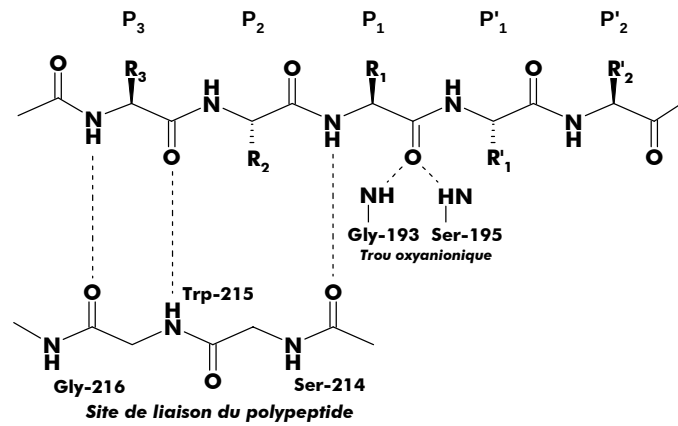


Figure 23: Site de liaison du polypeptide de la chymotrypsine

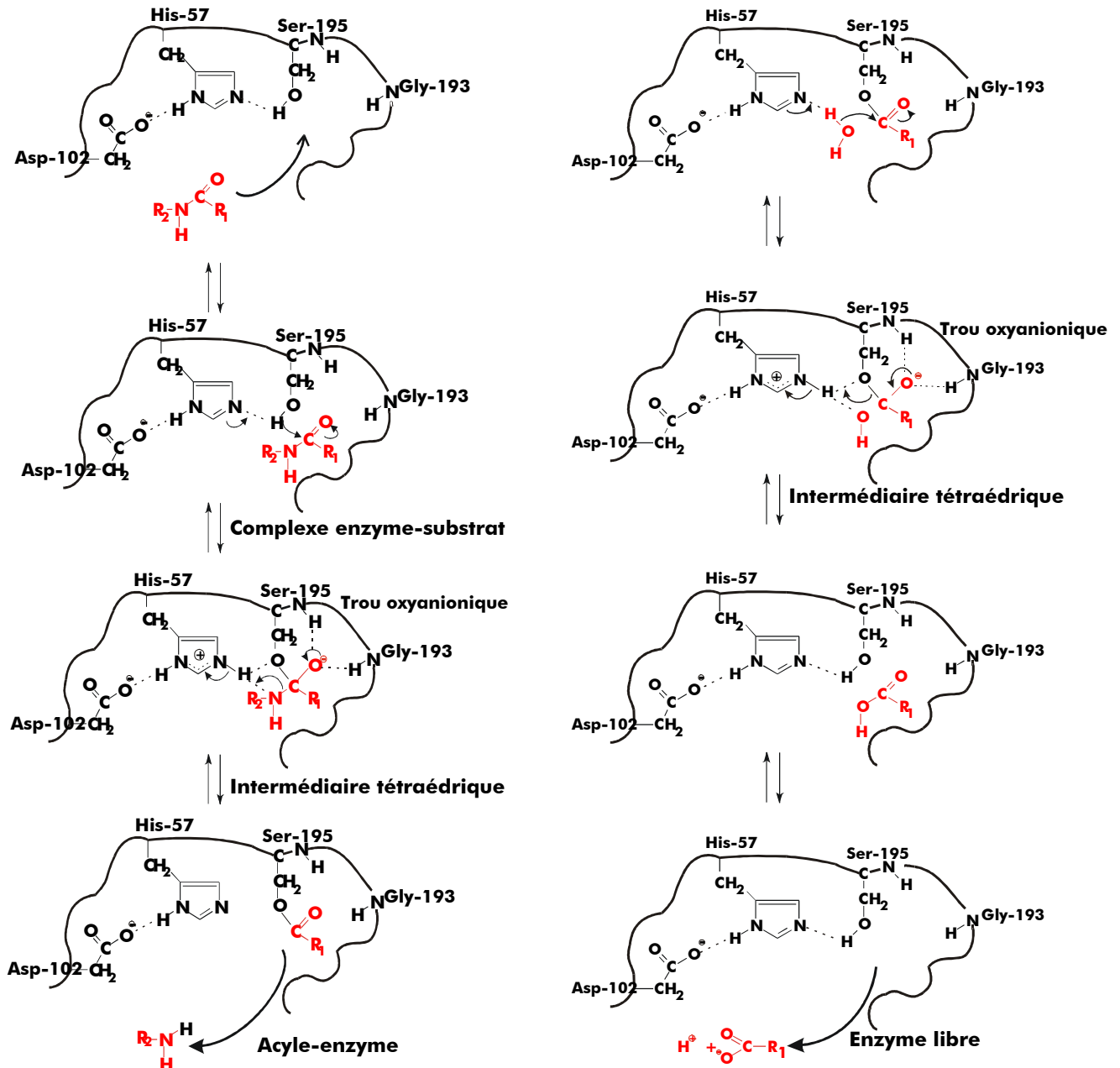


Figure 24 : Mécanisme d'action des protéases à sérine :

acylation de l'enzyme (à gauche) suivie de sa désacylation (à droite)

classées en trois grandes familles : les protéases de spécificité trypsique, chymotrypsique et élastasique (Figure 22). Les protéases de spécificité trypsique hydrolysent préférentiellement un substrat possédant au site P_1 un acide aminé chargé positivement (lysine ou arginine). Cette sélectivité est due à la présence au niveau de la poche de spécificité S_1 d'un aspartate (Asp189) pouvant former une interaction ionique avec une fonction chargée positivement du substrat (ammonium pour la lysine ou guanidinium pour l'arginine). Outre la trypsine, ce groupe d'enzymes comprend également la thrombine, le facteur Xa ou encore la plasmine. Les protéases à sérine de spécificité chymotrypsique (α -chymotrypsine, chymosine et cathepsine G) agissent au niveau de résidus hydrophobes encombrants tels que la phénylalanine, la tyrosine ou le tryptophane. La chaîne latérale de ces résidus aromatiques peut en effet se fixer au niveau d'une poche hydrophobe définie par deux glycines (Gly216 et Gly226) du site S_1 . Enfin, les protéases de spécificité élastasique voient ces deux glycines remplacées par une valine (Val216) et une thréonine (Thr226) qui limitent ainsi l'accès au site de liaison S_1 à des petits résidus neutres tels que la glycine et l'alanine. L'élastase leucocytaire et l'élastase pancréatique font partie de ce groupe [Fersht, 1984]. Par ailleurs, les interactions entre la protéase et le substrat s'étendent au-delà du site S_1 en impliquant le site de liaison du polypeptide mais aussi, souvent, des poches de liaison supplémentaires.

I.4.3.2.2. Le site de liaison du polypeptide

Le site de liaison du polypeptide se compose des résidus 214 à 216 de l'enzyme et forme un plan β anti-parallèle avec les acides aminés P_1 à P_3 du substrat peptidique. Dans la chymotrypsine, il existe des liaisons hydrogènes entre le groupement CO de la Ser214, le groupement NH du Trp215 et le groupement CO de la Gly216 de l'enzyme et le groupement NH du résidu P_1 , le groupement CO du résidu P_3 et le groupement NH du résidu P_3 du substrat respectivement (Figure 23) [Hedstrom, 2002].

I.4.3.2.3. Les sites S_2 - S_n et S'_1 - S'_n

Les sites S_2 et S_3 de la chymotrypsine sont peu discriminants face au substrat. Le site S_2 est un sillon hydrophobe accueillant la chaîne latérale hydrophobe du résidu P_2 , tandis que le site S_3 est peu spécifique et peut même accueillir des acides aminés D. Chez d'autres protéases, les sites S_2 - S_n sont les déterminants majeurs de la spécificité avec des poches beaucoup mieux définies. C'est le cas par exemple pour l'élastase où l'interaction S_3/P_3 est dominante. Quant aux interactions du groupe partant, ou résidus P'_1 - P'_n , avec les sites S'_1 - S'_n de l'enzyme, elles n'ont pas encore été définies pour la plupart des enzymes [Hedstrom, 2002].

I.4.3.3. Le domaine d'activation du zymogène

Les enzymes protéolytiques sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, ou zymogènes, pour prévenir une activité enzymatique indésirable et permettre une régulation spatio-temporelle de la protéolyse. La conversion du zymogène en enzyme active se produit généralement par protéolyse limitée d'un « segment d'activation inhibiteur » au niveau du compartiment subcellulaire ou du milieu extracellulaire dans lequel l'enzyme exerce sa fonction biologique. Cette conversion peut impliquer des cofacteurs, ou au contraire, le processus peut être autocatalytique et ne nécessiter aucun facteur additionnel autre qu'une chute de pH. C'est le cas par exemple pour le pepsinogène activé en pepsine au niveau de l'estomac. Beaucoup de zymogènes comprennent également des extensions N-terminales de l'enzyme mature, ou prosegments, qui empêchent l'entrée du substrat dans le site actif.

Les mécanismes d'inhibition utilisés par les segments d'activation sont fort divers, mais les zymogènes partagent la caractéristique commune de comprendre une « machinerie catalytique

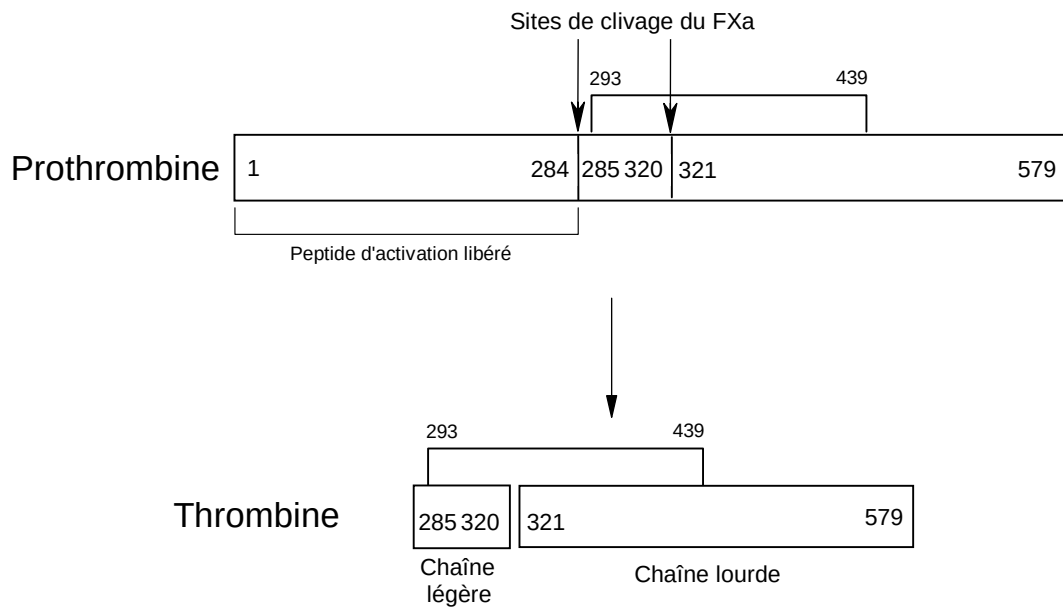


Figure 25 : Conversion de la prothrombine en thrombine

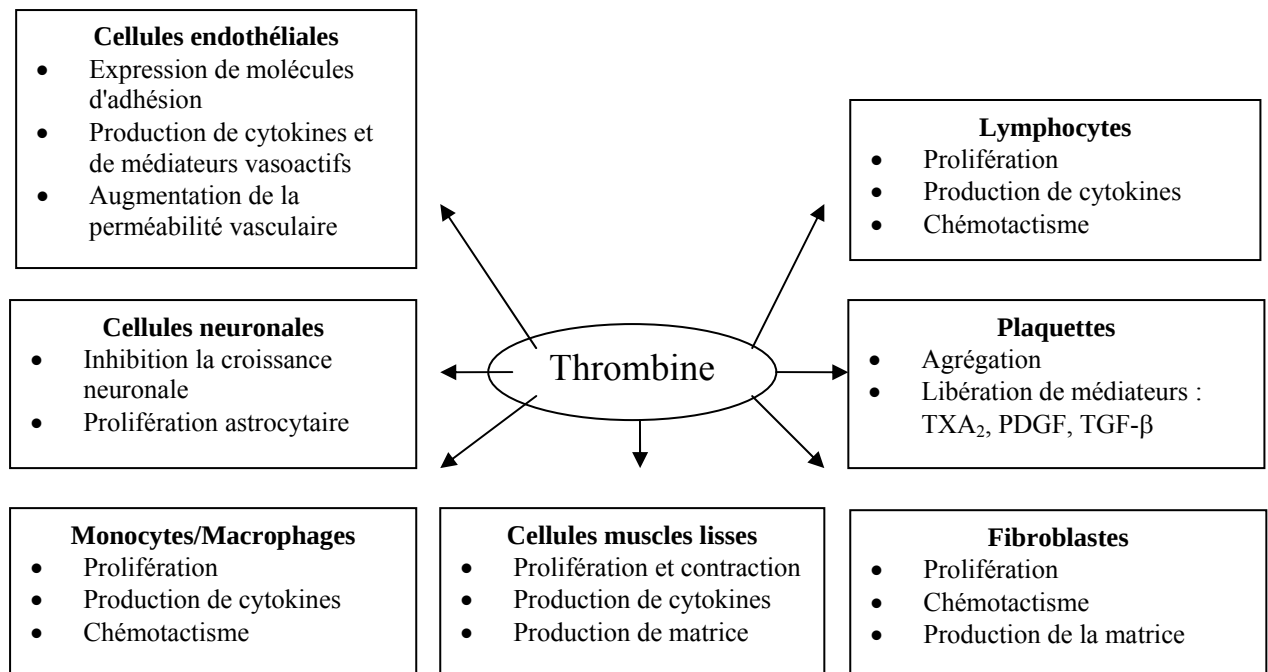


Figure 26 : Effets cellulaires de la thrombine

préformée », c'est-à-dire que tous les aspects du site actif nécessaires au clivage de liens peptidiques sont déjà présents. Par exemple, la position et la conformation des triades catalytiques des zymogènes sont pratiquement identiques à celles de leurs formes actives. Les processus d'activation impliquent ainsi plutôt des changements conformationnels importants au niveau de régions adjacentes au site actif et/ou une hydrolyse des segments d'activation. La nouvelle conformation adoptée par l'enzyme lui permet alors de lier le substrat et d'exercer son action protéolytique [Khan & James, 1998].

I.4.4. Mécanisme d'action des protéases à sérine

La réaction d'hydrolyse d'un substrat peptidique par une protéase à sérine comprend deux étapes principales, l'acylation et la désacylation impliquant un intermédiaire acyle-enzyme (Figure 24). Tout d'abord, il y a formation d'un complexe enzyme-substrat dans lequel le carbonyle de la liaison scissile est placé à proximité de la sérine réactive. Ensuite, lors de la réaction d'acylation, l'hydroxyle de la Ser195 attaque le carbonyle de la liaison scissile du substrat peptidique, avec l'aide de l'His57 agissant comme une base, pour former un intermédiaire tétraédrique. A ce moment, l'His57 chargée positivement est stabilisée par un pont hydrogène avec l'Asp102, tandis que l'oxyanion de l'intermédiaire tétraédrique est stabilisé par les groupements NH du squelette principal de la Gly193 et de la Ser195 du trou oxyanionique. L'His57 agit alors comme un acide afin de rompre la liaison peptidique. Il y a libération d'un groupement amine partant et formation de l'acyle-enzyme grâce à la liaison du groupement carboxyle de la chaîne polypeptidique. Dès lors, le site actif est accessible à une molécule d'eau. Celle-ci, avec l'aide de l'His57 agissant comme une base, peut attaquer le carbonyle du groupement acyle, pour former un deuxième intermédiaire tétraédrique, également stabilisé par le trou oxyanionique. L'His57 agit alors comme un acide afin de décomposer l'intermédiaire tétraédrique, ce qui libère un groupement carboxylate. Celui-ci, en quittant le site actif de l'enzyme, le laisse libre pour un nouvel acte catalytique [Fersht, 1984; Hedstrom, 2002].

I.4.5. Enzymes clés de la cascade de la coagulation

I.4.5.1. La thrombine

I.4.5.1.1. Structure et mécanisme d'action

La thrombine appartient à la famille des protéases à sérine de spécificité trypsique. Sa triade catalytique Ser525-His363-Asp419 (selon la notation de la prothrombine) comporte une géométrie pratiquement identique à celle des autres membres de la famille des protéases à sérine de spécificité trypsique. Sa poche de spécificité S_1 , plus large et moins polaire que celle de la trypsine, reconnaît préférentiellement la chaîne latérale de l'arginine qui peut former un pont salin avec l'Asp-519. Les sous-sites S_2 et S_3 sont hydrophobes. Le site S_2 , est étroit et accueille généralement une proline ou des petits résidus hydrophobes, tandis que le site S_3 est plus large et peut interagir avec des résidus plus grands tels que la phénylalanine. Le site S'_1 , par sa petite taille, accommode particulièrement les petits résidus au site P'_1 tels que la glycine, l'alanine ou la sérine [Leung, et al., 2000; Stubbs & Bode, 1995]. Cette spécificité permet à la thrombine de cliver les liens Arg-Gly des chaînes $A\alpha$ et $B\beta$ du fibrinogène, libérant ainsi les fibrinopeptides A et B des extrémités N-terminales. Mais, elle lui permet également d'interagir avec une large gamme de protéines telles que les récepteurs plaquettaires à la thrombine, la thrombomoduline, la protéine C... L'activation de la thrombine est réalisée à partir d'un zymogène, la prothrombine. Celle-ci est clivée par le facteur Xa entre l'Arg284 et la Thr285 ainsi qu'entre l'Arg320 et l'Ile321 (Figure 25). Cette

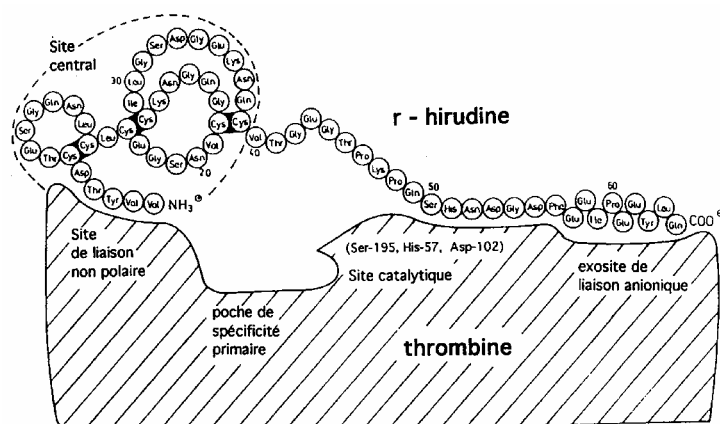


Figure 27 : Hirudine : structure peptidique et mode d'action [Bachmann, 1998]

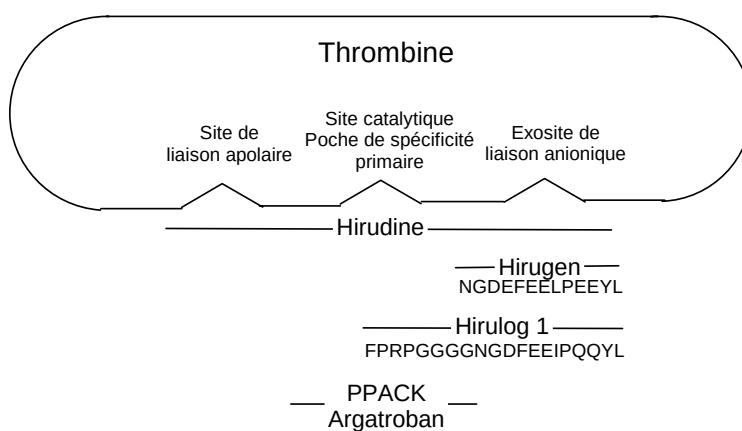


Figure 28 : Mode d'action des dérivés de l'hirudine

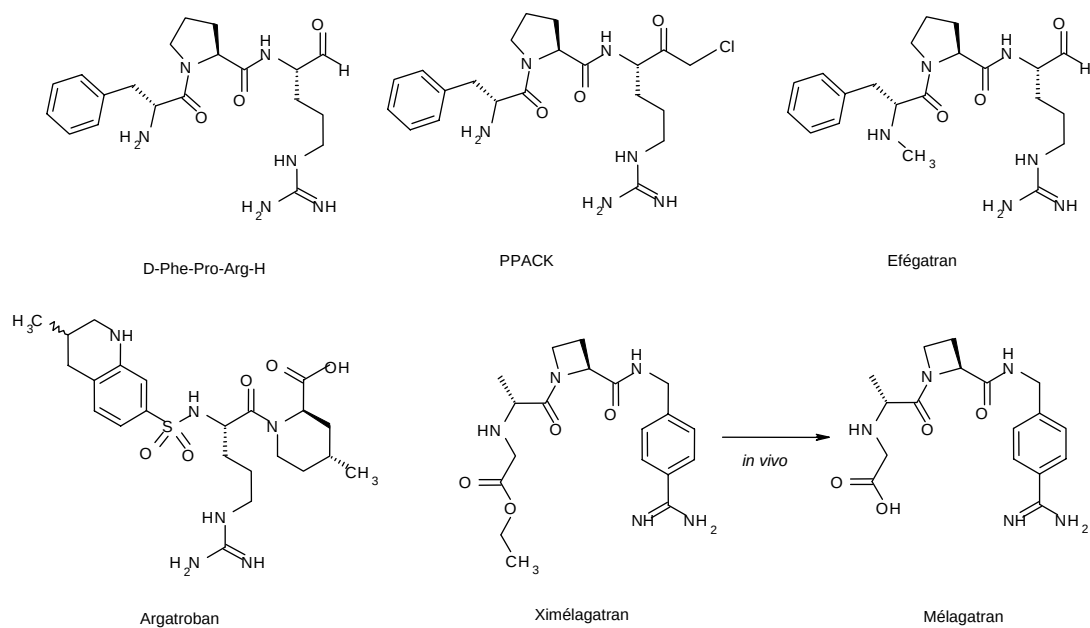


Figure 29: Principaux inhibiteurs de thrombine

protéolyse limitée expose un groupement NH_3^+ au niveau l'Ile321 de la nouvelle extrémité N-terminale, qui forme alors un pont salin avec l'Asp524. Cette interaction induit un changement conformationnel qui permet de former le site S_1 et le trou oxyanionique de la protéase active [Rabiet, et al., 1986]. Ce processus aboutit à la formation d'une chaîne légère de 36 acides aminés et d'une chaîne lourde de 259 acides aminés, comprenant le domaine catalytique. Ces chaînes sont reliées entre elles par un pont disulfure Cys293-Cys439.

I.4.5.1.2. Rôles physiopathologiques

La thrombine, grâce à ses fonctions multiples, joue un rôle clé dans la thrombogenèse. Elle est à la fois le médiateur central la cascade de la coagulation et un puissant agoniste de l'activation plaquettaire (voir sections I.1.2.2.3 et I.2). De plus, la thrombine, en exerçant de nombreux effets cellulaires (Figure 26), serait impliquée dans le développement de certaines maladies inflammatoires (arthrite rhumatoïde, glomérulonéphrite, syndrome de détresse respiratoire), fibrotiques (fibrose pulmonaire), neurodégénératives (maladie d'Alzheimer) et cancéreuses (mélanome et carcinome hépatique) [Goldsack, et al., 1998]. Dès lors, le rôle central joué par la thrombine dans la thrombose, ainsi que son influence potentielle dans d'autres états pathologiques, en fait un candidat attractif pour le développement d'inhibiteurs directs et sélectifs.

I.4.5.1.3. Principaux inhibiteurs

L'hirudine, polypeptide de 65 acides aminés isolé des glandes salivaires de la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis*, est actuellement l'inhibiteur naturel direct de thrombine le plus puissant ($K_I = 10^{-12}$ M). Sa haute affinité pour la thrombine est due à la multiplicité de ses sites d'interaction. Sa partie C-terminale contient plusieurs résidus chargés négativement qui se lient étroitement à l'exosite de liaison anionique de la thrombine tandis que sa partie N-terminale couvre l'entrée de la poche catalytique via des interactions hydrophobes avec le site de liaison apolaire. Il existe également un segment Pro46-Lys47-Pro48 interagissant avec la poche basique de spécificité primaire (Figure 27). De plus, en tant qu'inhibiteur direct de la thrombine, l'hirudine peut neutraliser celle-ci aussi bien sous sa forme libre circulante que sous sa forme liée à la fibrine. Il en résulte une diminution de l'activation des plaquettes et de la croissance du thrombus. Deux dérivés de l'hirudine, la lépirudine (Refludan®) et la désirudine (Revasc®) produites par génie génétique, sont actuellement commercialisés comme anticoagulant injectable chez les patients présentant une thrombocytopénie induite par l'héparine ainsi que pour la prévention des complications thrombo-emboliques veineuses après chirurgie orthopédique. Ces médicaments sont réservés à l'usage hospitalier [Bachmann, 1998; Freedman & Loscalzo, 2003].

Différents peptides dérivés de l'hirudine ont été développés (Figure 28). L'hirugen est un dodécapeptide monosulfaté de la région C-terminale de l'hirudine. Celui-ci se lie à l'exosite de liaison anionique de la thrombine et inhibe le clivage du fibrinogène médié par celle-ci. Les hirulogs contiennent la séquence C-terminale de l'hirudine et un fragment D-Phe-Pro-Arg qui interagit avec le site catalytique de la thrombine. L'hirulog-1 (bivalirudine, Angiomax®) est indiqué comme anticoagulant chez les patients présentant une angine instable et subissant une angioplastie coronaire transluminale percutanée. Cependant, la nature peptidique de ce composé ne permet pas un usage oral et donc une utilisation chronique ambulatoire [Freedman & Loscalzo, 2003; Steinmetzer, et al., 2001].

Le peptide D-Phe-Pro-Arg a été à la base du développement d'inhibiteurs agissant au niveau du site actif de la thrombine (Figure 29). L'aldéhyde de D-Phe-Pro-Arg-H et la D-Phe-Pro-Arg-chlorométhylcétone (PPACK) ont été les premiers inhibiteurs synthétiques de thrombine.

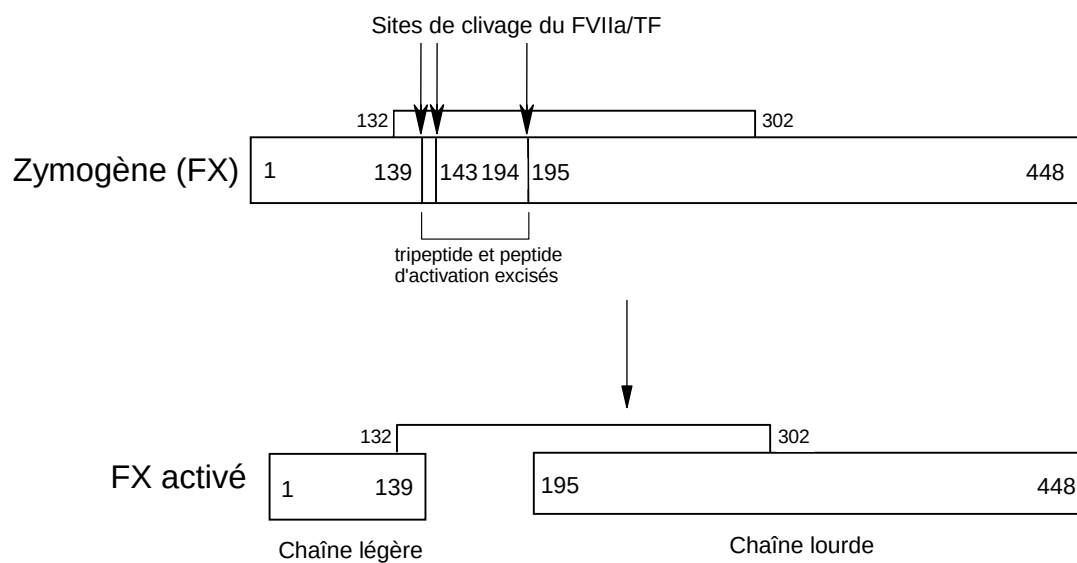


Figure 30 : Conversion du FX en FXa

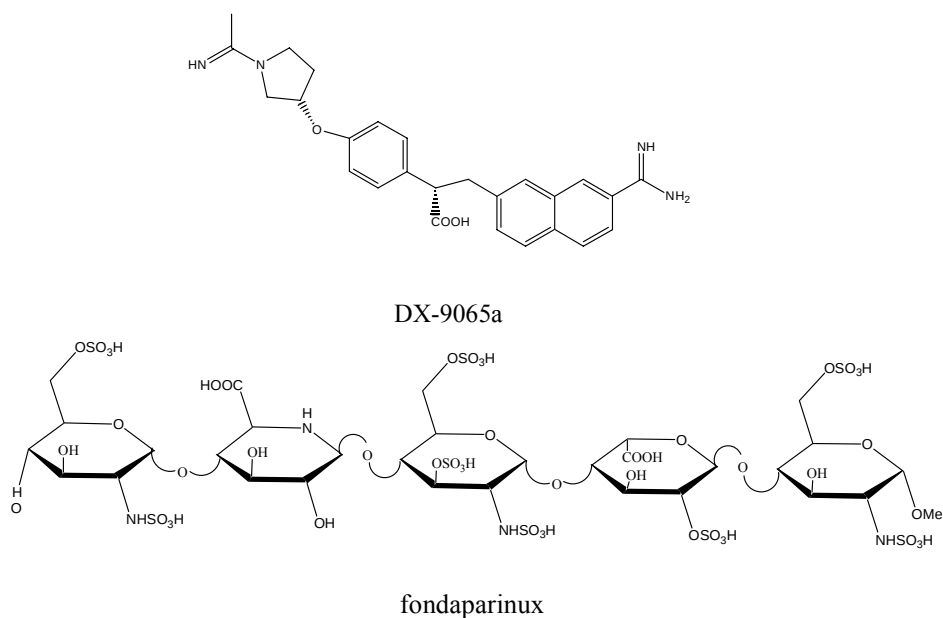


Figure 31 : Principaux inhibiteurs du FXa

Ces deux composés sont des inhibiteurs dits « électrophiles » car ils comprennent un groupement carbonyle pouvant subir l'attaque nucléophile de la Ser525 (selon la notation de la prothrombine). Le PPACK alkyle également irréversiblement l'His363 du site catalytique. L'efegatran, un tripeptide aldéhydique actif par voie parentérale, est actuellement en phase clinique II chez les patients souffrant d'angine instable et d'infarctus aigu du myocarde [Leung, et al., 2000; Steinmetzer, et al., 2001].

Des dérivés non peptidiques de l'arginine de faible poids moléculaire ont été également développés sur base de ce peptide D-Phe-Pro-Arg (Figure 29). Ceux-ci se lient de façon non covalente au site actif de la thrombine et agissent comme des inhibiteurs compétitifs. L'argatroban (Novastan®), administré par voie intraveineuse, est le prototype de cette classe d'agents. Il a récemment été approuvé aux Etats-Unis chez les patients subissant une angioplastie coronaire transluminale percutanée et présentant un risque de thrombocytopénie induite par l'héparine. D'autres dérivés analogues à celui-ci tels que le ximélagatran (Exanta®), la prodrogue du mélagatran, peuvent être administrés par voie orale et sont en cours d'évaluation chez les patients ayant subi de la chirurgie orthopédique ou souffrant de fibrillation atriale [Gresele & Agnelli, 2002; Hirsh, 2003; Leung, et al., 2000].

Il est à noter que tous ces composés, en inhibant spécifiquement la thrombine, bloquent également l'activation plaquettaire induite par celle-ci et exposent donc les patients à un risque d'hémorragie. Leur utilisation doit donc se faire sous surveillance médicale stricte [Leung, et al., 2000].

I.4.5.2. Le facteur Xa

I.4.5.2.1. Structure et mécanisme d'action

Le FXa appartient également à la famille des protéases à sérine de spécificité tryptique et comporte une triade catalytique Ser379-His236-Asp282 (selon la nomenclature du FX). Sa structure secondaire et l'architecture globale de son domaine protéase sont très semblables à celles de la thrombine. Comme celle-ci, il accommode préférentiellement l'arginine au site P₁ afin de former un pont salin avec la chaîne latérale de l'Asp373. Le site S₂ est restreint aux petits résidus tels que la glycine suite à la présence d'une Tyr279. Le site S₃, formé des chaînes latérales basiques de l'Arg405 et des Lys406 et 408, peut interagir avec des résidus chargés positivement tels que l'aspartate. Quant au site S₄, il s'agit d'une poche hydrophobe formée des chaînes latérales de la Tyr279, du Trp399 et de la Phe356 pouvant être remplie par des résidus hydrophobes encombrants. Cette spécificité se retrouve dans les sites de clivage de la prothrombine [Stubbs & Bode, 1995]. L'activation du FXa est catalysée par le complexe FVIIa/TF via l'excision d'un tripeptide Arg140-Lys141-Arg142 et la libération d'un peptide d'activation (Ser143-Arg194) suite à l'hydrolyse du lien Arg194-Ile195. Cette protéolyse limitée expose un groupement NH₃⁺ au niveau l'Ile195 de la nouvelle extrémité N-terminale, qui forme alors un pont salin avec l'Asp378. Cette interaction induit un changement conformationnel qui permet de former le site S₁ et le trou oxyanionique de la protéase active. Le FXa est formé d'une chaîne légère de 139 résidus et d'une chaîne lourde de 254 résidus. La chaîne légère comprend une région N-terminale riche en γ -carboxyglutamates (domaine Gla) et deux domaines de type EGF (epidermal growth factor), tandis que la chaîne lourde comprend le domaine catalytique. Ces deux chaînes sont reliées entre elles par un pont disulfure Cys132-Cys302 [Venkateswarlu, et al., 2002].

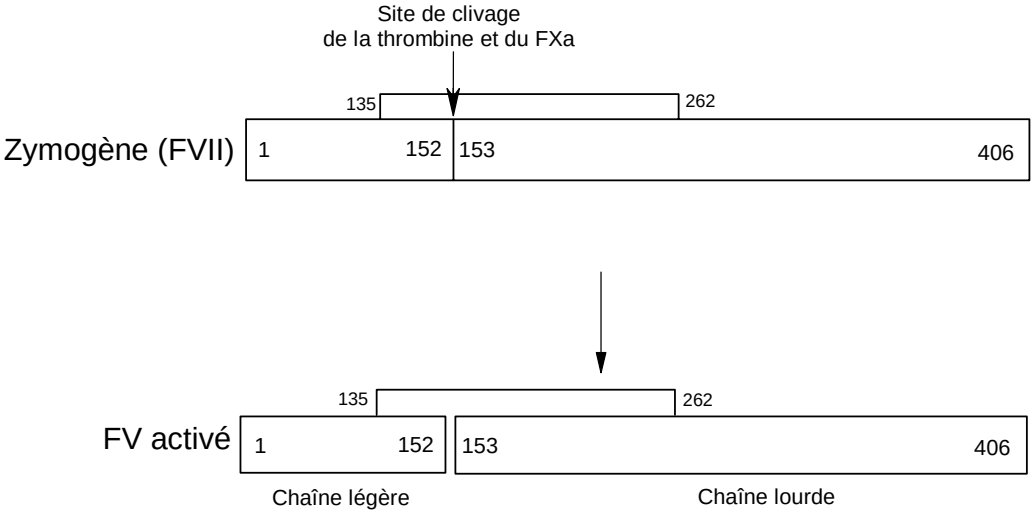


Figure 32 : Conversion du FVII en FVIIa

I.4.5.2.2. Rôles physiopathologiques

Le FXa occupe une place centrale dans la cascade de la coagulation. Il se situe en amont de la thrombine et est responsable de l'activation de celle-ci. Un effet anticoagulant efficace pourrait donc être obtenu en inhibant le FXa plutôt que la thrombine. De plus, les inhibiteurs de FXa agissent spécifiquement sur la cascade de la coagulation et n'ont pas d'effet direct sur la fonction plaquettaire. Ce mécanisme d'action devrait réduire la tendance aux saignements. L'inhibition du FXa pourrait ainsi mener au développement de thérapies réduisant les limitations et effets secondaires attribués aux thérapies actuelles [Sato, et al., 1998; Vacca, 2000].

I.4.5.2.3. Principaux inhibiteurs

Des inhibiteurs polypeptidiques naturels du FXa, tels que le TAP (« tick anticoagulant peptide ») et l'antistatine, actuellement disponibles sous forme recombinante, ont été découverts chez le tique *Ornithodoros moubata* et chez la sangsue mexicaine *Haementeria officinalis*, respectivement.

Des inhibiteurs synthétiques non peptidiques de faible poids moléculaire ont ensuite été développés en tant qu'inhibiteurs réversibles du FXa. Ainsi, le DX-9065a (Figure 31) est un dérivé amidinonaphthalène hautement sélectif et actif par voie orale. Il présente une activité anti-FXa prolongée sans effet sur l'agrégation plaquettaire. Il est actuellement en phase clinique II chez les patients souffrant d'angine instable ou subissant une chirurgie majeure du genou [Gresele & Agnelli, 2002; Hirsh, 2003; Hirsh & Weitz, 1999; Leung, et al., 2000].

Il existe également un inhibiteur indirect du FXa, le fondaparinux (Arixtra®), administré par voie sous-cutanée profonde et récemment commercialisé en Belgique pour la prévention et le traitement de la thrombose veineuse profonde après une chirurgie orthopédique majeure (Figure 31). Il s'agit d'un pentasaccharide synthétique analogue à la séquence de l'héparine. En se liant à l'AT III, il forme un complexe qui potentialise l'inhibition naturelle du FXa par l'AT III. Après avoir activé l'AT III et augmenté sa capacité à inactiver le FXa, le pentasaccharide est relâché du complexe AT III/FXa et peut activer d'autres molécules d'AT III, ce qui constitue l'un de ses avantages. Ce composé n'a pas d'effet sur la thrombine ni sur l'activation plaquettaire [Lassen, et al., 2002].

I.4.5.3. Le complexe facteur VIIa/facteur tissulaire

I.4.5.3.1. Structure et mécanisme d'action

Le TF est une glycoprotéine transmembranaire. Avec 263 acides aminés dans sa forme mature, il est organisé en trois unités distinctes : un large domaine extracellulaire, un segment transmembranaire et une queue cytoplasmique.

Le FVII appartient à la famille des protéases à sérine de spécificité tryptique et comporte une triade catalytique Ser344-His193-Asp242 (selon la nomenclature du FVII). Il circule dans le sang principalement sous forme de zymogène inactif, bien que des petites quantités de FVIIa résultant probablement de l'action de la thrombine ou du FXa, soient également présentes dans le plasma (Figure 32). L'activation du FVIIa est réalisée par le même mécanisme que pour la thrombine et le FXa. Bien que cet événement soit suffisant pour la plupart des protéases à sérine, l'activation complète du FVII requiert son association avec le TF. Le FVIIa comprend deux unités principales: un domaine protéase catalytique C-terminal de 254 acides aminés, appelé chaîne lourde, et trois domaines plus petits, rassemblés en une chaîne

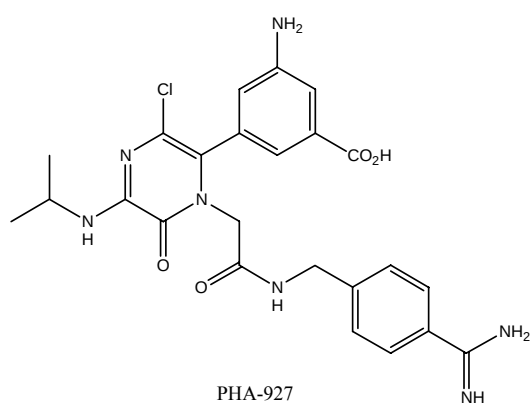


Figure 33 : Inhibiteur de FVIIa

légère de 153 acides aminés. Cette dernière comprend un domaine Gla et deux domaines EGF. Le domaine protéase est constitué du domaine de reconnaissance du substrat et de deux sites allostériques, la région de liaison du TF et l'exosite des substrats macromoléculaires. Les deux chaînes sont reliées par un pont disulfure entre la Cys135 et la Cys262 [Camerer, et al., 1996].

I.4.5.3.2. Rôles physiopathologiques

Le FVIIa complexé au TF, en tant qu'initiateur de la cascade de la coagulation, est largement impliqué dans la physiopathologie de l'athéromatose (voir sections I.1.2.2.3 et I.2). De plus, le TF interviendrait dans d'autres processus biologiques indépendants de la cascade de la coagulation tels que l'angiogenèse et le cancer [Fernandez & Rickles, 2002]. Le FVIIa et le TF représentent donc des cibles attractives pour la conception d'inhibiteurs sélectifs en vue du traitement et de la prévention de ces différents états pathologiques. En tant qu'agents antithrombotiques, ces inhibiteurs pourraient avoir certains avantages par rapport aux approches qui ciblent les enzymes se situant en aval de la cascade de la coagulation. En effet, ils permettraient d'empêcher la formation de thrombine et ce, uniquement au niveau des sites de lésion vasculaire. Ils présenteraient donc moins de risques hémorragiques [Golino, 2002].

I.4.5.3.3. Principaux inhibiteurs

Différentes équipes de recherche tentent de concevoir des inhibiteurs du FT, du FVIIa ainsi que de leur complexe. A l'heure actuelle, le seul composé parvenu au stade de développement clinique est un polypeptide d'origine naturelle isolé du nématode *Ancylostoma caninum*, le NAPc2 (« nematod anticoagulant protein c2 ») [Vlasuk, et al., 1996]. Sa forme recombinante se lie via l'intermédiaire du FXa au complexe FVIIa/TF afin de former un complexe quaternaire inactif [Vlasuk & Rote, 2002].

Néanmoins, les résultats obtenus avec les inhibiteurs de faible poids moléculaires sont encourageants. En effet, le dérivé PHA-927 (Figure 33), développé par les laboratoires Pfizer, présente un fort potentiel inhibiteur du complexe FT/FVIIa ($IC_{50} = 16 \text{ nM}$) et une très bonne sélectivité vis-à-vis de la thrombine et du FXa ($IC_{50} > 100 \text{ } \mu\text{M}$) [Parlow, et al., 2003]. Une étude préliminaire *in vivo* chez le singe a montré que ce composé possédait une activité antithrombotique très intéressante tout en n'ayant peu ou pas d'effet sur le temps de saignement [Salyers, et al., 2004; Suleymanov, et al., 2003].

I.5. Objectifs et présentation du travail

Depuis plusieurs années, le Département de Pharmacie entreprend le développement d'inhibiteurs de protéases à sérine. Ces recherches ont mené à la conception et à la synthèse de nouvelles coumarines substituées en position 3 et 6 en tant qu'inhibiteurs d' α -chymotrypsine et de l'élastase leucocytaire (Figure 34) [Doucet, et al., 1999; Pochet, et al., 2000; Pochet, et al., 1996].

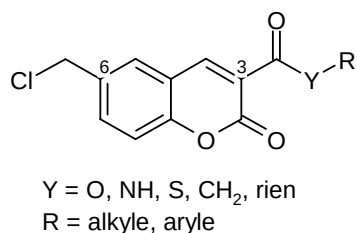


Figure 34 : Coumarines 3,6-disubstituées

Une évaluation biologique *in vitro* sur enzymes isolées de ces composés a permis de dégager plusieurs relations structure-activité. Il a tout d'abord été montré que la substitution du noyau coumarinique en position 3 permet d'obtenir des composés sélectifs de l'une ou l'autre enzyme. En effet, les inhibiteurs les plus efficaces ont été obtenus avec un groupement phényle pour l' α -chymotrypsine et avec une pyridine pour l'élastase leucocytaire. La substitution de ces noyaux aromatiques influence fortement le pouvoir inactivateur, la position *meta* semblant être la plus favorable. Ensuite, il s'est avéré que la présence d'un lien ester entre la coumarine et la chaîne latérale en position 3 est indispensable à l'activité inhibitrice et ce, à la fois envers l' α -chymotrypsine et l'élastase leucocytaire. Enfin, il a été montré que le remplacement de la fonction chlorométhyle en position 6 entraîne une perte totale d'activité vis-à-vis de l' α -chymotrypsine. Par contre, ce remplacement influence peu le pouvoir inactivateur vis-à-vis de l'élastase leucocytaire.

Ces coumarines ont été conçues comme des inhibiteurs basés sur le mécanisme (« mechanism-based inhibitors ») ou substrats suicide (« suicide inhibitors »). Il s'agit de composés dont la structure ressemble au substrat de l'enzyme cible. Ils sont transformés via le processus catalytique normal de l'enzyme en une espèce très réactive qui, avant de quitter le site actif, inactive l'enzyme. On parle donc également d'inactivateur [Krantz, 1962; Lehninger, 2000].

Cette inactivation résulterait du démasquage d'un groupement réactif latent après action catalytique de l'enzyme. Celui-ci se lierait alors à un résidu du site actif de l'enzyme qui serait ainsi inactivée. Ces inhibiteurs devraient donc présenter une sélectivité maximale *in vitro* et *in vivo* puisque leur action inhibitrice requiert la liaison à l'enzyme, l'activation catalytique enzymatique et la modification irréversible du site actif.

Le mécanisme d'inhibition de ces coumarines a été démontré dans le cas de l' α -chymotrypsine. Ainsi, le groupement carbonyle de la lactone subit une attaque nucléophile de la sérine du site actif de l'enzyme. Cette attaque est suivie par l'ouverture de la lactone et le départ du groupement chlore de la fonction chlorométhyle. Cette réaction aboutit à la formation d'un intermédiaire méthylène quinone électrophile. Ce dernier forme alors un lien covalent avec un résidu nucléophile du site de reconnaissance de l'enzyme. Suivant ce mécanisme, la présence d'une fonction alkylante latente (groupement chlorométhyle) est indispensable à l'activité inhibitrice [Doucet, et al., 1999; Pochet, et al., 2003].

Comme il a été expliqué dans l'introduction, la thrombine et le FXa représentent des cibles attractives pour le développement d'agents antithrombotiques. Un projet a donc été développé au sein du Département de Pharmacie avec pour objectif la conception d'inhibiteurs puissants et sélectifs de protéases à sérine impliquées dans la cascade de la coagulation. Ces composés pourraient en effet constituer des thérapies de choix dans les maladies cardiovasculaires

A cette fin, nous avons entrepris lors de ce mémoire une évaluation des coumarines en tant qu'inhibiteurs de protéases impliquées dans la cascade de la coagulation.

La première partie de ce travail s'est donc focalisée sur l'évaluation du pouvoir inhibiteur des coumarines envers la thrombine et le FXa. Dès lors, des tests de criblage sur enzymes isolées ont tout d'abord été réalisés pour permettre une première sélection des composés présentant le meilleur potentiel inhibiteur sur chaque enzyme.

Ensuite, le pouvoir inactivateur des dérivés s'étant révélés les plus actifs lors des tests de criblage a été déterminé de façon précise par la mesure des constantes cinétiques d'inactivation k_i et K_I . Deux méthodes ont été utilisées : la méthode de compétition dite continue et la méthode des prélèvements dite discontinue.

La deuxième partie de ce travail s'est portée sur l'étude du mécanisme d'inhibition des coumarines sur la thrombine et sur le FXa. En effet, il est important de bien comprendre ce mécanisme afin d'identifier les éléments structuraux clés responsables de l'inhibition.

Pour atteindre ce but, des cinétiques enzymatiques de réactivation ont tout d'abord été effectuées pour caractériser la nature des interactions existant entre l'enzyme et l'inhibiteur. Ensuite, nous avons essayé de préciser la nature des complexes enzyme-inhibiteur en mesurant par spectrométrie de masse la masse moléculaire de l'adduit présent sur les enzymes inactivées. Enfin, nous avons tenté de déterminer le site de fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme grâce à des expériences de digestions enzymatiques et d'analyse par spectrométrie de masse des peptides obtenus.

II. MATERIEL ET METHODES

Tableau 2 : Caractéristiques des enzymes et tampons utilisés dans les tests enzymatiques

Enzymes	Poids moléculaires (kDa)	Fournisseurs	Tampons
Thombine humaine EC 3.4.21.5	37	Roche	Tampon de conservation : Tris 0.01 M Hepes 0.01 M NaCl 0.5 M PEG 6000 0.1 % pH 7.4 Tampon cinétique : Tris 0.01 M Hepes 0.01 M NaCl 0.1 M PEG 6000 0.1 % (v/v) pH 7.4
Facteur Xa humain EC 3.4.21.6	44	Kordia	Tris 0.05 M NaCl 0.15 M CaCl ₂ 0.005 M EDTA 0.001 M Tween-20 0.05 % (v/v) pH 7.4
Facteur VIIa recombinant EC 3.4.21.21	50	NovoNordisk	Tris 0.1 M NaCl 0.1 M CaCl ₂ 0.005 M BSA 0.1% (w/v) pH 7.4
Facteur tissulaire recombinant	37	Calbiochem	

Tableau 3 : Caractéristiques des substrats chromogènes utilisés dans les tests enzymatiques

Substrats	Formules peptidiques	Enzymes	Fournisseurs
S-2238	D-phénylalaninyl-pipécolyl-argininyl-4-nitroanilide	Thrombine	Chromogenix
Chromozym TH	Tosyl-glycyl-prolyl-argininyl-4-nitroanilide	Thrombine	Roche
Chromozym X	N-méthoxycarbonyl-D- norleucyl-glycyl-L-arginine-4-nitroanilide	FXa	Roche
Pefachrome VIIa	Méthanesulfonyl-D-cyclohexylalanyl-butyl-arginine-4-nitroanilide	FVIIa /TF	Kordia

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Etudes enzymatiques

II.1.1. Matériel

Les enzymes étudiées ainsi que leur poids moléculaire, leur provenance commerciale et leurs tampons respectifs sont présentées dans le tableau 2. Les différentes coumarines testées ont été synthétisées au Département de Pharmacie des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix ou au Laboratoire de Chimie Pharmaceutique de l'Université de Liège. L'utilisation de l'acétonitrile comme cosolvant (10% v/v) a été nécessaire pour permettre leur solubilisation. Les substrats chromogènes utilisés ainsi que leur structure peptidique et leur provenance commerciale sont présentés dans le tableau 3.

Les études spectrophotométriques ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre Lambda 20 (Perkin-Elmer) équipé d'un dispositif de thermostatisation. Les analyses mathématiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism 3.0 (Graphpad Software).

II.1.2. Méthodes

II.1.2.1. Principe général des études enzymatiques

L'activité d'une enzyme peut être mesurée en déterminant la vitesse de formation d'un produit ou de consommation d'un substrat durant la réaction catalysée par l'enzyme [Eisenthal & Danson, 1992]. Tous les tests enzymatiques et études cinétiques ont été réalisés en présence d'un substrat peptidique chromogène choisi en fonction de l'enzyme étudiée. Celui-ci comprend une partie peptidique, reconnue spécifiquement par l'enzyme, sur laquelle est greffé un groupement nitroanilide qui, lorsqu'il est hydrolysé pour libérer la nitroaniline, absorbe la lumière à 405 nm. L'activité de l'enzyme est ainsi mesurée par spectrophotométrie en se basant sur la différence d'absorbance à 405 nm entre la nitroaniline formée lors de la réaction enzymatique et le substrat initial (Figure 35).

II.1.2.2. Test de criblage

Ce test consiste à mettre en présence l'inhibiteur et l'enzyme pendant 10 minutes à 25°C. Après incubation, l'activité résiduelle de l'enzyme est mesurée par ajout du substrat chromogène, pendant 2 minutes. Le rapport entre l'activité de l'enzyme après inactivation et l'activité de l'enzyme en absence d'inhibiteur, exprimé en pourcent, donne le pourcentage d'activité résiduelle de l'enzyme. Celui-ci est calculé à partir de la moyenne de trois mesures prises successivement pour chaque composé.

Les tests de criblage ont été réalisés avec les concentrations en enzymes, cofacteurs éventuels, inhibiteurs (I) et substrats suivantes : [THR] = 2.32 nM, [I] = 2 µM, [S2238] = 40 µM ; [FXa] = 5.8 nM, [I] = 5 µM, [Chromozym X] = 300 µM ; [FVIIa] = 36 nM, [TF] = 67.5 nM, [I] = 10 µM, [Pefachrome VIIa] = 1 mM. Toutes les réactions ont été effectuées à 25°C pour la THR et le FXa et à 37°C pour le FVIIa/TF.

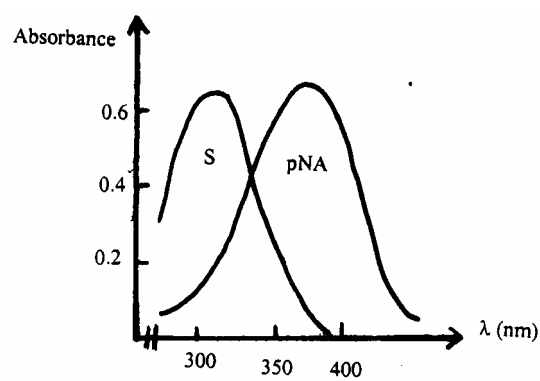


Figure 35 : Spectres d'absorption du substrat (S) et de la nitroaniline (NA) formée lors de l'hydrolyse du substrat

II.1.2.3. Détermination des paramètres cinétiques d'inactivation k_i et K_I

II.1.2.3.1. Interaction enzyme-inhibiteur

Lorsqu'un inhibiteur basé sur le mécanisme est mis en présence d'une enzyme, il y a tout d'abord formation d'un complexe de Michaelis. Ensuite, l'enzyme convertit, via son cycle catalytique normal, le composé en espèce généralement inactivante. Cette étape, qui est habituellement responsable de l'inactivation enzymatique, est dépendante du temps. L'espèce inactivante peut évoluer de trois façons différentes. Si elle n'est pas réactive mais forme une interaction forte avec l'enzyme, l'inactivation peut être le résultat d'un complexe non covalent à haute affinité (« tight-binding complex »). S'il s'agit d'une espèce réactive, une réaction nucléophile, électrophile ou radicalaire peut se produire avec l'enzyme pour donner un complexe covalent qui inactive l'enzyme de façon irréversible. Ce type d'inhibiteur est appelé inhibiteur suicide (« suicide inhibitor »). Enfin, l'espèce générée peut être libérée de l'enzyme comme un produit. L'enzyme est alors à nouveau présente sous sa forme active. Dans ce cas-ci, on parle de mauvais substrat [Silverman, 1995].

Les coumarines étudiées dans ce travail sont des inhibiteurs suicides. Leur interaction avec les protéases peut être schématisée suivant la figure 36.

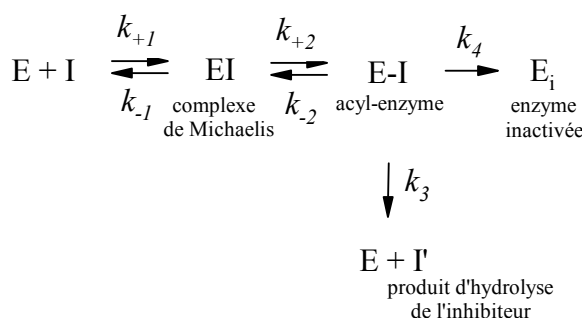


Figure 36 : Schéma réactionnel pour l'inactivation

Puisque la progression de la réaction est contrôlée par la diminution de la quantité d'enzyme active, c'est-à-dire l'accumulation du complexe E_i , les complexes EI et $E-I$ ne peuvent être distingués. La notation E^*I est donc utilisée pour représenter une sorte de chimère cinétique de ces deux complexes [Daniels, et al., 1983]. De plus, lorsque la valeur de k_3 est négligeable par rapport à celle de k_4 , le schéma réactionnel ci-dessus peut être simplifié (Figure 37). Dès lors, k_i représente la constante de vitesse de premier ordre pour l'inactivation à concentration infinie en inhibiteur et K_I la constante apparente de dissociation d'un complexe enzyme-inhibiteur situé en amont du k_i .

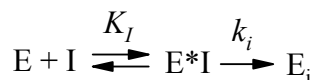


Figure 37 : Modèle simplifié pour l'inactivation

Le pouvoir inactivateur de l'inhibiteur peut ainsi être caractérisé par le rapport k_i/K_I . Plus ce rapport est élevé, plus la formation du complexe E_i est efficace et rapide et plus le pouvoir inhibiteur est élevé.

Deux techniques peuvent être employées pour la détermination de ces constantes caractéristiques de l'inactivation : la méthode des prélèvements dite discontinue ou la méthode de compétition dite continue.

II.1.2.3.2. Méthode des prélèvements ou méthode discontinue

Cette première méthode permet de suivre la perte d'activité de l'enzyme au cours du temps en présence de différentes concentrations en inhibiteur. En pratique, l'enzyme est incubée dans le tampon avec différentes concentrations en inhibiteur et son activité résiduelle est mesurée à différents intervalles de temps par ajout du substrat chromogène à forte concentration. Cet ajout permet ainsi de stopper la réaction d'inhibition de l'enzyme par l'inhibiteur.

L'analyse mathématique développée par Kitz et Wilson pour la détermination des paramètres d'inactivation peut alors être appliquée [Kitz & Wilson, 1962].

L'activité enzymatique résiduelle mesurée au temps t correspond à l'activité de l'enzyme non inhibée de façon irréversible au temps t , notée ε et définie par l'équation 1 où $[E]_T$ est la concentration totale en enzyme.

$$[\varepsilon] = [E]_T - [E_i] = [E] + [E^*I] \quad \text{Équation 1}$$

En pratique, $[\varepsilon]$ est l'activité enzymatique résiduelle mesurée en présence de l'inhibiteur, tandis que $[E]_T$ est l'activité enzymatique mesurée en absence d'inhibiteur, à différents intervalles de temps.

En dérivant l'équation 1 en fonction du temps, où $[E]_T$ est une constante (équation 2), on peut caractériser la perte d'activité enzymatique par l'équation 3.

$$\frac{d[\varepsilon]}{dt} = \frac{d[E]_T}{dt} - \frac{d[E_i]}{dt} = -\frac{d[E_i]}{dt} \quad \text{Équation 2}$$

$$-\frac{d[\varepsilon]}{dt} = \frac{d[E_i]}{dt} = k_i \times [E^*I] \quad \text{Équation 3}$$

K_I , la constante de dissociation du complexe chimérique E^*I est définie par l'équation 4.

$$K_I = \frac{[I] \times [E]}{[E^*I]} \quad \text{Équation 4}$$

$$\text{d'où} \quad [E^*I] = \frac{[I] \times [E]}{K_I} \quad \text{Équation 5}$$

$$\text{Or, selon l'équation 1,} \quad [E] = [\varepsilon] - [E^*I] \quad \text{Équation 6}$$

$$\text{donc,} \quad [E] = [\varepsilon] - \frac{[I] \times [E]}{K_I} = \frac{[\varepsilon]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad \text{Équation 7}$$

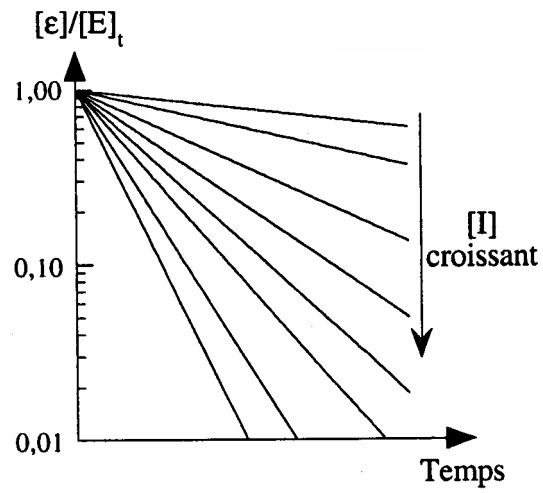


Figure 38 : Perte d'activité enzymatique en fonction du temps en présence de concentrations croissantes en inhibiteur

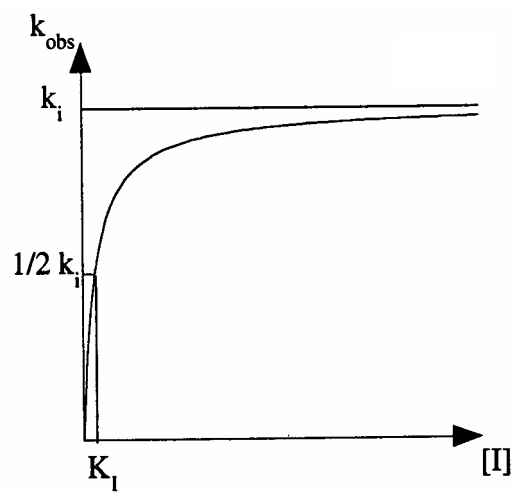


Figure 39 : Représentation de la constante k_{obs} en fonction de la concentration en inhibiteur $[I]$

En combinant les équations 3, 5 et 7 :

$$\frac{-d[\varepsilon]}{dt} = k_i \times \frac{[I]}{K_I} \times \frac{[\varepsilon]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad \text{Équation 8}$$

Donc,

$$\frac{d[\varepsilon]}{[\varepsilon]} = -\frac{k_i \times [I]}{K_I + [I]} dt \quad \text{Équation 9}$$

d'où, en intégrant l'équation 9 :

$$[\varepsilon] = [E]_T \times \exp(-k_{obs} \times t) \quad \text{Équation 10}$$

avec

$$k_{obs} = \frac{k_i \times [I]}{K_I + [I]} \quad \text{Équation 11}$$

La perte d'activité enzymatique suit donc une loi de pseudo-premier ordre décrite par l'équation 10 et caractérisée par la constante cinétique k_{obs} obtenue par ajustement non linéaire à cette équation. La représentation de cette perte d'activité en fonction du temps à différentes concentrations en inhibiteur sur un graphe semi-logarithmique donne une série de droites décroissantes dont la pente, soit la constante k_{obs} , augmente avec la concentration en inhibiteur (Figure 38).

La représentation de la constante k_{obs} en fonction de la concentration initiale en inhibiteur suit une loi hyperbolique (équation 11, Figure 39) et permet la détermination des constantes cinétiques k_i et K_I .

Cependant, lorsque les concentrations en inhibiteur utilisées sont fortement inférieures au K_I , la constante k_{obs} peut être approximée selon l'équation 12.

$$k_{obs} \approx \frac{[k_i]}{[K_I]} \times [I] \quad \text{Équation 12}$$

Ainsi, seul le rapport k_i/K_I , exprimé sous forme $k_{obs}/[I]$, peut être obtenu. Il s'agit de la pente de la droite représentant la constante k_{obs} en fonction de la concentration initiale en inhibiteur pour des concentrations en inhibiteur inférieures au K_I (Figure 39).

II.1.2.3.3. Méthode de compétition ou méthode continue

Lorsque l'inactivation est trop rapide pour être évaluée par la méthode des prélèvements, le phénomène est ralenti par la mise en compétition, vis-à-vis du site actif de l'enzyme, de l'inhibiteur et d'un substrat chromogène [Hart & O'Brien, 1973]. L'utilisation de cette méthode peut être décrite par le schéma réactionnel de la figure 40 où E représente l'enzyme, I l'inhibiteur, E*I le complexe chimérique enzyme-inhibiteur, E_i l'enzyme inactivée de façon

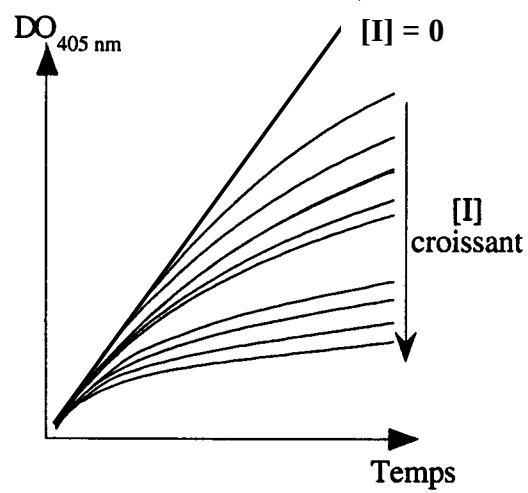


Figure 41 : Augmentation de la densité optique (DO) à 405 nm en fonction du temps en présence de concentrations croissantes en inhibiteur

irréversible, S le substrat, ES le complexe enzyme-substrat et P le produit. Ce modèle est caractérisé par les constantes cinétiques suivantes : K_m la constante de Michaelis, k_{cat} la constante catalytique, k_i la constante de vitesse de premier ordre pour l'inactivation à concentration infinie en inhibiteur et K_I la constante apparente de dissociation d'un complexe enzyme-inhibiteur situé en amont du k_i .

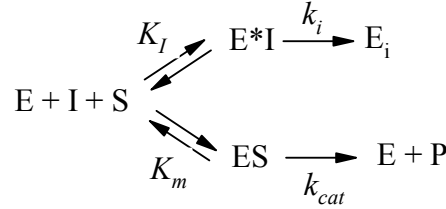


Figure 40: Schéma réactionnel pour l'utilisation de la méthode de compétition

La vitesse de réaction de chaque voie est proportionnelle à la concentration de l'enzyme E non inhibée de façon irréversible. La vitesse de production du chromophore est donc directement liée à la vitesse d'inactivation de l'enzyme. Elle permet ainsi de contrôler en continu la progression de la réaction d'inactivation.

En pratique, le substrat en concentration fixe et l'inhibiteur en concentration variable sont mis en solution dans le tampon et la cinétique est déclenchée par l'ajout d'enzyme en concentration fixe. L'augmentation de la densité optique (DO) est alors observée à 405 nm au cours du temps. En absence d'inhibiteur, celle-ci est linéaire et la vitesse de production du chromophore est constante. En présence de concentrations croissantes en inhibiteur, la vitesse instantanée de production du chromophore diminue (Figure 41).

L'analyse mathématique ci-dessous, adaptée de celle de Morrison et Walsh, peut alors être appliquée afin de déterminer les constantes cinétiques k_i et K_I [Morrison & Walsh, 1988].

La vitesse d'apparition du chromophore, conformément au schéma réactionnel de la figure 40, est définie par l'équation 13.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{cat} \times [ES] \quad \text{Équation 13}$$

Par définition, les constantes K_m et K_I sont représentées par les équations 14 et 15.

$$K_m = \frac{[S] \times [E]}{[ES]} \quad \text{Équation 14}$$

$$K_I = \frac{[I] \times [E]}{[E \cdot I]} \quad \text{Équation 15}$$

$$\text{d'où, selon l'équation 14,} \quad [E] = \frac{K_m \times [ES]}{[S]} \quad \text{Équation 16}$$

et, selon l'équation 15,

$$[E^*I] = \frac{[I] \times [E]}{K_I} \quad \text{Équation 17}$$

Donc, en combinant les équations 16 et 17 :

$$[E^*I] = \frac{[I]}{K_I} \times \frac{K_m}{[S]} \times [ES] \quad \text{Équation 18}$$

La conservation de l'enzyme permet de décrire l'équation 19, $[E]_T$ étant la concentration totale en enzyme.

$$[E]_T = [E] + [ES] + [E^*I] + [E_i] \quad \text{Équation 19}$$

d'où, en combinant les équations 16, 18 et 19 :

$$[E_i] = [E]_T - [ES] \times \left\{ 1 + \frac{K_m}{[S]} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \right\} \quad \text{Équation 20}$$

De plus, en dérivant en fonction du temps l'équation 19, où $[E]_T$ est une constante :

$$\frac{d[E_i]}{dt} = \frac{d[E]_T}{dt} - \left\{ 1 + \frac{K_m}{[S]} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \right\} \frac{d[ES]}{dt} = - \left\{ 1 + \frac{K_m}{[S]} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \right\} \frac{d[ES]}{dt} \quad \text{Équation 21}$$

Or, selon l'équation 13,

$$\frac{d[E_i]}{dt} = k_i \times [E^*I] \quad \text{Équation 22}$$

En combinant les équations 18, 21 et 22 :

$$k_i \times \frac{[I]}{K_I} \times \frac{K_m}{[S]} \times [ES] = - \left\{ 1 + \frac{K_m}{[S]} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \right\} \frac{d[ES]}{dt} \quad \text{Équation 23}$$

donc

$$\frac{d[ES]}{[ES]} = - \frac{k_i \times \frac{[I]}{K_I} \times \frac{K_m}{[S]}}{1 + \frac{K_m}{[S]} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)} dt = - \frac{k_i \times [I]}{[I] + K_I \times \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right)} dt \quad \text{Équation 24}$$

On pose

$$\pi = \frac{k_i \times [I]}{[I] + K_I \times \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right)} \quad \text{Équation 25}$$

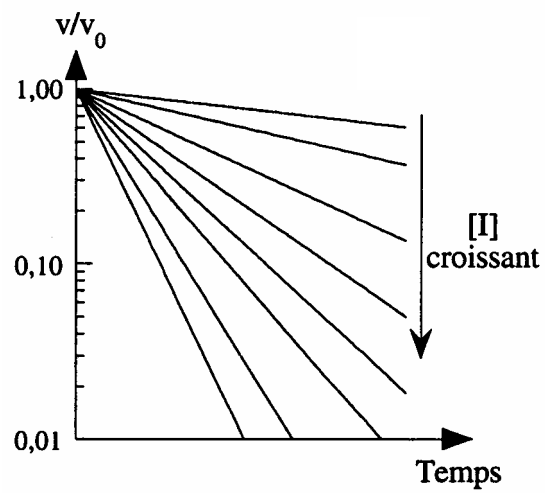


Figure 42 : Vitesse d'apparition du chromophore en fonction du temps en présence de concentrations croissantes en inhibiteur

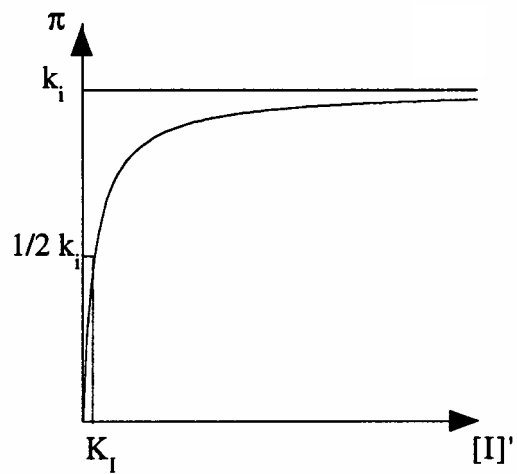


Figure 43 : Représentation de la constante π en fonction de la concentration modifiée en inhibiteur $[I]'$

D'où, en intégrant l'équation 24 combinée à l'équation 25 :

$$[ES] = [ES]_0 \times \exp(-\pi \times t) \quad \text{Équation 26}$$

En reprenant l'équation 13,

$$v = k_{cat} \times [ES] = k_{cat} \times [ES]_0 \times \exp(-\pi \times t) \quad \text{Équation 27}$$

or
$$v_0 = k_{cat} \times [ES]_0 \quad \text{Équation 28}$$

donc
$$v = v_0 \times \exp(-\pi \times t) \quad \text{Équation 29}$$

La vitesse d'apparition du chromophore diminue donc exponentiellement en fonction du temps. Cette perte de vitesse est caractérisée par la constante cinétique π obtenue par ajustement non linéaire à l'équation 29. La représentation de cette perte de vitesse en fonction du temps à différentes concentrations en inhibiteur sur un graphe semi-logarithmique donne une série de droites décroissantes dont la pente, soit la constante π , augmente avec la concentration en inhibiteur (Figure 42).

En définissant la concentration modifiée en inhibiteur $[I]'$ par l'équation 30, la constante π de l'équation 25 peut être redéfinie selon l'équation 31.

$$[I]' = \frac{[I]}{\left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right)} \quad \text{Équation 30}$$

$$\pi = \frac{k_i \times [I]'}{K_I + [I]'} \quad \text{Équation 31}$$

La représentation de cette constante π en fonction de la concentration modifiée en inhibiteur $[I]'$ suit une loi hyperbolique (équation 31, Figure 43) et permet la détermination des constantes cinétiques k_i et K_I .

Les paramètres cinétiques d'inactivation ont été déterminés avec les concentrations en enzymes, inhibiteurs et substrats suivantes : [THR] = 1.16 nM, [I] = 0.025-10 μ M, [Chromozym TH] = 80 μ M ; [FXa] = 1.16 nM (méthode continue) ou 5.8 nM (méthode discontinue), [I] = 0.1-10 μ M (méthode continue) ou 1-5 μ M (méthode discontinue), [Chromozym X] = 200 μ M (méthode continue) ou 300 μ M (méthode discontinue). Toutes les réactions ont été effectuées à 25°C.

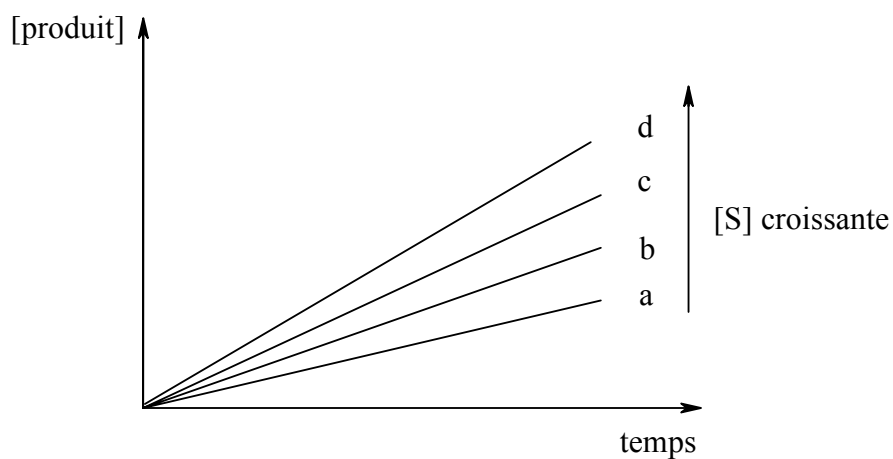


Figure 45 : Taux de formation du produit au cours du temps pour des concentrations croissantes en substrat

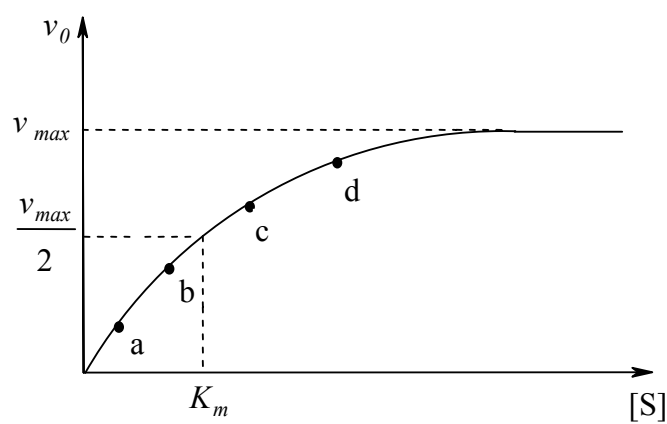


Figure 46 : Représentation des vitesses initiales v_0 en fonction de la concentration en substrat permettant la détermination de la constante K_m

II.1.2.4. Détermination de la constante de Michaelis-Menten des substrats chromogènes

L'hydrolyse d'un substrat par une enzyme suit le schéma réactionnel de la figure 44 où E représente l'enzyme, S le substrat, ES le complexe enzyme-substrat et P le produit formé. Ce système est caractérisé par la constante de Michaelis-Menten (K_m) et par la constante catalytique de la réaction (k_{cat}) [David, 1995].



Figure 44 : Schéma réactionnel de l'hydrolyse d'un substrat

En pratique, l'enzyme en concentration fixe est mise en présence du substrat en concentration croissante et la vitesse initiale (v_0) de la réaction est mesurée. La représentation de la concentration en produit formé en fonction du temps donne une série de droites croissantes dont la pente, soit v_0 , augmente avec la concentration en substrat (Figure 45).

La représentation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat suit une loi hyperbolique (Figure 46) définie par l'équation de Michaelis-Menten (équation 32) où v_{max} est la vitesse initiale maximale de l'enzyme à saturation. La constante de Michaelis-Menten peut être obtenue par ajustement non linéaire à cette équation et représente la concentration en substrat à laquelle la vitesse est égale à $v_{max}/2$.

$$v_0 = \frac{v_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Équation 32}$$

Les courbes de Michaelis-Menten ont été réalisées avec les concentrations en enzymes et substrats suivantes : [THR] = 1.16 nM, [Chromozym TH] = 5-300 μ M ; [FXa] = 1.16 nM, [Chromozym X] = 80-1800 μ M. Toutes les réactions ont été effectuées à 25°C.

II.1.2.5. Réactivation enzymatique

Les enzymes sont inhibées par ajouts successifs d'inhibiteur jusqu'à obtention d'une inhibition supérieure à 90 %. Les complexes enzyme-inhibiteur sont ensuite lavés deux fois avec du tampon cinétique afin d'éliminer l'excès d'inhibiteur présent dans la solution. Celle-ci est ensuite incubée avec ou sans hydrazine pendant 48 heures. L'activité enzymatique d'aliquotes prélevées au cours du temps est alors mesurée et comparée à celle d'un témoin sans inhibiteur réalisé dans les mêmes conditions expérimentales. L'activité de chaque groupe est exprimée en pourcent du contrôle.

Les expériences de réactivation ont été réalisées avec les concentrations en enzymes, inhibiteur et hydrazine suivantes : [THR] = 52.2 nM, [I] finale = 30 μ M, [hydrazine] = 0.6 M et [FXa] = 52.2 nM, [I] finale = 10 μ M, [hydrazine] = 0.6 M. Toutes les réactions ont été effectuées à 25°C. Les lavages ont été réalisés à 4°C par filtration sur une membrane de polysulfone (Amicon® Ultra, cut-off de 10 000 Da) pendant 15 minutes à 4000 g.

II.2. Etude par spectrométrie de masse

II.2.1. Préparation des complexes enzyme-inhibiteur

II.2.1.1. Matériel

Les enzymes, inhibiteurs et substrats chromogènes utilisés ont été décrits dans la section II.1.1. En ce qui concerne les tampons, ils ont la même composition que ceux utilisés lors des études enzymatiques (voir tableau 2). Ils ne contiennent cependant pas de PEG 6000 (0,1 %) ni de Tween-20 (0,05 %) dans le cas de la thrombine et du FXa respectivement.

II.2.1.2. Méthode

Les complexes enzyme-inhibiteur sont formés à partir d'une solution d'enzyme par ajouts successifs d'inhibiteur jusqu'à obtention d'une inhibition supérieure à 85 %. La solution de complexe est ensuite incubée pendant une heure avec de l'hydrazine 0,6 M. Pour chaque condition, des aliquotes sont prélevées afin d'être analysées par spectrométrie de masse.

Les complexes ont été réalisés à 25°C avec les concentrations en enzymes et inhibiteurs suivantes : [THR] = 1.28 μ M, [I] = 40 μ M et [FXa] = 1.05 μ M, [I] = 10 μ M.

II.2.2. Mesure du poids de l'adduit

II.2.2.1. Matériel

Un système de type LC/MS (« Liquid chromatography/mass spectrometry ») couplé à une chromatographie liquide haute performance (HPLC) a été utilisé afin d'analyser les complexes enzyme-inhibiteur.

Le système chromatographique HP 1100 (Agilent 1100) se compose d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur, d'un échantillonneur automatique standard équipé d'une boucle d'injection de 100 μ l et d'un système de thermostatisation de colonne. Ce système HPLC est couplé à un spectromètre de masse de type trappe à ions (« ion trap ») de marque Agilent (Agilent 1100 Series MSD Trap SL) par une source électrospray. Cet ensemble LC/MS est piloté par ordinateur à l'aide des logiciels Chemstation (Rev A 0901) et MSD Trap Control (v5.1). La déconvolution des spectres de masse obtenus a été réalisée avec les logiciels Deconvolution and Bioanalysis (vA.08.03) et Data Analysis (v2.2).

La colonne Agilent utilisée pour ces études est de type Zorbax Rapid Resolution (3,5 μ m, SB-C18, 300 Å, 2,1 mm i.d. x 50 mm). Un gradient d'élution a été utilisé avec un solvant A (eau contenant 1 % d'acide formique) et un solvant B (acétonitrile). Ce gradient était de 5 à 80 % de B en 20 minutes avec un débit de 500 μ L.min⁻¹. La température a été fixée à 25°C. L'ESI (« electrospray ionisation ») en ligne a été utilisé dans le mode ion positif. La pression du nébuliseur était de 40 psi avec un débit de gaz (azote, 325°C) de 6 L.min⁻¹. Le voltage du capillaire était de 4,5 kV. Le balayage MS a été réalisé entre 800 et 2000 m/z .

II.2.2.2. Méthode

Les mesures de la masse de l'enzyme native et complexée à l'inhibiteur ont été réalisées par injection d'environ 1 μ g d'enzyme sur le système de type LC/MS. L'utilisation de l'HPLC a permis d'éliminer en ligne les sels présents dans l'échantillon.

Tableau 4 : Caractéristiques des enzymes et tampons utilisés lors des expériences de digestion

Enzymes de digestion	Fournisseurs	Tampons
Sequencing Grade Modified Trypsin EC 3.4.21.4	Promega	50 mM NH ₄ HCO ₃
Sequencing Grade Chymotrypsin EC 3.4.21.1	Roche	100 mM Tris-HCl 10 mM CaCl ₂

Tableau 5 : Durée de digestion en fonction des conditions expérimentales

Conditions expérimentales	Trypsine	Chymotrypsine
Enzyme native	24 heures	-
Enzyme traitée au RapiGest SF	1 heure 30	15 heures
Enzyme réduite et alkylée	1 heure 30	15 heures

II.2.3. Digestions enzymatiques

II.2.3.1. Matériel

Les enzymes de digestion utilisées ainsi que leur provenance commerciale et leurs tampons de digestion respectifs sont présentés dans le Tableau 4.

II.2.3.2. Méthodes

Les échantillons d'enzymes natives ont été digérés à 37°C à l'aide de la trypsine ou de la chymotrypsine. La proportion de l'enzyme de digestion utilisée était de 1/50 par rapport à l'enzyme étudiée. Une addition de RapiGest SF 0,1 % (Waters) a parfois été nécessaire.

La réduction et l'alkylation des ponts disulfures ont été effectuées à l'aide de dithiothréitol (DTT) 5 mM à 46°C pendant 45 minutes et d'iodoacétamide 15 mM pendant 30 minutes à température ambiante dans le noir. Les échantillons ont ensuite été digérés à 37°C à l'aide de la trypsine ou de la chymotrypsine dans les mêmes proportions que précédemment.

Les durées de digestion nécessaires selon les conditions expérimentales sont présentées dans le tableau 5.

II.2.4. Analyse des peptides obtenus par digestion enzymatique

II.2.4.1. Matériel

Les mesures de masse ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse TOF SPEC 2E équipé d'une source MALDI (« Matrix-assisted laser desorption ionization ») (Waters) ou d'un spectromètre de masse Q-TOF2 (« quadrupole-time of flight ») équipé d'une source ESI (Waters). La déconvolution des spectres de masse obtenus a été réalisée avec le logiciel MaxLynx 3.5.

Lors de l'analyse en MALDI, une matrice comprenant un mélange équimolaire d'acide α -cyano-4-hydroxy-cinnamique (20 mg.mL⁻¹), dissous dans une solution d'acétonitrile 70 % et d'acide formique 5 %, et d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (20 mg.mL⁻¹), dissous dans une solution d'acétonitrile 70 % et d'acide trifluoroacétique 0,1 % a été utilisée.

II.2.4.2. Méthodes

Avant analyse, les échantillons ont été purifiés par rétention sur un « geloader » tips C18 (Proxeon) et lavés avec une solution d'acide formique 5 %. Le « geloader » tips avait été préalablement conditionné avec une solution d'acétonitrile 70 % et d'acide formique 5 %.

Lors de l'analyse en MALDI, les échantillons ont été élués directement sur la cible avec 0,5 μ L du mélange de matrice.

Lors de l'analyse en Q-TOF2, une solution de méthanol 60 % et d'acide formique 0,1 % a été utilisée pour éluer l'échantillon dans une aiguille capillaire. Une infusion directe a ensuite été réalisée.

III. RESULTATS, DISCUSSION ET CONCLUSIONS

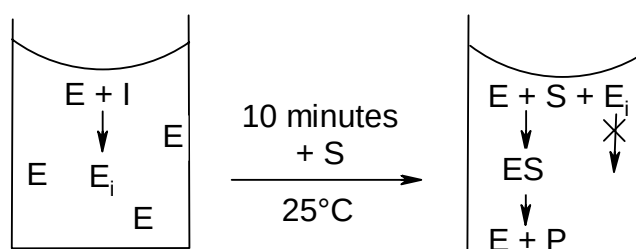
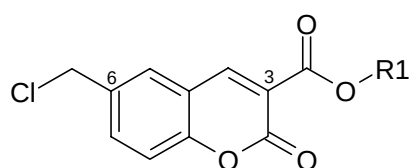


Figure 47 : Principe du test de criblage

Tableau 6 : Test de criblage sur thrombine : esters aromatiques



Composés	R ₁	Activité résiduelle de la thrombine
MS 7		60 ± 9 %
MS 29		95 ± 5 %
MS 38		109 ± 14 %
MS 37		115 ± 18 %
MS 33		113 ± 11 %
LP 12		100 ± 5 %
LP 32		98 ± 10 %
LP 31		107 ± 14 %

III. RESULTATS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

III.1. Etude du pouvoir inhibiteur des coumarines

III.1.1. Etude du pouvoir inhibiteur des coumarines vis-à-vis de la thrombine

III.1.1.1. Données préliminaires : test de criblage

Un test de criblage *in vitro* sur thrombine isolée a été précédemment mis au point au sein du laboratoire. Celui-ci permet une évaluation simple et rapide du pouvoir inhibiteur des composés synthétisés. Il consiste à mettre en présence l'inhibiteur et l'enzyme pendant 10 minutes à 25°C. Après incubation, l'activité de l'enzyme est mesurée par ajout d'un substrat chromogène adéquat (Figure 47). Celle-ci correspond à l'activité de l'enzyme qui n'a pas été inhibée de façon irréversible. Le rapport entre l'activité de l'enzyme après inactivation et l'activité de l'enzyme en absence d'inhibiteur, exprimé en pourcent, donne le pourcentage d'activité résiduelle de l'enzyme. Plus le pourcentage d'activité résiduelle de l'enzyme est faible, plus le pouvoir inhibiteur du composé testé est élevé.

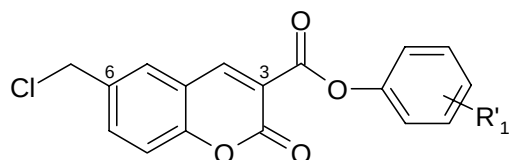
Les résultats de ce test de criblage, réalisé avec des concentrations en thrombine, inhibiteur et substrat (S-2238) de 2.32 nM, 2 µM et 40 µM respectivement, sont présentés dans les tableaux 6 à 11. Trois approches de pharmacomodulation ont été investiguées : la modulation de la chaîne latérale en position 3, le remplacement de la fonction chlorométhyle en position 6 et la modification du lien entre la coumarine et la chaîne latérale en position 3.

III.1.1.1.1. Modulation de la chaîne latérale en position 3

Tout d'abord, des composés esters et amides aliphatiques linéaires, ramifiés ou cycliques ont été évalués. Aucune activité n'a été observée avec ces composés. Une étude de l'influence d'un noyau aromatique sur l'activité inhibitrice a ensuite été réalisée (Tableau 6). Il apparaît que les composés possédant un groupement pyridine (pyrid-2-yl ou pyrid-3-yl) en position 3 ne présentent pas de pouvoir inhibiteur de thrombine (LP 12, MS 33). Par contre, la présence d'un groupement phényle à la même position permet d'obtenir une inhibition de la thrombine (MS 7). L'utilisation d'un autre noyau aromatique plus volumineux tel qu'un naphthalène (MS 38, MS 37) ou une quinoléine (LP 32, LP 31) entraîne une perte totale de l'activité. Il en est de même avec l'introduction d'un méthylène entre le phényle et le lien ester (MS 29).

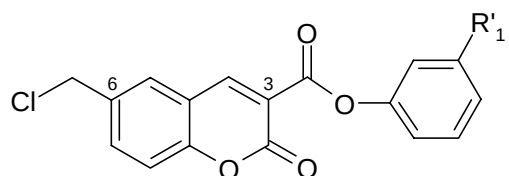
Une étude de la substitution du groupement phényle de la chaîne latérale en position 3 a également montré que celle-ci influençait fortement l'activité des composés (Tableau 7). En effet, lorsque ces derniers sont substitués en *para*, ils perdent totalement leur activité inhibitrice et ce, quelque soit la nature du substituant (LP 7, LP 16, LP 6). Les substitutions en *ortho* ne modifient pas l'activité des composés (MS 36, LP 15, LP 5). Par contre, les composés substitués en *meta* présentent un meilleur pouvoir inhibiteur de la thrombine (LP 8, LP 14, MS 34). La nature du groupement placé à cette position est très importante (Tableau 8). Les composés comprenant un halogène sont les plus actifs. Ceux-ci peuvent être classés selon leur efficacité dans l'ordre suivant : *m*-bromo-phényle (LP 53 ; 8 %) > *m*-chloro-phényle (LP 8 ; 10 %) > *m*-fluoro-phényle (LP 51 ; 24 %) > *m*-iodo-phényle (LP 14, 27 %). Les substituants nitro, méthoxy et trifluorométhyle donnent des composés peu actifs (LP 17, LP 55 et LP 54 respectivement).

Tableau 7: Test de criblage sur thrombine : esters benzéniques monosubstitués



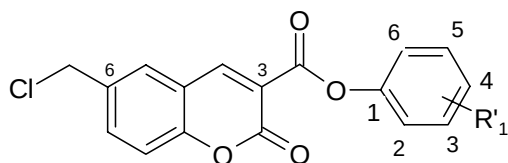
Composés	R' ₁	Activité résiduelle de la thrombine
MS 7	H	60 ± 9 %
MS 36	<i>o</i> - Cl	78 ± 8 %
LP 8	<i>m</i> - Cl	10 ± 2 %
LP 7	<i>p</i> - Cl	107 ± 12 %
LP 15	<i>o</i> - I	59 ± 13 %
LP 14	<i>m</i> - I	27 ± 8 %
LP 16	<i>p</i> - I	99 ± 10 %
LP 5	<i>o</i> - CH ₃	79 ± 3 %
MS 34	<i>m</i> - CH ₃	35 ± 3 %
LP 6	<i>p</i> - CH ₃	111 ± 20 %

Tableau 8: Test de criblage sur thrombine : esters benzéniques monosubstitués en *meta*



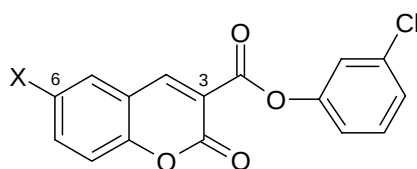
Composés	R' ₁	Activité résiduelle de la thrombine
MS 7	H	60 ± 9 %
LP 51	F	24 ± 6 %
LP 8	Cl	10 ± 2 %
LP 53	Br	8 ± 3 %
LP 14	I	27 ± 8 %
LP 17	NO ₂	80 ± 2 %
LP 55	OCH ₃	66 ± 4 %
LP 54	CF ₃	66 ± 21 %

Tableau 9 : Test de criblage sur thrombine : esters benzéniques disubstitués



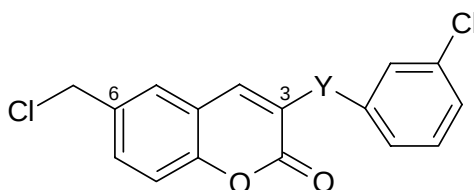
Composés	R' ₁	Activité résiduelle de la thrombine
LP 61	3-Cl ; 5-OCH ₃	103 ± 5 %
LP 73	2,3 di Cl	100 ± 12 %
LP 74	2,5 di Cl	1 ± 0.1 %
LP 72	2,6 di Cl	101 ± 11 %
LP 75	3,5 di Cl	102 ± 10 %

Tableau 10: Test de criblage sur thrombine : esters benzéniques avec modulation de la chaîne latérale en position 6



Composés	X	Activité résiduelle de la thrombine
LP 8	CH ₂ Cl	10 ± 2 %
LP 70	CH ₃	70 ± 4 %
LP 69	H	107 ± 7 %
LP 46	CH ₂ OCOCH ₃	91 ± 15 %

Tableau 11: Test de criblage sur thrombine : nature du lien entre la coumarine et la chaîne latérale en position 3



Composés	Y	Activité résiduelle de la thrombine
LP 8	COO	10 ± 2 %
LP 67	CONH	97 ± 2 %
LP 66	COS	107 ± 12 %
LP 103	CO	100 ± 15 %

Parmi les dérivés disubstitués (Tableau 9), seul l'ester 2,5-dichloro-phényle (LP 74) présente un important pouvoir inhibiteur avec une perte totale de l'activité résiduelle de la thrombine. Tous les autres composés sont inactifs.

III.1.1.1.2. Remplacement du groupement chlorométhyle en position 6

Selon le mécanisme d'action proposé dans la section I.5., la présence du groupement chlorométhyle en position 6 de nos coumarines serait indispensable à une inhibition irréversible. Afin de vérifier cette hypothèse, des composés substitués en position 6 par un groupement non partant ont été testés (LP 70, LP 69). Il apparaît ainsi clairement que le remplacement du groupement chlorométhyle entraîne une perte importante du pouvoir inhibiteur (Tableau 10). Il en est de même pour le groupement acétoxyméthyle (LP 46). Ceci peut s'expliquer par le caractère nucléofuge faible de l'acétate par rapport au chlore. Ces résultats concordent donc avec notre mécanisme d'inhibition hypothétique.

III.1.1.1.3. Etude du lien entre la coumarine et la chaîne latérale en position 3

Une étude de la nature du lien entre la coumarine et la chaîne latérale en position 3 a finalement été réalisée. Les résultats indiquent que celle-ci est très importante pour l'activité du composé (Tableau 11). Ainsi, seul le lien ester permet d'obtenir un effet inhibiteur, les composés comprenant un lien de type amide, thioester ou cétone étant inactifs (LP 67, LP 66, LP 103 respectivement).

III.1.1.1.4. Conclusions

Les esters benzéniques monosubstitués en *meta* par un groupement halogène (LP 53 > LP 8 > LP 51 > LP 14) présentent donc un pouvoir inhibiteur de thrombine important. Il en est de même pour l'ester 2,5-dichloro-phényle (LP 74). Ce dernier constitue le composé le plus actif sur thrombine. Dans les conditions de ce test, il fournit une inhibition totale de l'activité de l'enzyme. De plus, la présence d'une fonction chlorométhyle en position 6 et d'un lien ester entre la coumarine et la chaîne latérale en position 3 est indispensable à l'activité inhibitrice.

Dès lors, les composés LP 53, LP 8, LP 51, LP 14 et LP 74 ont été sélectionnés afin de déterminer de façon précise leur pouvoir inhibiteur envers la thrombine. Celui-ci a été évalué grâce à la détermination des paramètres cinétiques d'inactivation k_i et K_I .

III.1.1.2. Etude des paramètres cinétiques d'inactivation

Pour rappel, l'interaction d'un inhibiteur basé sur le mécanisme avec une enzyme répond au schéma réactionnel simplifié décrit par la figure 37 où E représente l'enzyme, I l'inhibiteur basé sur le mécanisme, E*I le complexe chimérique enzyme-inhibiteur et E_i l'enzyme inactivée de façon irréversible. Cette interaction est caractérisée par les constantes k_i , constante de vitesse de premier ordre pour l'inactivation à concentration infinie en inhibiteur et K_I , constante apparente de dissociation d'un complexe enzyme-inhibiteur situé en amont du k_i (voir section II.1.2.3.1).

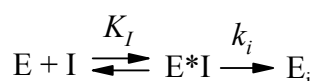


Figure 37 : Modèle simplifié pour l'inactivation

Le pouvoir inactivateur de l'inhibiteur peut ainsi être caractérisé par le rapport k_i/K_I . Plus ce rapport est élevé, plus la formation du complexe E_i est efficace et rapide et plus le pouvoir inhibiteur du composé est élevé.

En raison de l'efficacité de nos inhibiteurs vis-à-vis de la thrombine, la méthode continue a été utilisée afin de déterminer les constantes cinétiques d'inactivation. Dans cette technique, la réaction d'inactivation est ralentie par la mise en compétition, vis-à-vis du site actif de l'enzyme, de l'inhibiteur et d'un substrat chromogène. Elle peut être décrite par le schéma réactionnel de la figure 40 où E représente l'enzyme libre, I l'inhibiteur, E*I le complexe chimérique enzyme-inhibiteur, E_i l'enzyme inactivée de façon irréversible, S le substrat, ES le complexe enzyme-substrat et P le chromophore produit. Ce modèle est caractérisé par les constantes cinétiques k_i et K_I mais également par la constante de Michaelis-Menten (K_m) et par la constante catalytique (k_{cat}).

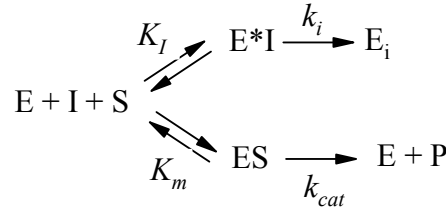


Figure 40: Schéma réactionnel pour l'utilisation de la méthode de compétition

La vitesse de réaction de chaque voie est proportionnelle à la concentration de l'enzyme E non inhibée de façon irréversible. La vitesse de production du chromophore est donc directement liée à la vitesse d'inactivation de l'enzyme et permet de contrôler en continu la progression de la réaction d'inactivation. Elle est caractérisée par l'équation 29 où v_0 représente la vitesse initiale de la réaction et π la constante de vitesse. En définissant la concentration modifiée en inhibiteur $[I]'$ par l'équation 30, la constante π est définie selon l'équation 31.

$$v = v_0 \times \exp(-\pi \times t) \quad \text{Équation 29}$$

$$[I]' = \frac{[I]}{\left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right)} \quad \text{Équation 30}$$

$$\pi = \frac{k_i \times [I]'}{K_I + [I]'} \quad \text{Équation 31}$$

La représentation de cette constante π en fonction de la concentration modifiée en inhibiteur permet la détermination des constantes cinétiques k_i et K_I (voir section II.1.2.3.3).

III.1.1.2.1. Détermination de la constante de Michaelis-Menten du Chromozym TH

Le développement mathématique de la méthode continue nécessite la connaissance de la valeur de la constante de Michaelis-Menten du substrat chromogène. La courbe de Michaelis-Menten du Chromozym TH a donc été réalisée (Figure 48). Celle-ci est caractérisée par l'équation de Michaelis-Menten (équation 32) où v_0 est la vitesse initiale de l'enzyme et v_{max} la vitesse initiale maximale de l'enzyme à saturation (voir section II.1.2.4).

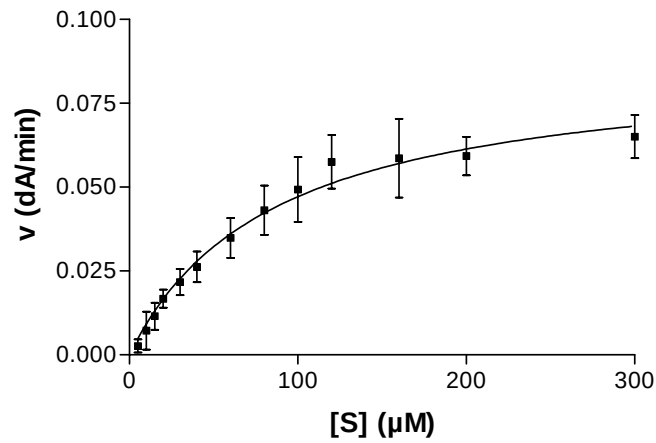


Figure 48 : Courbe de Michaelis-Menten du Chromozym TH :
 $v_{max} = 3.4 \pm 0.2 \text{ nmoles.min}^{-1}$ et $K_m = 86.25 \pm 9.46 \text{ μM}$

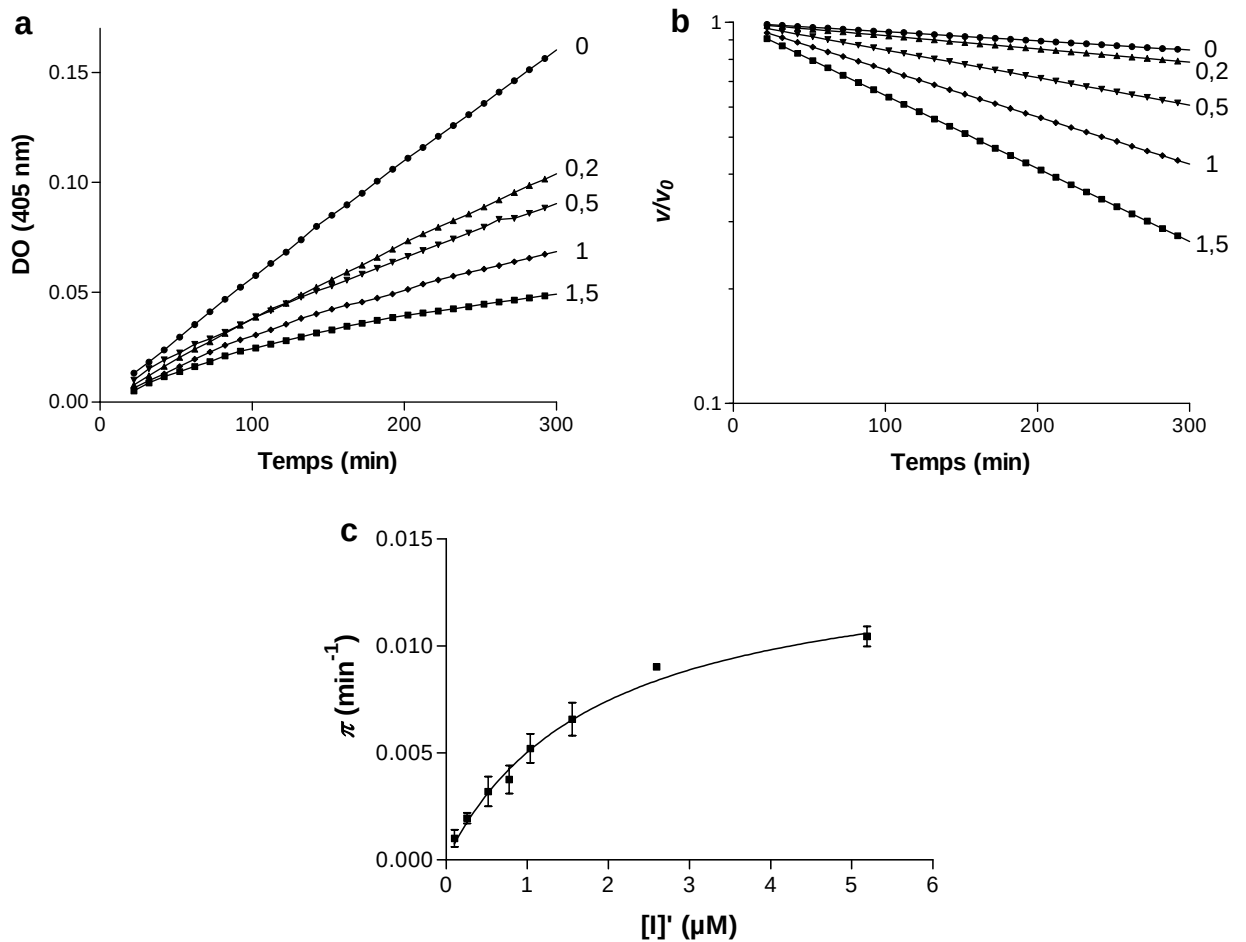


Figure 49 : Inactivation de la thrombine par le LP 8 (0.2 μM-10 μM) : augmentation de DO à 405 nm au cours du temps (a), vitesse d'apparition du chromophore en fonction du temps (b) et représentation de la constante π en fonction de la concentration modifiée en inhibiteur (c) :
 $k_i = 0.01439 \pm 0.0007968 \text{ min}^{-1}$; $K_I = 1.865 \pm 0.02057 \text{ μM}$; $k_i/K_I = 7716 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$

$$v_0 = \frac{v_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

Équation 32

La courbe de la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration en substrat possède une droite asymptote horizontale d'ordonnée v_{max} . Il existe ainsi une vitesse maximale qui ne peut être dépassée, même en augmentant la concentration en substrat. Celle-ci vaut 3.4 ± 0.2 nmoles.min⁻¹. La constante de Michaelis-Menten (K_m) représente la concentration en substrat à laquelle la vitesse est égale à $v_{max}/2$. Elle est égale à 86.25 ± 9.46 µM. Cette constante donne une appréciation de l'affinité du substrat pour l'enzyme.

III.1.1.2.2. Détermination des constantes cinétiques d'inactivation k_i et K_i

L'analyse de la détermination des constantes cinétiques du *m*-chloro-phényle (LP 8) est présentée à la figure 49. L'augmentation de DO est observée à 405 nm au cours du temps (Figure 49, a). En absence d'inhibiteur, celle-ci doit être linéaire et la vitesse de production du chromophore doit constante. En effet, l'observation d'un effet avec l'inhibiteur doit pouvoir être strictement attribué à la présence de cet inhibiteur et non à un ralentissement de la réaction en raison d'une quantité décroissante de substrat. En présence d'inhibiteur, l'augmentation de DO n'est pas linéaire. La courbe s'infléchit au cours du temps. Un phénomène de compétition entre la réaction d'inhibition de l'enzyme et la réaction d'hydrolyse du substrat s'est en effet établi. L'inflexion de la courbe est proportionnelle à la concentration en inhibiteur.

Comme il a été expliqué précédemment, la vitesse de production du chromophore est directement liée à la vitesse d'inactivation de l'enzyme et permet de contrôler en continu la progression de la réaction d'inhibition. Cette vitesse est donc représentée en fonction du temps sur un graphe semi-logarithmique (Figure 49, b). En absence d'inhibiteur, elle est relativement constante. En présence d'inhibiteur, elle est schématisée par une droite décroissante. Elle diminue donc de façon exponentielle au cours du temps. Elle traduit ainsi une augmentation exponentielle de la vitesse d'inactivation au cours du temps. L'inhibiteur agit donc d'une manière dépendante du temps. Ce mode d'action est un des critères expérimentaux caractérisant les inhibiteurs basés sur le mécanisme [Silverman, 1995]. En présence de concentrations croissantes en inhibiteur, la pente de la droite, soit la constante de vitesse π , est de plus en plus forte. La vitesse d'inactivation de l'enzyme est donc proportionnelle à la concentration en inhibiteur.

La constante de vitesse π est représentée en fonction de la concentration modifiée en inhibiteur $[I]'$ (Figure 49, c). En intégrant les concentrations en inhibiteur, en substrat ainsi que la constante de Michaelis-Menten du substrat, cette concentration modifiée en inhibiteur tient compte du phénomène de compétition existant entre l'inhibiteur et le substrat. En effet, ce phénomène provoque une diminution de la quantité d'inhibiteur pouvant inactiver l'enzyme puisque celle-ci interagit avec le substrat. La représentation de la constante de vitesse π en fonction de la concentration modifiée en inhibiteur est une courbe qui possède une droite asymptote horizontale d'ordonnée k_i . La constante k_i est égale à 0.01439 ± 0.0007968 min⁻¹. Elle indique la vitesse à laquelle la réaction d'inactivation se déroule pour une concentration infinie en inhibiteur. Quant à la constante K_i , elle est égale à 1.865 ± 0.02057 µM. Elle représente la concentration modifiée en inhibiteur à laquelle la vitesse d'inhibition est égale à la moitié de la vitesse d'inhibition maximale pouvant être obtenue. Elle donne une appréciation de l'affinité et de la reconnaissance de l'enzyme vis-à-vis de l'inhibiteur. Le rapport k_i/K_i , en combinant ces notions de vitesse et d'affinité,

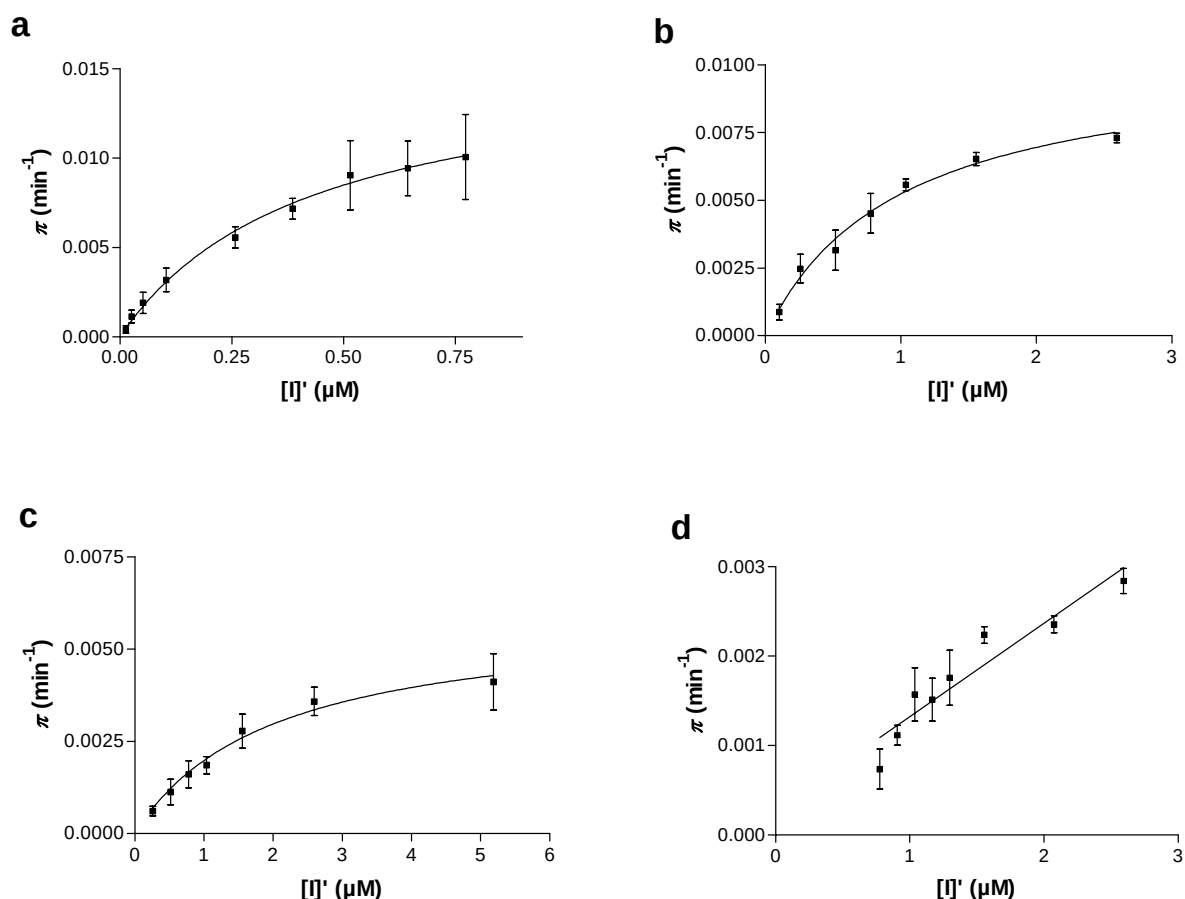


Tableau 12 : Constantes cinétiques d'inactivation sur thrombine

Composés	k_i (min^{-1})	K_I (μM)	k_i/K_I ($\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)*
2,5-dichloro-phényle (LP 74)	0.01568 ± 0.0009334	0.4237 ± 0.05329	37 007
<i>m</i> -bromo-phényle (LP 53)	0.01036 ± 0.0008190	0.9828 ± 0.1675	10 541
<i>m</i> -chloro-phényle (LP 8)	0.01439 ± 0.0007968	1.865 ± 0.02057	7716
<i>m</i> -fluoro-phényle (LP 14)	0.005937 ± 0.0004654	2.002 ± 0.3164	2966
<i>m</i> -iodo-phényle (LP 51)	-	-	1210

* erreurs standards inférieures à 20 %

détermine le pouvoir inhibiteur du composé. Pour rappel, plus ce rapport est élevé, plus le pouvoir inhibiteur du composé est important. Le pouvoir inhibiteur du *m*-chloro-phényle (LP 8) est de $7716 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Les constantes cinétiques d'inactivation des différents composés sélectionnés ont été calculées selon cette même démarche (Figure 50). Remarquons que pour le *m*-iodo-phényle (LP 51, Figure 50 d), les concentrations modifiées en inhibiteur utilisées étaient fortement inférieures au K_I . L'équation 31 peut donc être simplifiée selon l'équation 33. Ainsi, seul le rapport k_i/K_I , soit la pente de la droite représentant la constante π en fonction de la concentration modifiée en inhibiteur $[I]'$, peut être obtenu.

$$\pi = \frac{k_i \times [I]'}{K_I + [I]'} \quad \text{Équation 31}$$

$$\pi = \frac{k_i}{K_I} \times [I]' \quad \text{Équation 33}$$

Le tableau 12 récapitule les différents paramètres d'inactivation ainsi mesurés. Ces résultats montrent que l'ester 2,5-dichoro-phényle (LP 74) est le composé le plus actif sur thrombine. Il présente un pouvoir inhibiteur de $37007 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Les esters benzéniques monosubstitués en *meta* par un groupement halogène peuvent être classés selon leur activité dans l'ordre suivant : *m*-bromo-phényle (LP 53 ; $10541 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) > *m*-chloro-phényle (LP 8 ; $7716 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) > *m*-fluoro-phényle (LP 51 ; $2966 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) > *m*-iodo-phényle (LP 14 ; $1210 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Ces résultats coïncident avec ceux du test de criblage.

III.1.2. Etude du pouvoir inhibiteur des coumarines vis-à-vis du facteur Xa

III.1.2.1. Test de criblage

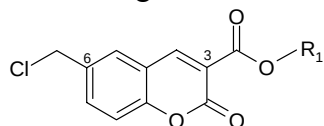
Un test de criblage *in vitro* sur FXa a été mis au point. Ce test est basé sur le même principe que celui réalisé pour la thrombine. Toutefois, une étude des concentrations optimales en enzyme, inhibiteur et substrat (Chromozym X) à utiliser a dû être réalisée. Celles-ci ont ainsi été définies comme étant de 5.8 nM, 5 μM et 300 μM , respectivement.

Les différents composés ont alors été criblés en se focalisant sur les trois axes de pharmacomodulations précédemment étudiés dans le cas de la thrombine. Pour rappel, ces derniers consistaient à évaluer l'influence de la modification de la chaîne latérale en position 3, du remplacement du groupement chlorométhyle en position 6 et de la nature du lien entre la coumarine et la chaîne latérale en position 3. Ces résultats de criblage sont présentés dans les tableaux 13 à 19.

III.1.2.1.1. Modulation de la chaîne latérale en position 3

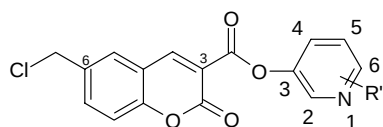
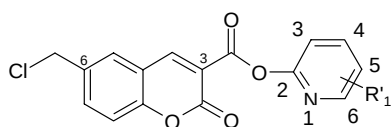
L'étude de l'influence d'un noyau aromatique sur l'activité inhibitrice montre que les esters pyridiniques ne présentent pas ou peu d'activité inhibitrice envers le FXa (MS 33, LP 12) (Tableau 13). De plus, la substitution de ces esters de type pyrid-2-yl et pyrid-3-yl ne permet pas de les rendre actifs (Tableau 14).

Tableau 13 : Test de criblage sur FXa : esters aromatiques



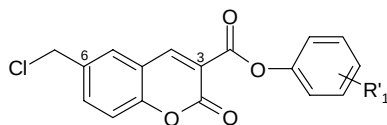
Composés	R ₁	Activité résiduelle du FXa
MS 7		59 ± 16 %
MS 33		114 ± 15 %
LP 12		89 ± 15 %

Tableau 14 : Test de criblage sur FXa : séries pyrid-2-yl et pyrid-3-yl



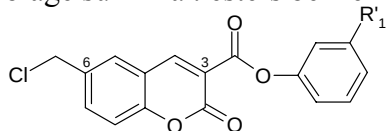
Composés	R' ₁	Activité résiduelle du FXa	Composés	R' ₂	Activité résiduelle du FXa
LP 12	H	89 ± 15 %	MS 33	H	114 ± 15 %
LP 19	5-Cl	100 ± 4 %	LP 64	5-CH ₃	108 ± 9 %
LP 18	6-Cl	87 ± 5 %	LP 1	6-CH ₃	109 ± 9 %
LP 26	4-CH ₃	98 ± 7 %	LP 3	2-Cl	110 ± 9 %
LP 22	6-CH ₃	99 ± 5 %	LP 2	5-Cl	104 ± 12 %
			LP 4	2-Br	104 ± 16 %
			LP 11	2-NO ₂	99 ± 3 %
			LP 19	2-NO ₂ ; 6-CH ₃	102 ± 2 %

Tableau 15: Test de criblage sur FXa : esters benzéniques monosubstitués



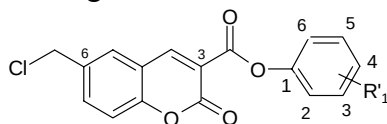
Composés	R' ₁	Activité résiduelle du FXa
MS 7	H	59 ± 16 %
MS 36	<i>o</i> -Cl	134 ± 9 %
LP 8	<i>m</i> -Cl	29 ± 3 %
LP 7	<i>p</i> -Cl	102 ± 6 %
LP 15	<i>o</i> -I	92 ± 13 %
LP 14	<i>m</i> -I	73 ± 9 %
LP 16	<i>p</i> -I	80 ± 8 %
LP 5	<i>o</i> -CH ₃	103 ± 12 %
MS 34	<i>m</i> -CH ₃	78 ± 16 %
LP 6	<i>p</i> -CH ₃	72 ± 8 %

Tableau 16: Test de criblage sur FXa : esters benzéniques monosubstitués en *meta*



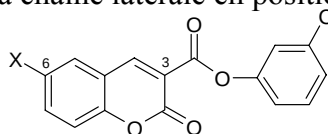
Composés	R' ₁	Activité résiduelle du FXa
MS 7	H	59 ± 16 %
LP 51	F	61 ± 16 %
LP 8	Cl	29 ± 3 %
LP 53	Br	33 ± 3 %
LP 14	I	73 ± 9 %
LP 17	NO ₂	124 ± 32 %
LP 55	OCH ₃	108 ± 21 %
LP 54	CF ₃	134 ± 13 %

Tableau 17 : : Test de criblage sur FXa : esters benzéniques disubstitués



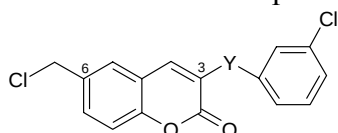
Composés	R' ₁	Activité résiduelle du FXa
LP 61	3-Cl ; 5-OCH ₃	126 ± 28 %
LP 73	2,3 di Cl	125 ± 22 %
LP 74	2,5 di Cl	39 ± 6 %
LP 72	2,6 di Cl	109 ± 21 %
LP 75	3,5 di Cl	73 ± 8 %

Tableau 18: Test de criblage sur FXa : esters benzéniques avec modulation de la chaîne latérale en position 6



Composés	X	Activité résiduelle du FXa
LP 8	CH ₂ Cl	29 ± 3 %
LP 70	CH ₃	61 ± 3 %
LP 69	H	77 ± 7 %
LP 46	CH ₂ OCOCH ₃	82 ± 7 %

Tableau 19: Test de criblage sur FXa : nature du lien entre la coumarine et la chaîne latérale en position 3



Composés	Y	Activité résiduelle du FXa
LP 8	COO	29 ± 3 %
LP 67	CONH	89 ± 7 %
LP 66	COS	60 ± 3 %
LP 103	CO	83 ± 2 %

L'ester benzénique présente quant à lui un faible pouvoir inhibiteur de FXa (MS 7) (Tableau 13). La présence d'un substituant sur le noyau phényle de la chaîne latérale en position 3 influence fortement le pouvoir inhibiteur (Tableau 15). Ainsi, la substitution en *ortho* mène à des composés inactifs quelque soit la nature du substituant (MS 36, LP 15, LP 5). Avec un groupement iode ou méthyle, la position *meta* ou *para* ne semble pas modifier de manière très importante l'activité (LP 14, LP 16, MS 34, LP 6). Par contre, le *m*-chloro-phényle (LP 8) présente une bonne activité tandis que le *p*-chloro-phényle (LP 7) est inactif.

La nature du groupement en position *meta* modifie fortement l'inhibition du FXa (Tableau 16). En effet, la présence d'un chlore (LP 8) ou d'un brome (LP 53) permet d'augmenter le pouvoir inhibiteur tandis que celle d'un fluor (LP 51) ou d'un iode (LP 14) ne semble avoir que peu d'effet. Les substituants nitro, méthoxy et trifluorométhyle donnent quant à eux des composés inactifs (LP 17, LP 55 et LP 54 respectivement).

Parmi les esters disubstitués (Tableau 17), les meilleurs composés comprennent un chlore en position *meta* par rapport à la liaison ester. Le 2,5-dichloro-phényle (LP 74) est plus actif que le 3,5-dichloro-phényle (LP 75) qui ne présente qu'un faible pouvoir inhibiteur. Tous les autres composés disubstitués sont inactifs.

III.1.2.1.2. Remplacement du groupement chlorométhyle

La substitution du chlore par un groupement non partant entraîne une perte importante du pouvoir inhibiteur (LP 70, LP 69) (Tableau 18). Il en est de même pour le groupement acétoxyméthyle (LP 46) dont l'acétate possède un caractère nucléofuge faible par rapport au chlore. Ces résultats concordent avec le mécanisme d'action des coumarines proposé dans la section I.5. selon lequel la présence du groupement chlorométhyle est indispensable à une inhibition irréversible.

III.1.2.1.3. Modulation du lien entre la coumarine et la chaîne latérale en 3

La présence du lien ester (LP 8) est très importante pour l'activité inhibitrice (Tableau 19). Les liens de type amide, cétone ou thioester donnent des composés moins actifs (LP 67, LP 66 et LP 103 respectivement).

III.1.2.1.4. Conclusions

Les esters benzéniques monosubstitués en *meta* par un chlore (LP 8) ou un brome (LP 53) présentent un bon pouvoir inhibiteur de FXa. Il en est de même pour le dérivé ester 2,5-dichloro-phényle (LP 74). La présence d'une fonction chlorométhyle en position 6 et d'un lien ester entre la coumarine et la chaîne latérale en position 3 est favorable au pouvoir inhibiteur.

L'analyse des données de criblage sur thrombine et sur FXa semble montrer que, dans le cas des coumarines étudiées, les relations structure-activité sont semblables pour les deux enzymes. Afin de conforter ces résultats, les composés LP 8, LP 53 et LP 74 ont été sélectionnés pour déterminer de façon précise leur pouvoir inhibiteur envers le FXa grâce à l'étude de leurs paramètres cinétiques d'inactivation k_i et K_I .

III.1.2.2. Etude des paramètres cinétiques d'inactivation

Comme dans le cas de la thrombine, la méthode continue a d'abord été choisie afin de déterminer les constantes cinétiques d'inactivation des composés vis-à-vis du FXa.

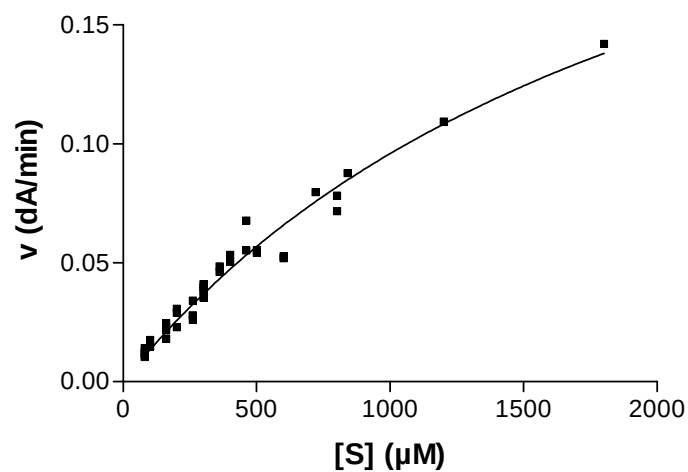


Figure 51 : Courbe de Michaelis-Menten du Chromozym X :
 $v_{max} = 12 \pm 1 \text{ nmoles.min}^{-1}$ et $K_m = 2195 \pm 325.5 \text{ } \mu\text{M}$

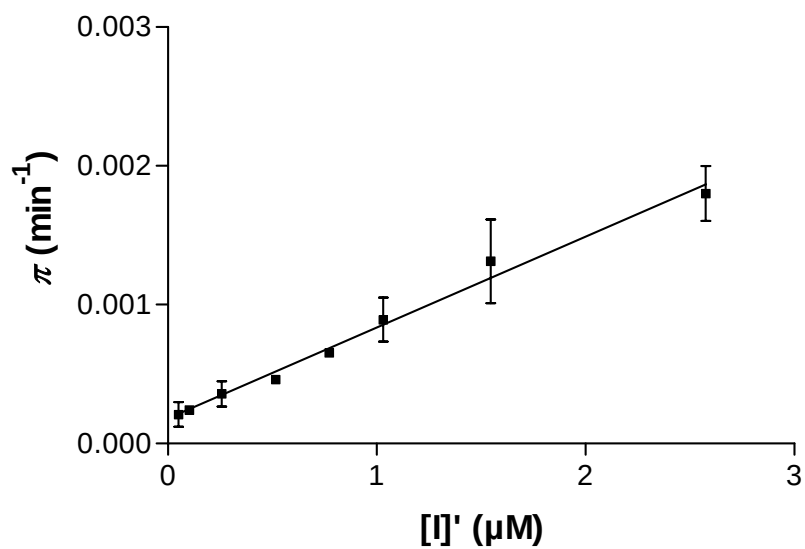


Figure 52 : Inactivation du FXa par le LP 8 (0.01-5 μM),
 étude par la méthode de compétition : $k_i/K_I = 655 \pm 28.1 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$

III.1.2.2.1. Détermination de la constante de Michaelis-Menten du Chromozym X

La courbe de Michaelis-Menten du Chromozym X a tout d'abord été réalisée afin de déterminer la valeur de la constante K_m nécessaire lors de l'application de la méthode continue (Figure 51). Celle-ci est égale à $2195 \pm 325.5 \mu\text{M}$. La vitesse maximale est quant à elle égale à $12 \pm 1 \text{ nmoles.min}^{-1}$. Ce substrat est donc peu affiné pour l'enzyme.

III.1.2.2.2. Détermination des constantes cinétiques d'inactivation k_i et K_I

Le *m*-chloro-phényle (LP 8) a été évalué par la méthode continue (Figure 52). Comme dans le cas du *m*-iodo-phényle (LP 51) testé sur thrombine, les concentrations modifiées en inhibiteur utilisées étaient fortement inférieures au K_I de sorte que seul le rapport k_i/K_I a pu être déterminé. Celui-ci vaut $655 \pm 28,1 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Le *m*-chloro-phényle ne présente donc pas un important pouvoir inhibiteur de FXa. Dès lors, nous avons entrepris d'utiliser la méthode discontinue afin de déterminer les constantes cinétiques d'inactivation de ce composé.

Cette méthode consiste à suivre la perte d'activité de l'enzyme au cours du temps en présence de différentes concentrations en inhibiteur. Cette perte d'activité est décrite par l'équation 10 où $[E]_T$ est la concentration totale en enzyme et $[\varepsilon]$ la concentration de l'enzyme non inhibée de façon irréversible au temps t . Elle est caractérisée par la constante de vitesse k_{obs} décrite par l'équation 11. La représentation de la constante k_{obs} en fonction de la concentration initiale en inhibiteur permet de déterminer les constantes cinétiques k_i et K_I (voir section II.1.2.3.2).

$$[\varepsilon] = [E]_T \times \exp(-k_{obs} \times t) \quad \text{Équation 10}$$

$$k_{obs} = \frac{k_i \times [I]}{K_I + [I]} \quad \text{Équation 11}$$

Cependant, lorsque les concentrations en inhibiteur utilisées sont fortement inférieures au K_I , la constante k_{obs} peut être approximée selon l'équation 12. Ainsi, seul le rapport k_i/K_I , exprimé sous forme $k_{obs}/[I]$, peut être obtenu. Il s'agit de la pente de la droite représentant la constante k_{obs} en fonction de la concentration initiale en inhibiteur pour des concentrations en inhibiteur inférieures au K_I .

$$k_{obs} \approx \frac{[k_i]}{[K_I]} \times [I] \quad \text{Équation 12}$$

L'analyse de la détermination des constantes cinétiques du *m*-chloro-phényle (LP 8) grâce à cette méthode est présentée à la figure 53. En présence d'inhibiteur, l'activité résiduelle de l'enzyme diminue de façon exponentielle au cours du temps (Figure 53, a). Cette perte d'activité est d'autant plus rapide que la concentration en inhibiteur est élevée. La représentation de ces pertes d'activité au cours du temps sur un graphe semi-logarithmique donne une série de droites décroissantes dont la pente, soit constante de vitesse k_{obs} , augmente avec la concentration en inhibiteur (Figure 53, b). Cette constante de vitesse k_{obs} est représentée en fonction de la concentration initiale en inhibiteur (Figure 53, c). Les concentrations initiales en inhibiteur utilisées étant fortement inférieures au K_I , on obtient une

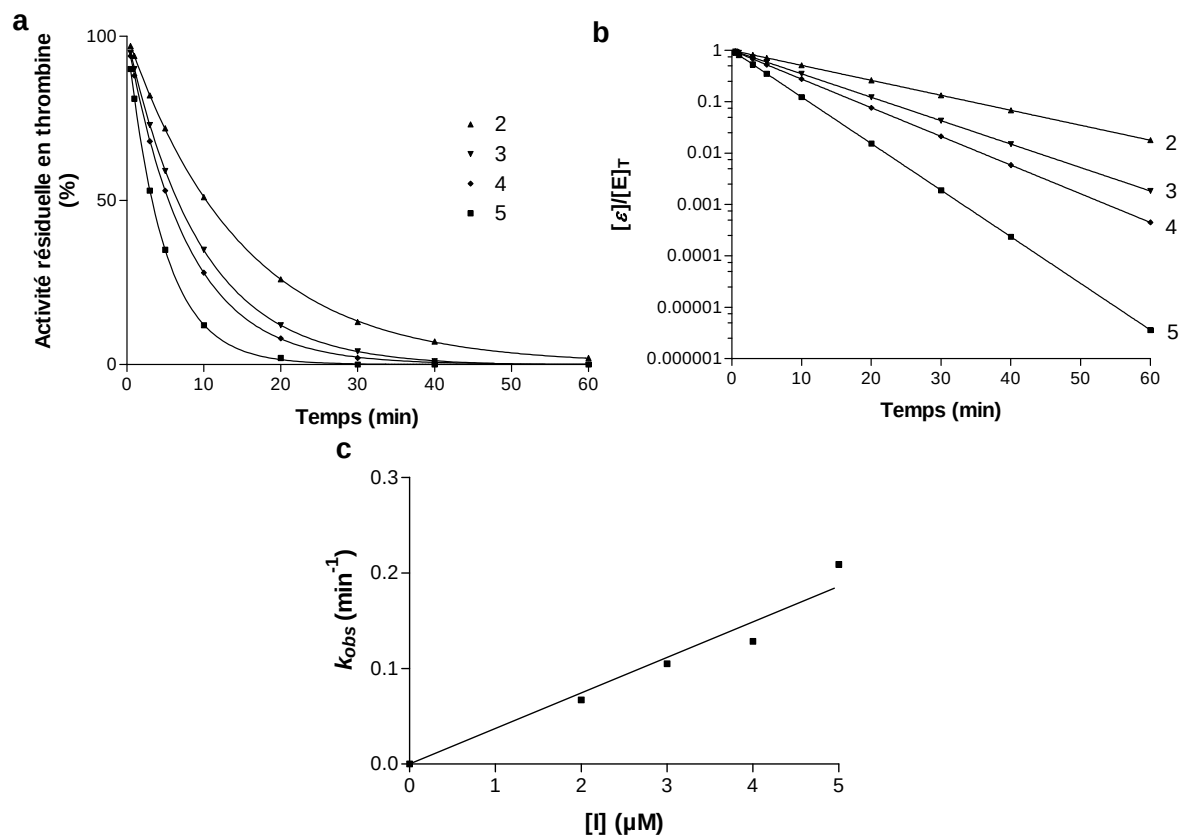


Figure 53: Inactivation du FXa par le LP 8 (2-5 μM).
Etude par la méthode des prélèvements : perte d'activité au cours du temps en présence de concentrations croissantes en inhibiteur (**a**, **b**) et représentation de la constante k_{obs} en fonction de la concentration initiale en inhibiteur, $k_{obs}/[I] = 619.5 \pm 36.4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (**c**)

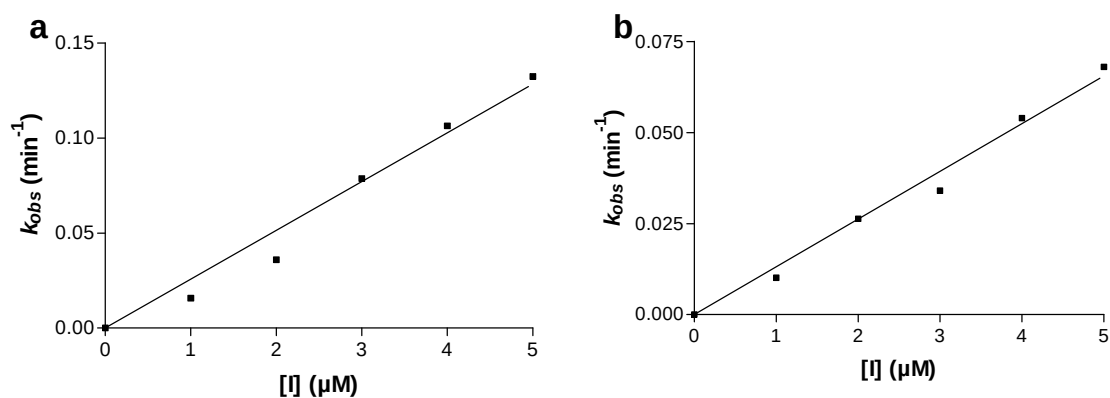


Figure 54: Inactivation du FXa par le LP 53 (1-5 μM) : $k_{obs}/[I] = 428 \pm 19.3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (**a**)
et par le LP 74 (1-5 μM) : $k_{obs}/[I] = 218.5 \pm 6.77 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (**b**)

Tableau 20 : Constantes cinétiques d'inactivation sur facteur Xa

Composés	$k_{obs}/[I]$ ($M^{-1}.s^{-1}$)
<i>m</i> -chloro-phényle (LP 8)	619.5 ± 36.4
<i>m</i> -bromo-phényle (LP 53)	428 ± 19.3
2,5-dichloro-phényle (LP 74)	218.5 ± 6.77

Tableau 21 : Constantes cinétiques d'inactivation sur thrombine et sur facteur Xa

Composés	Pouvoir inhibiteur envers la thrombine k_i/K_I ($M^{-1}.s^{-1}$)*	Pouvoir inhibiteur envers le FXa $k_{obs}/[I]$ ($M^{-1}.s^{-1}$)*
2,5-dichloro-phényle (LP 74)	37 000	220
<i>m</i> -bromo-phényle (LP 53)	10 540	430
<i>m</i> -chloro-phényle (LP 8)	7720	620
<i>m</i> -fluoro-phényle (LP 14)	2970	nd
<i>m</i> -iodo-phényle (LP 51)	1210	nd

*erreurs standards inférieures à 20 % ; nd : non déterminé

droite dont la pente vaut le rapport k_i/K_I . Celui-ci, exprimé sous forme $k_{obs}/[I]$, vaut $619,5 \pm 36,4 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Pour rappel, plus ce rapport est élevé, plus le pouvoir inhibiteur du composé est important.

Les méthodes continue et discontinue donnent donc des résultats comparables. La méthode discontinue sera préférée pour l'évaluation de composés présentant un faible pouvoir inhibiteur tandis que la méthode continue sera adoptée pour des composés possédant un pouvoir inhibiteur élevé. En effet, pour des composés à faible pouvoir inhibiteur la méthode continue est peu commode car le phénomène de compétition diminue la réaction d'inhibition. Une faible réaction d'inhibition sera dès lors difficile à observer, voire indétectable. Pour les composés à pouvoir inhibiteur élevé, la méthode discontinue peut être inapplicable en raison de la rapidité de la perte d'activité enzymatique. Par exemple, lors du test de criblage sur thrombine, le dérivé 2,5-dichloro-phényle (LP 74) inhibe totalement l'activité de l'enzyme en 10 minutes. Il aurait ainsi été difficile de suivre la perte d'activité enzymatique au cours du temps en présence de ce composé.

Néanmoins, d'une manière générale, quand c'est possible, la méthode de compétition est préférée. En effet, celle-ci est beaucoup plus rapide car la réaction d'inhibition est suivie en continu. Si une inactivation complète de l'enzyme est observée, une concentration inférieure en inhibiteur peut être testée. Chaque condition peut être réalisée rapidement sans période d'incubation et donne directement la valeur de la constante π . Ces deux méthodes sont donc complémentaires et donnent toutes deux des résultats comparables. Le choix de l'une ou l'autre repose essentiellement sur l'efficacité du composé à tester.

La méthode discontinue a donc été choisie pour évaluer le pouvoir inhibiteur envers le FXa des composés sélectionnés dans le test de criblage (Figure 54). Le tableau 20 récapitule les valeurs de $k_{obs}/[I]$ obtenues pour chaque composé. Il apparaît ainsi que le *m*-chloro-phényle (LP 8) possède un faible pouvoir inhibiteur envers le FXa avec un $k_{obs}/[I]$ de $619,5 \pm 36,4 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Il en est de même pour le *m*-bromo-phényle (LP 53 ; $428 \pm 19,3 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) et l'ester 2,5-dichloro-phényl (LP 74 ; $218,5 \pm 6,77 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$). Ces résultats correspondent à ceux du test de criblage. Celui-ci permet donc bien une première évaluation simple et rapide des composés synthétisés.

III.1.3. Comparaison du pouvoir inhibiteur des coumarines vis-à-vis de la thrombine et du facteur Xa

D'une manière générale, les tests de criblage ont montré que les composés les plus actifs sur FXa sont aussi les plus puissants inhibiteurs de thrombine. L'étude de l'influence d'un noyau aromatique en position 3 sur l'activité inhibitrice a ainsi démontré que les esters pyridiniques non substitués étaient inactifs. Par contre, le remplacement du groupement pyridine par un phényle permet d'obtenir une inhibition des deux enzymes. La substitution de ce groupement phényle influence fortement le pouvoir inhibiteur des composés. Les composés comprenant un halogène en position *meta* sont les plus actifs. Parmi les dérivés disubstitués, seul l'ester 2,5-dichloro-phényle présente un important pouvoir inhibiteur de thrombine, les autres composés étant inactifs. Le FXa est inhibé par l'ester 2,5-dichloro-phényle mais également par l'ester 3,5-dichloro-phényle. Ce dernier ne présente cependant qu'un faible pouvoir inhibiteur de FXa. En outre, la présence de la fonction chlorométhyle en position 6 et du lien ester entre la coumarine et la chaîne latérale en position 3 est indispensable pour obtenir une inhibition efficace de la thrombine et du FXa.

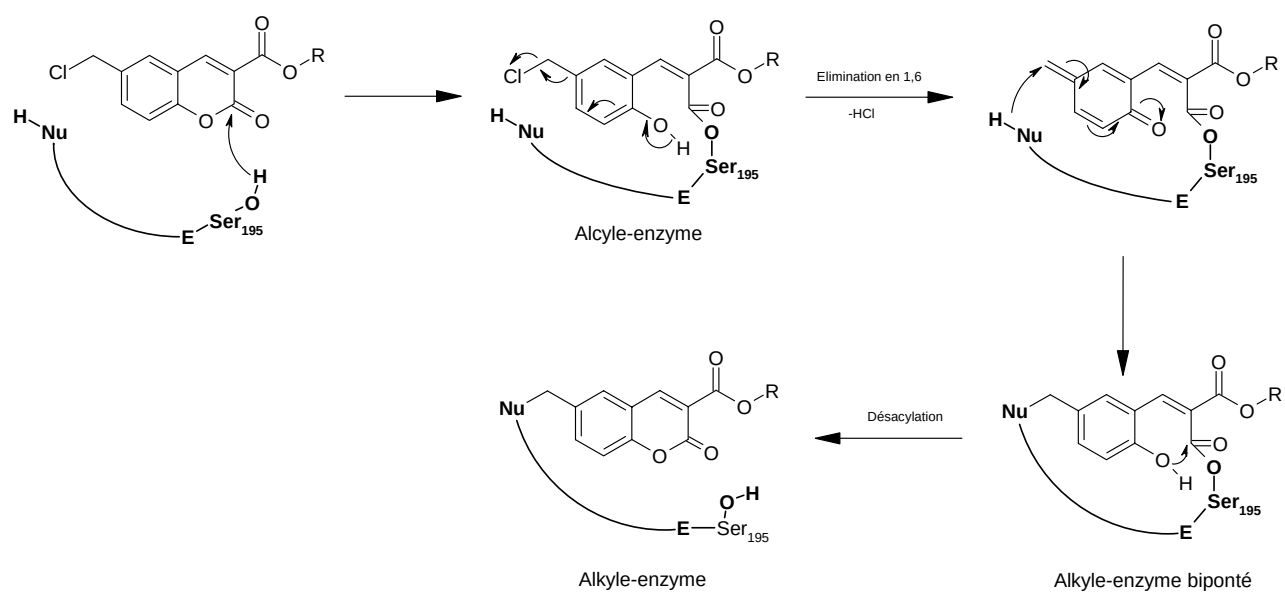


Figure 55 : Mécanisme d'action hypothétique des coumarines

La détermination des paramètres cinétiques d'inactivation a permis d'évaluer de façon plus précise le pouvoir inactivateur des composés s'étant révélés les plus actifs lors du test de criblage (Tableau 21). Ainsi, au niveau de la thrombine, les composés peuvent être classés selon leur pouvoir inhibiteur dans l'ordre suivant : 2,5-dichoro-phényle (LP 74 ; $37000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) > *m*-bromo-phényle (LP 53 ; $10540 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) > *m*-chloro-phényle (LP 8 ; $7720 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) > *m*-fluoro-phényle (LP 51 ; $2970 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) > *m*-iodo-phényle (LP 14 ; $1210 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

En ce qui concerne les dérivés les plus actifs sur FXa, on retrouve les mêmes trois premiers composés que sur thrombine. Ils peuvent être classés selon la séquence suivante : *m*-chloro-phényle (LP 8 ; $620 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) > *m*-bromo-phényle (LP 53 ; $430 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) > 2,5-dichoro-phényle (LP 74 ; $220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Ceux-ci possèdent cependant un pouvoir inhibiteur de FXa fortement inférieur à celui qu'ils exerçaient sur la thrombine. De plus, leur ordre d'efficacité envers le FXa est inversé par rapport à celui observé avec la thrombine.

La deuxième partie de ce travail s'est portée sur l'étude du mécanisme d'inhibition des coumarines sur la thrombine et sur le FXa. En effet, il est important de bien comprendre ce mécanisme afin d'identifier les éléments structuraux clés responsables de l'inhibition. Par l'étude de criblage, nous avons déjà mis en évidence l'importance de la fonction chlorométhyle en position 6. En effet, le remplacement de celle-ci par un autre groupement entraîne une perte totale du pouvoir inhibiteur et ce, à la fois envers la thrombine et le FXa. Ces données sont en accord avec le mécanisme d'inhibition hypothétique proposé.

III.2. Etude du mécanisme d'inhibition des coumarines

III.2.1. Hypothèse du mécanisme d'inhibition

Les coumarines présentées dans ce travail ont été conçues comme substrats suicides de protéases à sérine. Pour rappel, les substrats suicides sont des inhibiteurs basés sur le mécanisme. Après reconnaissance par l'enzyme, ils sont transformés par le processus catalytique en une espèce très réactive qui va inactiver l'enzyme.

Un mécanisme d'action de nos coumarines a été précédemment proposé et confirmé dans le cas de l' α -chymotrypsine (Figure 55) [Pochet, et al., 2003]. Selon celui-ci, l'attaque nucléophile de la Ser195 sur le carbonyle de la lactone entraîne l'ouverture du cycle coumarinique et la formation d'un acyle-enzyme. A la suite de cette réaction, une élimination 1,6 du chlore de la fonction chlorométhyle permet la formation d'un intermédiaire méthylène quinone. Ce dernier est une espèce très électrophile. Il réagit donc très rapidement avec un résidu nucléophile de l'enzyme afin de former un premier alkyle-enzyme biponté. Ce résidu nucléophile serait l'His57 du site actif [Pochet, et al., 2000]. L'alkyle-enzyme biponté pourrait ensuite être désacétylé pour former un deuxième alkyle-enzyme. L'alkylation serait ainsi responsable de la nature irréversible de l'inhibition de l'enzyme.

Lors de ce travail, nous avons entrepris de valider ce mécanisme d'action dans le cas de la thrombine et du FXa. La même approche que celle adoptée dans le cas de l' α -chymotrypsine a été choisie. Ainsi, une caractérisation des interactions enzyme-inhibiteur grâce à des expériences de réactivation enzymatique a tout d'abord été réalisée. Ensuite, nous avons essayé de déterminer la nature du complexe enzyme-inhibiteur en mesurant par spectrométrie de masse la masse moléculaire de l'adduit présent sur l'enzyme inactivée. Enfin, nous avons tenté d'identifier le site de fixation de l'inhibiteur au niveau de l'enzyme grâce à des expériences de digestion enzymatique et d'analyse par spectrométrie de masse des peptides

Tableau 22 : Expérience de réactivation des complexes thrombine-LP 8

Temps (min)	Activité résiduelle en thrombine	
	Réactivation spontanée	Réactivation en présence d'hydrazine
0	14 %	14 %
10	19 %	46 %
25	8 %	32 %
40	20 %	35 %
60	5 %	35 %
120	18 %	35 %
300	21 %	38 %
1200	21 %	33 %

Tableau 23 : Expérience de réactivation des complexes FXa-LP 8

Temps (min)	Activité résiduelle en FXa	
	Réactivation spontanée	Réactivation en présence d'hydrazine
0	10 %	10 %
10	15 %	34 %
25	9 %	19 %
40	7 %	14 %
60	4 %	17 %
120	1 %	14 %
500	4 %	26 %
1440	2 %	16 %

obtenus. Toutes ces études ont été menées sur la thrombine et le FXa avec l'ester *m*-chloro-phényle (LP 8).

III.2.2. Caractérisation des interactions enzyme-inhibiteur

Selon le mécanisme d'inhibition proposé dans la section précédente, l'inactivation de l'enzyme serait due à la formation d'un alkyle-enzyme. Une étude de la nature de la liaison formée entre l'enzyme et l'inhibiteur a donc été entreprise.

La dépendance en fonction du temps observée pour l'inhibition des protéases indique la formation d'une liaison covalente. Celle-ci peut être définitive ou transitoire. En effet, le terme inactivateur caractérisant nos coumarines signifie que celles-ci entraînent une inhibition irréversible de l'enzyme. Dans ce contexte, le terme irréversible ne signifie pas que l'enzyme ne récupérera jamais son activité, mais que l'inhibition rencontrée persiste un laps de temps important après élimination de l'excès d'inhibiteur présent en solution. Une éventuelle réactivation spontanée par action du temps des enzymes inactivées a donc été recherchée.

Une inactivation rapide de la thrombine et du FXa a tout d'abord été effectuée avec le LP 8. Celle-ci était supérieure à 85 % et 90 % pour la thrombine et le FXa respectivement. Après incubation du mélange réactionnel pendant 48 heures, aucune réactivation spontanée des enzymes n'a été observée (Tableau 22 et 23). Il y aurait donc formation d'une liaison covalente persistante entre l'enzyme et l'inhibiteur et ce, à la fois pour la thrombine et le FXa.

La nature de la liaison covalente peut également être évaluée grâce au traitement de l'enzyme inactivée par un nucléophile puissant tel que l'hydrazine. En effet, les liaisons de type acyle sont rompues en présence d'hydrazine alors que celles de type alkyle restent stables.

Après ajout d'hydrazine, une réactivation partielle des enzymes s'est rapidement produite (Tableau 22 et 23). Ainsi, après 10 minutes, un regain d'activité d'environ 20 et 15 % a été observé pour la thrombine et le FXa respectivement. Les activités résiduelles ainsi obtenues (en moyenne 35 % pour la thrombine et 20 % pour le FXa) ne semblent pas avoir évolué au cours du temps.

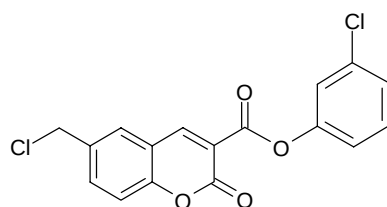
Cependant, suivant le mécanisme d'inhibition proposé dans la section III.2.1 selon lequel l'inactivation résulterait de la formation d'un alkyle-enzyme entre l'inhibiteur et l'enzyme au niveau de l'histidine catalytique, aucune réactivation ne devrait être observée et ce, avec ou sans hydrazine. Pour essayer de mieux comprendre ces résultats, nous avons étudié par spectrométrie de masse les complexes enzyme-inhibiteur.

III.2.3. Caractérisation des complexes enzyme-inhibiteur par spectrométrie de masse

III.2.3.1. Mesure du poids de l'adduit

La nature des complexes enzyme-inhibiteur peut être déterminée en mesurant la masse moléculaire de l'adduit présent sur l'enzyme (Figure 56). Pour ce faire, la masse du complexe enzyme-inhibiteur doit être comparée à celle de l'enzyme native. Ces différentes masses ont été estimées lors d'une étude en spectrométrie de masse.

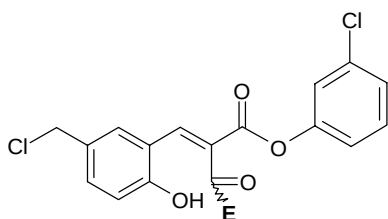
Pour cette étude, des complexes enzyme-inhibiteur ont été préparés. Un contrôle comprenant l'enzyme native a été réalisé en parallèle. Une mesure d'activité a permis de contrôler



m-chloro-phényle (LP 8)

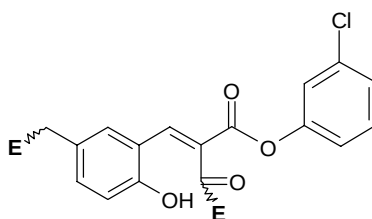
Masse exacte = 348,00 Da

acyle-enzyme



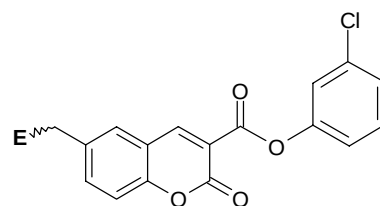
Différence de masse
entre l'acyle-enzyme
et l'enzyme native: 348,00 Da

alkyle-enzyme biponté



Différence de masse
entre l'alkyle-enzyme biponté
et l'enzyme native: 312,03 Da

alkyle-enzyme



Différence de masse
entre l'alkyle-enzyme
et l'enzyme native: 312,03 Da

Figure 56 : Différences de masse entre les complexes hypothétiques et l'enzyme native

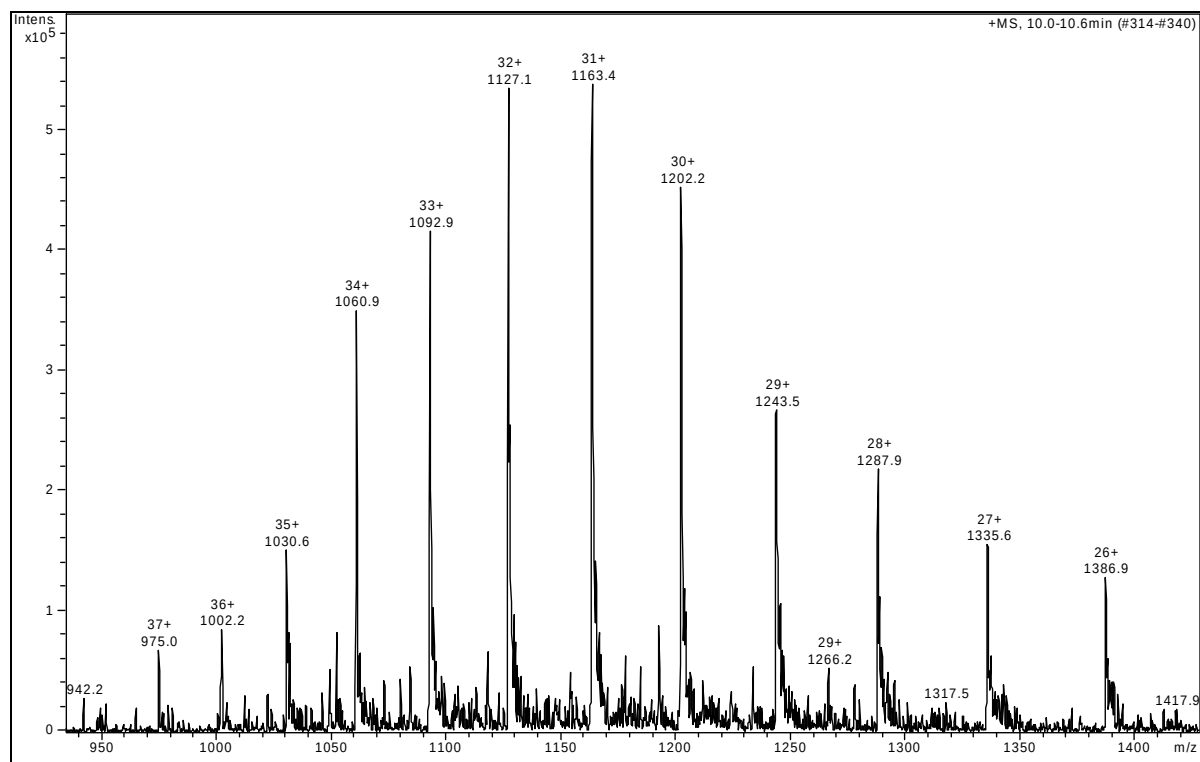


Figure 57 : Spectre de masse de la thrombine native : masse observée = 36 036,2 ± 0,8 Da

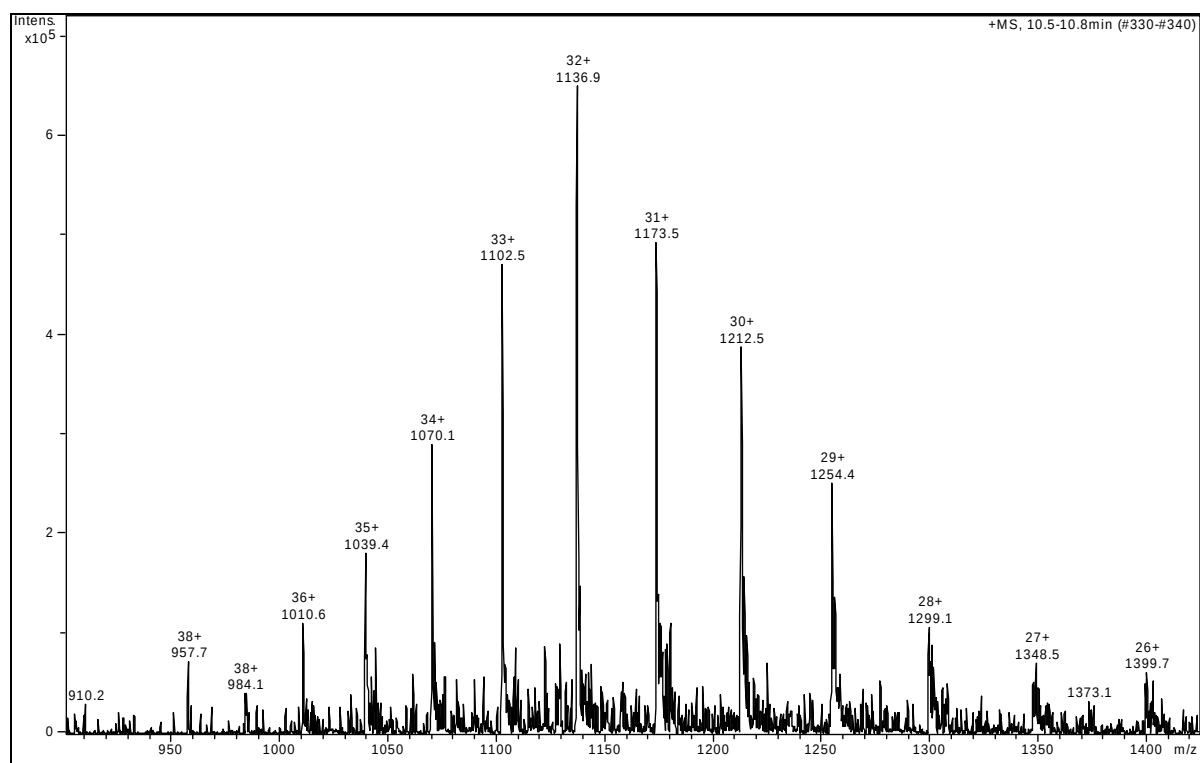


Figure 58 : Spectre de masse de la thrombine inactivée avec le LP 8 :
masse observée = $36\,349,4 \pm 0,2$ Da

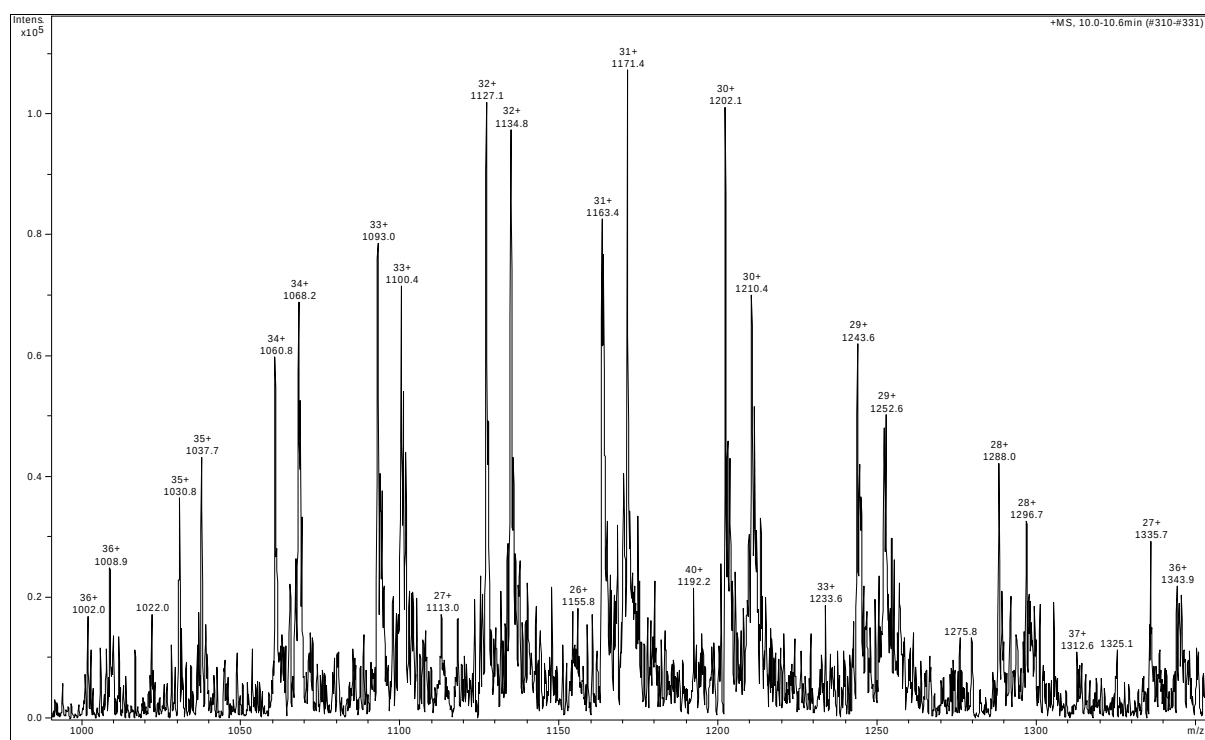
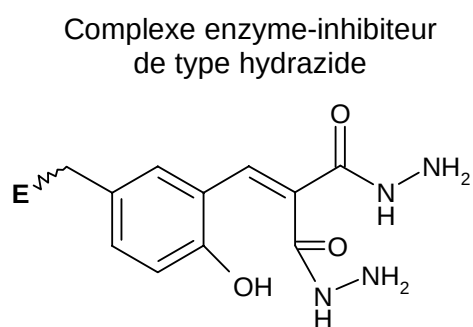


Figure 59 : Spectre de masse de la thrombine inactivée avec le LP 8 et réactivée en présence d'hydrazine : masses observées = $36\,285,9 \pm 2,0$ Da et $36\,036,2 \pm 0,9$ Da

Tableau 24 : Masses et différences de masse observées entre les complexes hypothétiques et les enzymes natives

Conditions expérimentales	Masses observées (Da)	Différences de masse observées par rapport à l'enzyme native (Da)
Thrombine native	36 036,2 ± 0,8	-
Thrombine inactivée avec le LP 8	36 349,4 ± 0,2	313,2 ± 1,0
Thrombine inactivée avec le LP 8 et traitée à l'hydrazine	36 285,9 ± 2,0 36 036,2 ± 0,9	249,7 ± 2,8 0,2 ± 1,7
Facteur Xa natif	43 389,8 ± 1,3	-
Facteur Xa inactivé avec le LP 8	43 704, 8 ± 2,4	315, 0 ± 3,7



Différence de masse entre le complexe
enzyme-inhibiteur de type hydrazide
et l'enzyme native: 249,00 Da

Figure 60 : Mode d'action hypothétique de l'hydrazine

l'inhibition de l'enzyme. Celle-ci était de plus de 80 et 90 % pour la thrombine et le FXa respectivement. Des aliquotes ont ensuite été prélevées afin d'être analysées par spectrométrie de masse.

Les spectres de masse obtenus avec la thrombine sont présentés aux figures 57 et 58. L'analyse des résultats montre que la thrombine native possède une masse de $36\,036,2 \pm 0,8$ daltons (Da) (Figure 57). En présence de LP 8, on observe une masse de $36\,349,4 \pm 0,2$ Da (Figure 58). Il y a donc une augmentation de la masse de la thrombine de $313,2 \pm 1,0$ Da (Tableau 24). Cette différence de masse est cohérente avec la formation de l'alkyle-enzyme biponté ou de l'alkyle-enzyme (Figure 56). Cependant, la technique employée ne permet pas de distinguer ces deux complexes.

Des résultats similaires ont été observés pour le FXa (Tableau 24). Sa masse native est de $43\,389,8 \pm 1,3$ Da. Complexé au LP 8, il présente une masse de $43\,704,8 \pm 2,4$ Da, soit un accroissement de $315,0 \pm 3,7$ Da. Il y aurait donc également formation de l'alkyle-enzyme biponté ou de l'alkyle-enzyme (Figure 56).

L'enzyme native et les complexes enzyme-inhibiteur ont ensuite été traités à l'hydrazine. Des activités résiduelles de 58 et 21 % ont été mesurées pour la thrombine et le FXa respectivement. Des aliquotes ont alors été prélevées afin d'être analysées selon la même méthode que décrite ci-dessus.

Il a tout d'abord été vérifié que l'hydrazine ne modifiait pas la masse de la thrombine native. Ensuite, l'analyse de la thrombine inactivée avec le LP8 et réactivée à l'hydrazine a montré l'existence de deux populations: l'enzyme native et un complexe enzyme-inhibiteur (Figure 59, Tableau 24). Ceci explique la réactivation partielle de la thrombine observée en présence d'hydrazine. Le complexe thrombine-LP 8 possède une masse de $36\,285,9 \pm 2,0$ Da, soit une augmentation de $249,7 \pm 2,8$ Da par rapport à l'enzyme native. Cette différence de masse est cohérente avec la fixation de deux molécules d'hydrazine sur la coumarine (Figure 60). En effet, la fonction carbonyle de la lactone serait attaquée par une molécule d'hydrazine afin de former un dérivé de type hydrazide. Il en est de même pour la fonction carbonyle exocyclique dont l'attaque entraînerait une perte de la chaîne latérale en position 3 de la coumarine.

En ce qui concerne le FXa, le complexe enzyme-inhibiteur réactivé n'a pu être analysé en raison d'un signal ininterprétable.

Suivant les données de la mesure du poids de l'adduit, l'inactivation de la thrombine et du FXa par le LP 8 est cohérente avec le mécanisme d'inhibition proposé. Néanmoins, la réactivation partielle de la thrombine, confirmée en spectrométrie de masse par la présence d'un complexe enzyme-inhibiteur et de l'enzyme native, reste mystérieuse. En effet, le retour de l'enzyme native en présence d'hydrazine devrait être due à la formation d'un acyle-enzyme. Or, celui-ci n'est pas observé lors de l'analyse des complexes enzyme-inhibiteur. De plus, il semble peu probable qu'un alkyle-enzyme puisse être réactivé.

Au vu de ces résultats surprenants, nous avons voulu identifier l'acide aminé de l'enzyme sur lequel se fixe l'inhibiteur. A cette fin, des études de digestion enzymatique et d'analyse par spectrométrie de masse des peptides obtenus ont été entreprises.

III.2.3.2. Détermination du site de fixation de l'inhibiteur

III.2.3.2.1. Approche théorique

Afin de déterminer le site de fixation de l'inhibiteur, nous avons utilisé pour la thrombine et le FXa l'approche générale décrite ci-dessous. L'enzyme native et les complexes enzyme-inhibiteur ont été digérés en solution à l'aide de deux enzymes de séquençage : la trypsine ou la chymotrypsine. Les peptides ainsi obtenus ont été analysés à l'aide de deux spectromètres de masses présentant des fonctionnalités différentes et complémentaires, le MALDI ou le Q-TOF2 selon les conditions de digestion utilisées.

En se basant sur une digestion théorique de l'enzyme, nous avons tout d'abord essayé de repérer les peptides d'intérêt de l'enzyme native, à savoir les peptides comprenant la Ser195 ou l'His57 (suivant la notation du chymotrypsinogène). Afin de confirmer qu'ils s'agissaient bien de nos peptides d'intérêt, nous avons tenté de les séquencer. Ensuite, nous avons essayé de savoir si ces mêmes peptides d'intérêt présentaient une différence de masse en présence de l'inhibiteur : + 348 Da pour les peptides contenant la Ser195 et + 312 Da pour les peptides contenant l'His57.

Par ailleurs, nous n'excluons pas la possibilité que l'inhibiteur se fixe sur un autre acide aminé de l'enzyme que l'His57. Nous avons donc vérifié que tous les peptides se retrouvant uniquement dans le profil de digestion du complexe enzyme-inhibiteur ne correspondaient pas à un peptide de l'enzyme native augmenté de 312 Da.

III.2.3.2.2. Résultats expérimentaux

De manière à ne pas altérer la fixation de l'inhibiteur, nous avons tout d'abord digéré la thrombine native dans un état non dénaturé. Théoriquement, nous pouvions donc obtenir, en plus des peptides classiques, des dipeptides reliés par un pont disulfure. Ces derniers comprenaient également nos acides aminés d'intérêt. La digestion a été réalisée à l'aide de la trypsine pendant 24 heures et a été suivie d'une analyse en MALDI. Il est ainsi apparu que le rendement de la digestion était faible et que son profil n'était pas reproductible. Ces résultats pourraient être dus au fait que dans cet état non dénaturé les sites de clivage de la thrombine sont peu accessibles à la trypsine.

Nous avons donc ajouté au tampon de digestion du RapiGest SF. Il s'agit d'un dénaturant doux qui solubilise et déplie les protéines afin de les rendre plus facilement accessibles aux enzymes de digestion. Après 2 heures de digestion à la trypsine en présence de RapiGest SF, nous n'avons obtenus que certains de nos peptides et dipeptides d'intérêt. Ceux-ci présentaient des hautes masses. Dès lors, seule une faible précision de masse a été obtenue lors de leur analyse en MALDI.

Une analyse en Q-TOF2 de ces peptides d'intérêt a donc été entreprise. Cependant, celle-ci s'est avérée laborieuse. En effet, les peptides d'intérêt étaient 4 à 5 fois chargés. Dans ces conditions, il est difficile de séquencer les pics obtenus et de les interpréter.

Nous avons ensuite digéré le complexe thrombine-inhibiteur avec la trypsine en présence de RapiGest SF. L'analyse des peptides a été faite en MALDI et en Q-TOF2. Dans cette étude, nous espérions voir apparaître un pic présentant une différence de masse cohérente avec le mécanisme d'inhibition proposé et voir disparaître le pic correspondant à ce même peptide dans son état non complexé à l'inhibiteur. Cependant, bien que certains peptides soient

apparus, il n'a pas été possible de les identifier car ceux-ci ne présentaient pas les différences de masse attendues. De plus, ils étaient multichargés et donc difficiles à séquencer.

Les mêmes expériences ont été réalisées avec le FXa et ont donné des résultats semblables. Ainsi, en présence de trypsine et de RapiGest SF, la comparaison des profils de digestion obtenus en MALDI ou en Q-TOF2 avec l'enzyme native et le complexe enzyme-inhibiteur n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'un peptide présentant une différence de masse cohérente avec le mécanisme d'inhibition proposé.

Au vu de ces résultats décevants, nous avons décidé d'effectuer une digestion classique avec clivage des ponts disulfures. Les ponts disulfures des enzymes ont été réduits à l'aide de DTT et alkylés en présence d'iodoacétamide avant la digestion enzymatique proprement dite. Les échantillons ont ensuite été analysés à l'aide du Q-TOF2.

La thrombine prétraitée au DTT et à l'iodoacétamide a été digérée pendant 90 minutes avec la trypsine. Dans ces conditions, aucun des peptides d'intérêt n'a été repéré. En présence de LP 8, de nouveaux peptides sont apparus. Cependant, ceux-ci ne présentaient pas les différences de masse attendues. De plus, ils étaient difficiles à séquencer en raison de la présence de 4 à 5 charges.

La digestion tryptique du FXa dénaturé au DTT et à l'iodoacétamide a permis quant à elle de voir certains peptides d'intérêt. Cependant, en présence de l'inhibiteur, ceux-ci ne présentaient pas de différence de masse. De plus, aucun autre nouveau peptide ne présentait une différence de masse cohérente avec l'hypothèse du mécanisme d'inhibition.

Les essais de digestion tryptique des enzymes natives et des complexes enzyme-inhibiteur n'ont donc pas permis de trouver assez de peptides d'intérêt ni de voir des différences interprétables entre les profils de digestion. Nous avons donc testé une autre enzyme de digestion : la chymotrypsine.

Avec cette enzyme, il n'a pas été possible malgré l'ajout de RapiGest SF de digérer les enzymes natives et ce, que ce soit dans le cas de la thrombine ou du FXa.

Lors de la digestion classique de la thrombine et du FXa préalablement traités au DTT et à l'iodoacétamide, des digestions peu reproductibles ont été observées avec la chymotrypsine.

Par ailleurs, des expériences de séquençage des peptides de la thrombine ont montré que la chymotrypsine travaillait de manière peu spécifique. En effet, celle-ci agit non seulement au niveau de ses sites de clivage habituels (Tyr, Phe, Trp) mais également dans une moindre mesure au niveau d'autres sites tels que les leucines, les méthionines et les histidines. La chymotrypsine ne semble donc pas être une enzyme de digestion adéquate pour notre étude.

De plus, le séquençage de certains peptides a montré que la séquence théorique de la thrombine sur laquelle nous nous basions dans l'identification des peptides ne correspondait pas totalement à la séquence observée. Ce problème rendait donc notre approche très difficile.

A l'état actuel du travail, nous n'avons donc pas pu déterminer la nature du site de fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme. Néanmoins, des études complémentaires devraient permettre de l'identifier et ainsi de mieux comprendre le phénomène de réactivation observé lors des expériences de la section précédente.

III.3. Conclusions et perspectives

III.3.1. Conclusions

Les maladies cardiovasculaires représentent un problème de santé publique mondial. Ce type de pathologie est déclenché par la formation d'un thrombus au niveau d'un site de lésion vasculaire. La formation de ce thrombus implique à la fois le processus d'agrégation plaquettaire et la cascade de la coagulation. Les thérapies antiplaquettaires et anticoagulantes sont donc largement utilisées dans la prévention et le traitement des accidents cardiovasculaires. Cependant, les médicaments actuellement disponibles sur le marché présentent de nombreux effets secondaires et d'importantes limitations d'utilisation. Dès lors, de nouvelles approches sont constamment en cours d'évaluation. Parmi celles-ci, la conception d'inhibiteurs directs et sélectifs des protéases à sérine de la cascade de la coagulation semble très prometteuse. En effet, la thrombine et le FXa représentent des cibles attractives pour le développement d'agents antithrombotiques.

Dans le cadre de ce travail, une évaluation biologique *in vitro* de coumarines 3,6-disubstituées en tant qu'inhibiteurs de protéases à sérine de la cascade de la coagulation, et plus particulièrement de la thrombine et du FXa, a été réalisée. Celle-ci s'est focalisée sur deux axes : l'étude du pouvoir inhibiteur des coumarines sur enzyme isolée d'une part et l'étude de leur mécanisme d'inhibition d'autre part.

Les études de criblage nous ont tout d'abord permis de sélectionner les composés les plus actifs sur thrombine et sur FXa. Il est ainsi apparu que les esters benzéniques monosubstitués en *meta* par un groupement halogène (LP 53 > LP 8 > LP 51 > LP 14 pour la thrombine et LP 8 > LP 53 pour le FXa) présentaient un pouvoir inhibiteur de thrombine et de FXa. Parmi les dérivés disubstitués, seul l'ester 2,5-dichloro-phényle (LP 74) exerçait un pouvoir inhibiteur sur les deux enzymes. Il a également été démontré que la présence d'une fonction chlorométhyle en position 6 et d'un lien ester entre la coumarine et la chaîne latérale en position 3 était indispensable à l'activité inhibitrice et ce, à la fois pour la thrombine et le FXa.

Ensuite, le pouvoir inhibiteur des composés s'étant révélés les plus actifs lors des tests de criblage a été défini de manière précise par la mesure des constantes cinétiques d'inactivation k_i et K_I . Les résultats de cette étude ont montré que l'ester 2,5-dichloro-phényle était le composé le plus actif sur thrombine avec un k_i/K_I d'environ $37000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Il est suivi des dérivés *m*-bromo-phényle et *m*-chloro-phényle présentant des pouvoirs inhibiteurs proches (10540 et $7720 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement). Ces composés possèdent également un faible pouvoir inhibiteur de FXa (220 , 430 et $620 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement).

La deuxième partie de ce travail s'est focalisée sur l'étude du mécanisme d'inhibition de nos coumarines vis-à-vis de la thrombine et du FXa. Par l'étude de criblage, nous avons tout d'abord mis en évidence l'importance de la fonction chlorométhyle en position 6. En effet, le remplacement de celle-ci par un autre groupement entraîne une perte totale du pouvoir inhibiteur et ce, à la fois envers la thrombine et le FXa. Ces données sont en accord avec le mécanisme d'inhibition hypothétique proposé.

Des cinétiques enzymatiques de réactivation ont ensuite été entreprises afin de caractériser la nature des liaisons formées entre l'enzyme et l'inhibiteur. Lors de ces études, aucune réactivation spontanée de l'enzyme inactivée n'a été observée, et ce à la fois pour la thrombine et le FXa. Il y aurait donc formation d'une liaison covalente persistante entre l'enzyme et l'inhibiteur. En présence d'hydrazine, un nucléophile puissant couramment utilisé pour réactiver les alkyle-enzymes, une réactivation partielle des enzymes inactivées a été observée. Or, suivant le mécanisme d'inhibition proposé, aucune réactivation ne devrait se produire et ce, avec ou sans hydrazine. Pour essayer de mieux comprendre ces résultats surprenants, nous avons entrepris d'étudier la nature des complexes enzyme-inhibiteur par spectrométrie de masse.

Cette étude a ainsi montré que la masse de l'adduit présent sur l'enzyme inactivée était de 312 Da à la fois pour la thrombine et le FXa. Ces résultats sont cohérents avec la formation d'un alkyle-enzyme comme proposé dans notre mécanisme d'inhibition hypothétique.

De plus, dans le cas de la thrombine, la réactivation partielle de l'enzyme inactivée en présence d'hydrazine a été confirmée en spectrométrie de masse par la présence de l'enzyme native et d'un complexe enzyme-inhibiteur. Cependant, à l'heure actuelle, nous n'avons pas pu donné d'explication à ce phénomène de réactivation. En effet, il semble peu probable qu'un alkyle-enzyme puisse être réactivé.

Enfin, des études de digestion enzymatique des complexes enzyme-inhibiteur et d'analyse par spectrométrie de masse des peptides obtenus ont été entreprises afin de déterminer l'acide aminé de l'enzyme sur lequel se fixe l'inhibiteur. Ces données nous aideraient à mieux comprendre la manière dont l'inhibiteur interagit avec l'enzyme et permettraient peut-être d'expliquer le phénomène de réactivation observé. Malheureusement, les investigations menées afin d'identifier ce site de fixation se sont avérées infructueuses.

III.3.2. Perspectives

Ce travail ouvre la voie vers de nouvelles perspectives. En effet, l'étude du pouvoir inhibiteur de nos coumarines envers la thrombine et le FXa a montré que plusieurs d'entre elles présentaient un pouvoir inactivateur de thrombine important. Néanmoins, ces composés sont peu sélectifs puisqu'ils inhibent également l' α -chymotrypsine [Pochet, et al., 1996] et le FXa. Au vu de ces résultats, il apparaît donc nécessaire d'augmenter la sélectivité et/ou l'efficacité de nos coumarines vis-à-vis des enzymes étudiées. Pour atteindre ce but, il serait intéressant de comprendre la façon dont nos inhibiteurs interagissent avec les enzymes afin d'optimiser la structure de nos composés.

Dès lors, de nouvelles investigations concernant le site de fixation de l'inhibiteur doivent être menées. Ainsi, nous projetons de séparer et d'analyser les peptides obtenus lors des digestions enzymatiques par LC/MS. La comparaison des chromatogrammes en présence et en absence d'inhibiteur devrait nous permettre de mettre en évidence les peptides modifiés lors du processus d'inactivation. L'utilisation d'autres enzymes de digestion serait également opportune.

D'autres approches peuvent être envisagées afin de définir le mode d'interaction de nos inhibiteurs avec les enzymes. Ainsi, une étude de modélisation moléculaire est actuellement en cours au Laboratoire de Chimie Biologique Structurale du Département de Chimie. Celle-ci vise à rationaliser les données d'activité de différentes coumarines envers la thrombine, c'est-à-dire à expliquer l'activité des composés en fonction de leur structure et de leur mode de

liaison au sein de l'enzyme. Nous pourrions ainsi également déterminer si l'attaque du groupement carbonyle de la fonction lactone par la Ser195 du site actif de l'enzyme est cohérente avec le mode de liaison privilégié envisagé. De plus, les résidus nucléophiles susceptibles d'interagir avec l'intermédiaire méthylène quinone pourraient être identifiés. Enfin, nous espérons que cette étude, en déterminant les éléments structuraux clés responsables du pouvoir inhibiteur de nos composés, permettra de proposer des pharmacomodulations de nos coumarines et d'initier la synthèse de nouveaux dérivés. Une étude similaire pourrait également être menée sur le FXa. Celle-ci permettrait d'augmenter l'efficacité de nos composés mais aussi de proposer des structures chimiques sélectives envers l'une ou l'autre enzyme.

En outre, des expériences de cocrystallisation et de diffraction aux rayons X des enzymes étudiées complexées à nos coumarines pourraient être envisagées. Celles-ci nous permettraient de confirmer les résultats obtenus par modélisation moléculaire.

Par ailleurs, une évaluation biologique de nos composés sur un modèle *in vivo* de thrombose est également projetée. Dans ce modèle, décrit par Kurz [Kurz, et al., 1990] et modifié par Dogné [Dogné, et al., 2004], une thrombose artérielle est induite chez le rat par application locale de chlorure ferrique au niveau de l'artère abdominale. Un éventuel effet antithrombotique de la drogue administrée par injection intrapéritonéale deux heures avant le déclenchement de la thrombose est alors recherché. Celui-ci est évalué grâce à la mesure du poids du thrombus formé et à l'analyse de la composition de ce dernier.

Enfin, comme il a été évoqué dans l'introduction, le FVIIa représente également une cible attractive pour le développement d'agents anticoagulants. Nous avons donc décidé de tester nos composés sur cette enzyme. Un test de criblage sur enzyme isolée a été mis au point.

Lors du développement de ce test, une étude des différents paramètres de l'expérience a été réalisée. Celle-ci vise tout d'abord à déterminer les concentrations optimales en enzyme et substrat nécessaires à l'obtention d'un témoin facilement exploitable. Celui-ci est réalisé en absence d'inhibiteur et représente une activité résiduelle de l'enzyme de 100 %. Cette activité protéolytique doit être suffisamment importante pour qu'en présence de la coumarine, un éventuel effet inhibiteur puisse être quantifié. En effet, une évaluation du pouvoir inhibiteur n'est possible que si l'activité protéolytique de l'enzyme est soumise à des variations assez grandes que pour être mesurées.

Toutefois, la détermination de la concentration en FVIIa nécessaire s'est avérée difficile. En effet, le FVIIa exerce à lui seul une activité enzymatique faible. L'obtention d'une activité maximale du FVIIa requiert la présence de son cofacteur, le TF. L'association du TF au FVIIa provoque une modification allostérique du site actif du FVIIa qui voit son activité protéolytique fortement augmentée. Ainsi, la concentration en TF, le rapport enzyme/cofacteur mais également le temps de formation des complexes FVIIa/TF ont dû être déterminés.

En outre, pour que notre test soit valable, la concentration en inhibiteur doit être en large excès par rapport à celle de l'enzyme. Au vu de la faible solubilité de nos inhibiteurs, la concentration en FVIIa doit donc être relativement faible. Une concentration importante en TF a ainsi été nécessaire pour obtenir une activité protéolytique suffisante.

Tableau 25 : Test de criblage sur facteur VIIa

Composés	Activité résiduelle du FVIIa
<i>m</i> -bromo-phényle (LP 53)	66 ± 12 %
2,5-dichloro-phényle (LP 74)	73 ± 5 %

La concentration en substrat est également importante puisqu'elle permet de mesurer l'activité enzymatique. Ainsi, l'activité protéolytique observée est proportionnelle à la concentration en substrat : plus la concentration en substrat est élevée, plus l'activité enzymatique observée est grande. Cependant, à haute concentration en substrat, un phénomène de saturation apparaît. Une augmentation de la concentration en substrat ne permet alors pas d'accroître davantage l'activité protéolytique. Habituellement, la concentration en substrat utilisée est proche de cette saturation. Par ailleurs, il n'existe à l'heure actuelle aucun substrat présentant une forte affinité pour le FVIIa. Ainsi, le Pefachrome VIIa possède, d'après les données du fournisseur, un K_m de 456 μM . Dès lors, une concentration importante en substrat doit être utilisée.

En tenant compte de toutes ces contraintes, les différents paramètres du test ont été fixés comme suit : température = 37°C, temps de formation des complexes FVIIa/TF = 2 minutes, temps d'incubation des complexes FVIIa/TF avec l'inhibiteur = 10 minutes, $[\text{FVIIa}] = 36 \text{ nM}$, $[\text{TF}] = 67,5 \text{ nM}$, $[\text{I}] = 10 \mu\text{M}$ et $[\text{Pefachrome VIIa}] = 1 \text{ mM}$.

Dans ces conditions, deux composés ont été testés : le 2,5-dichloro-phényle (LP 74) et le *m*-bromo-phényle (LP 53) (Tableau 25). Il est ainsi apparu que ces deux dérivés possédaient une faible activité inhibitrice de FVIIa (LP 74 : 73 % et LP 53 : 66 %). Cependant, il est clair que ces résultats de criblage ne constituent qu'une étude préliminaire du pouvoir inhibiteur et que les conditions du test doivent encore être optimisées. Lors de cette optimisation, une attention particulière sera portée aux rapports FVIIa/TF et FVIIa/inhibiteur, les deux paramètres les plus critiques pour la validité du test de criblage. Ces résultats encourageants nous laissent néanmoins penser que d'autres de nos composés pourraient être actifs envers le FVIIa.

IV.BIBLIOGRAPHIE

IV. BIBLIOGRAPHIE

- Bachmann, F. Anticoagulants et agents thrombolytiques in *Pharmacologie: des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques* (Schorderet, M.) pp. 277-296 (Frison-Roche, Paris, 1998).
- Beaglehole, R., et al. The World Health Report 2003: Shaping the future. *World Health Organisation* (2003).
- Bhatt, D. L. & Topol, E. J. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 15-28 (2003).
- Broze, G. J. The tissue factor pathway of coagulation in *Thrombosis and Hemorrhage* (Loscalzo, J. & Schafer, A. I.) pp. 62-80 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003).
- Camerer, E., et al. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* **81**, 1-41 (1996).
- Cazenave, J. P., et al. Médicaments inhibiteurs des fonctions plaquettaires in *Pharmacologie: des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques* (Schorderet, M.) pp. 297-312 (Frison-Roche, Paris, 1998).
- Cotran, R. S., et al. Vaisseaux sanguins in *Pathologie: Bases morphologiques et physiopathologiques des maladies* (Robbins, S. L.) pp. 601-649 (Piccin Nuovo Libreria, Padoue, 1996).
- Daniels, S. B., et al. Haloenol lactones. Potent enzyme-activated irreversible inhibitors for alpha-chymotrypsin. *J Biol Chem* **258**, 15046-53 (1983).
- David, J. C. Théorie du complexe stéréospécifique, complexe enzyme-substrat in *Biochimie enzymatique* pp. 27-56 (Technique et documentation Lavoisier, Paris, 1995).
- Davie, E. W. Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thromb Haemost* **74**, 1-6 (1995).
- Dogné, J. M., et al. Recent advances in antiplatelet agents. *Curr Med Chem* **9**, 577-89 (2002).
- Dogné, J. M., et al. Pharmacological characterization of N-tert-butyl-N'-[2-(4'-methylphenylamino)-5-nitrobenzenesulfonyl]urea (BM-573), a novel thromboxane A₂ receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor in a rat model of arterial thrombosis and its effects on bleeding time. *J Pharmacol Exp Ther* **309**, 498-505 (2004).
- Doucet, C., et al. 6-Substituted 2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid as a core structure for specific inhibitors of human leukocyte elastase. *J Med Chem* **42**, 4161-71 (1999).
- Eisenthal, R. & Danson, M. J. *Enzyme Assays: A Practical Approach* (eds. Rickwood, D. & Hames, B. D.) (Oxford, 1992).

- Fernandez, P. M. & Rickles, F. R. Tissue factor and angiogenesis in cancer. *Curr Opin Hematol* **9**, 401-6 (2002).
- Fersht, A. *Enzyme structure and mechanism* (Freeman, San Francisco (Calif.), 1984)
- Freedman, J. E. & Loscalzo, J. New antithrombotic strategies in *Thrombosis and hemorrhage* (Loscalzo, J.&Schafer, A. I.) pp. 978-995 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003).
- Gaffney, P. J., et al. The haemostatic balance -- Astrup revisited. *Haemostasis* **29**, 58-71 (1999).
- Garrett, R. H. & Grisham, C. M. Mécanisme d'action des enzymes in *Biochimie* pp. 500-532 (de Boeck Université, Bruxelles, 2000).
- Goldsack, N. R., et al. Thrombin. *Int J Biochem Cell Biol* **30**, 641-6 (1998).
- Golino, P. The inhibitors of the tissue factor:factor VII pathway. *Thromb Res* **106**, 257-65 (2002).
- Gonzalez, E. R. Antiplatelet therapy in atherosclerotic cardiovascular disease. *Clin Ther* **20 Suppl B**, B18-41 (1998).
- Greenberg, C. S. & Lai, T. Fibrin formation and stabilisation in *Thrombosis and Hemorrhage* (Loscalzo, J.&Schafer, A. I.) pp. 81-104 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003).
- Gresele, P. & Agnelli, G. Novel approaches to the treatment of thrombosis. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 25-32 (2002).
- Hart, G. J. & O'Brien, R. D. Recording spectrophotometric method for determination of dissociation and phosphorylation constants for the inhibition of acetylcholinesterase by organophosphates in the presence of substrate. *Biochemistry* **12**, 2940-5 (1973).
- Hedstrom, L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* **102**, 4501-24 (2002).
- Hirsh, J. Current anticoagulant therapy--unmet clinical needs. *Thromb Res* **109 Suppl 1**, S1-8 (2003).
- Hirsh, J. & Weitz, J. I. New antithrombotic agents. *Lancet* **353**, 1431-6 (1999).
- Hoffman, M. & Monroe, D. M., 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* **85**, 958-65 (2001).
- IUBMB. *Enzyme nomenclature, Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes* (Academic Press, New-York, 1992)
- Jenny, N. S. & Mann, K. G. Coagulation cascade, an overview in *Thrombosis and Hemorrhage* (Loscalzo, J.&Schafer, A. I.) pp. 1-34 (Philadelphia, 2003).

- Khan, A. R. & James, M. N. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci* **7**, 815-36 (1998).
- Kitz, R. & Wilson, I. B. Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J Biol Chem* **237**, 3245-9 (1962).
- Krantz, A. A classification of enzyme inhibitors. *Bioorg Chem Lett* **2**, 1327-1334 (1962).
- Kurz, K. D., et al. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res* **60**, 269-80 (1990).
- Lassen, M. R., et al. Postoperative fondaparinux versus preoperative enoxaparin for prevention of venous thromboembolism in elective hip-replacement surgery: a randomised double-blind comparison. *Lancet* **359**, 1715-20 (2002).
- Lehninger, A. L. Enzymes in *Principles of biochemistry* (Nelson, D. M. & Cox, M. M.) 273-290 (Worth Publishers, New-York, 2000).
- Leung, D., et al. Protease inhibitors: current status and future prospects. *J Med Chem* **43**, 305-41 (2000).
- Levi, M. Hemostasis in the 21st century. *Neth J Med* **55**, 280-6 (1999).
- Majerus, P. W., et al. Médicaments anticoagulants, thrombolytiques et antiplaquettaires in *Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments* (Goodman & Gilman) pp. 1327-1346 (Mc Graw-Hill, 1995).
- Morrison, J. F. & Walsh, C. T. The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **61**, 201-301 (1988).
- Murray, R. K., et al. Protéines plasmatiques, immunoglobulines et coagulation sanguine in *Biochimie de Harper* pp. 751-760 (de Boeck, Bruxelles, 2002).
- Parlow, J. J., et al. Design, parallel synthesis, and crystal structures of pyrazinone antithrombotics as selective inhibitors of the tissue factor VIIa complex. *Journal of Medicinal Chemistry* **46**, 4050-4062 (2003).
- Pochet, L., et al. Investigation of the inhibition mechanism of coumarins on chymotrypsin by mass spectrometry. *Tetrahedron* **59**, 4557-4561 (2003).
- Pochet, L., et al. Coumarinic derivatives as mechanism-based inhibitors of alpha-chymotrypsin and human leukocyte elastase. *Bioorg Med Chem* **8**, 1489-501 (2000).
- Pochet, L., et al. Esters and amides of 6-(chloromethyl)-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxylic acid as inhibitors of alpha-chymotrypsin: significance of the "aromatic" nature of the novel ester-type coumarin for strong inhibitory activity. *J Med Chem* **39**, 2579-85 (1996).

- Pothula, A., et al. Pathophysiology and therapeutic modification of thrombin generation in patients with coronary artery disease. *Eur J Pharmacol* **402**, 1-10 (2000).
- Powers, J. C., et al. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev* **102**, 4639-750 (2002).
- Rabiet, M. J., et al. Prothrombin fragment 1 X 2 X 3, a major product of prothrombin activation in human plasma. *J Biol Chem* **261**, 13210-5 (1986).
- Rasche, H. Hemostasis and thrombosis: an overview. *European Heart Journal Supplements* **3**, Q3-Q7 (2001).
- Salyers, A. K., et al. Assessment of bleeding propensity in non-human primates by combination of selective tissue factor/VIIa inhibition and aspirin compared to warfarin and aspirin treatment. *Pharmacology* **70**, 100-6 (2004).
- Sato, K., et al. Antithrombotic effect of YM-75466 is separated from its effect on bleeding time and coagulation time. *Eur J Pharmacol* **352**, 59-63 (1998).
- Schechter, I. & Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **27**, 157-62 (1967).
- Silverman, R. B. Mechanism-based enzyme inactivators. *Methods Enzymol* **249**, 240-83 (1995).
- Simmonds, R. E., et al. Regulation of coagulation in *Thrombosis and Hemorrhage* (Loscalzo, J.&Schafer, A. I.) pp. 35-61 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003).
- Steinmetzer, T., et al. Advances in the development of thrombin inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* **10**, 845-64 (2001).
- Stubbs, M. T. & Bode, W. Structure and specificity in coagulation and its inhibition. *Trends in Cardiovascular Medicine* **5**, 157-166 (1995).
- Suleymanov, O. D., et al. Pharmacological interruption of acute thrombus formation with minimal hemorrhagic complications by a small molecule tissue factor/factor VIIa inhibitor: comparison to factor Xa and thrombin inhibition in a nonhuman primate thrombosis model. *J Pharmacol Exp Ther* **306**, 1115-21 (2003).
- Vacca, J. P. New advances in the discovery of thrombin and factor Xa inhibitors. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 394-400 (2000).
- Vaughan, D. E. & Declerck, P. J. Regulation of fibrinolysis in *Thrombosis and Hemorrhage* (Loscalzo, J.&Schafer, A. I.) pp. 105-119 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003).
- Veldman, A., et al. New insights into the coagulation system and implications for new therapeutic options with recombinant factor VIIa. *Curr Med Chem* **10**, 797-811 (2003).

- Venkateswarlu, D., et al. Structure and dynamics of zymogen human blood coagulation factor X. *Biophys J* **82**, 1190-206 (2002).
- Viles-Gonzales, J. F. & Badimon, J. J. Atherothrombosis: the role of the tissue factor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 25-30 (2004).
- Vlasuk, G. P. & Rote, W. E. Inhibition of factor VIIa/tissue factor with nematode anticoagulant protein c2: from unique mechanism to a promising new clinical anticoagulant. *Trends Cardiovasc Med* **12**, 325-31 (2002).
- Vlasuk, G. P., et al. in *PCT Int. Appl.* 242 pp. (Corvas International, Inc., USA). Wo, 1996)
- Wiiger, M. T. & Prydz, H. Cellular effects of initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation. *Trends Cardiovasc Med* **10**, 360-5 (2000).
- Woolf, N. The cardiovascular system in *Pathology: Basic and Systemic* (Woolf, N.) pp. 327-412 (W. B. Saunders Company, London, 1998).
- Zaman, A. G., et al. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis* **149**, 251-66 (2000).

Liste des abréviations

ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensigène
ADP	Adénosine diphosphate
Ala	Alanine
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANP	Peptide natriurétique atrial
APC	Protéine C activée
Asp	Aspartate
AT III	Antithrombine III
BSA	Albumine sérique bovine
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CO ₂	Dioxyde de carbone
Cys	Cystéine
Da	Daltons
dA	Différence d'absorbance
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
E	Enzyme
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF	"Epitelial growth factor"
E _i	Enzyme inhibée de façon irréversible
ESI	Electrospray ionisation
FIX	Facteur IX
FIXa	Facteur IX activé
FPA	Fibrinopeptide A
FPB	Fibrinopeptide B
FV	Facteur V
FVa	Facteur V activé
FVIIa	Facteur VII activé
FVIII	Facteur VIII
FVIIIa	Facteur VIII activé
FXa	Facteur X activé
FXa	Facteur X activé
FXI	Facteur XI
FXIa	Facteur XI activé
FXII	Facteur XII
FXIIa	Facteur XII activé
FXIII	Facteur XIII
FXIIIa	Facteur XIII activé
Gla	Gamma-carboxyglutamate

Gly	Glycine
GP Ib-IX	Glycoprotéine Ib-IX
GP IIb-IIIa	Glycoprotéine IIb-IIIa
GP VI	Glycoprotéine VI
Hepes	Acide 2-[4-(2-Hydroxyéthyl)-1-pipérazine]éthanesulfonique
His	Histidine
HIV	Virus d'immunodéficience humaine
HMWK	Kinogène de haut poids moléculaire
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
I	Inhibiteur
Il-1	Interleukine-1
Ile	Isoleucine
k_{cat}	Constante catalytique
kDa	kilodaltons
k_i	Constante de vitesse de premier ordre pour l'inactivation à concentration infinie en inhibiteur
K_I	Constante apparente de dissociation d'un complexe enzyme-inhibiteur situé en amont du k_i
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LC/MS	"Liquid chromatography/mass spectrometry"
LDL	Lipoprotéine de faible densité
M	Moles.L ⁻¹
MALDI	"Matrix-assisted laser desorption ionization"
min	Minutes
NA	Nitroanilide
NaCl	Chlorure de sodium
NO	Monoxyde d'azote
O ₂	Oxygène
P	Produit
PAF	Facteur activateur de plaquettes
PAI 1	Inhibiteur des activateurs de plasminogène de type 1
PAI 2	Inhibiteur des activateurs de plasminogène de type 2
PAR	"Protease-activated receptor "
PC	Protéine C
PEG	Polyéthylène glycol
PGI ₂	Prostacycline
PPACK	D-Phe-Pro-Arg-chlorométhylecétone
S	Substrat
Ser	Sérine
Serpine	"Serine protease inhibitor"
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
TAFI	Inhibiteur de fibrinolyse activable par la thrombine
TAP	"Tick anticoagulant peptide"

TF	Facteur tissulaire
TFPI	Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
Thr	Thréonine
THR	Thrombine
tPA	Activateur de plasminogène de type tissulaire
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TXA ₂	Thromboxane A ₂
uPA	Activateur de plasminogène de type urinaire, urokinase
v	Vitesse
v/v	Volume/volume
vWF	Facteur de von Willebrand

