Développement d'une antithrombine modifiée inactive comme antidote des anticoagulants hépariniques

Judicaël Fazavana

▶ **To cite this version:**

Judicaël Fazavana. Développement d'une antithrombine modifiée inactive comme antidote des anticoagulants hépariniques. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114855 . tel-00976551

HAL Id: tel-00976551

https://theses.hal.science/tel-00976551

Submitted on 10 Apr 2014

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 425
Innovation thérapeutique : *du fondamental à l'appliqué*

EA 4531 - Ingénierie des protéines de l'hémostase à potentiel thérapeutique

***DISCIPLINE** : Hématologie*

THÈSE DE DOCTORAT

Développement d'une antithrombine modifiée inactive comme antidote des anticoagulants hépariniques

Par

Judicaël Gevah FAZAVANA

Soutenue le 06 Décembre 2012

Directeur de thèse : **Madame le Professeur Delphine BORGEL**
Co-directeur de thèse : **Madame le Docteur Elsa BIANCHINI**

Membres du jury :

Rapporteurs :	Madame le Docteur Marie-Christine BOUTON	INSERM U698 - CHU Xavier Bichat
	Monsieur le Docteur Bernard LEBONNIEC	INSERM UMR S765 - Université Paris V
Président :	Madame le Professeur Pascale GAUSSEM	INSERM U765 - Université ParisV
Examinateurs :	Monsieur le Docteur Jean-Luc PLANTIER	LFB-BIOTECHNOLOGIES
	Madame le Docteur Elsa BIANCHINI	EA4531 – Université Paris Sud XI
	Madame le Professeur Delphine BORGEL	EA4531 - Université Paris Sud XI

REMERCIEMENTS

Je tiens dans un premier temps à remercier chaleureusement Madame le Professeur Delphine BORGEL, pour m'avoir confié ce travail de recherche. Merci infiniment pour ton encadrement très pédagogique, ta disponibilité, tes encouragements, ainsi que pour tes précieux conseils au cours de ces années.

Je remercie également Madame le Docteur Elsa BIANCHINI, qui a co-dirigé ce travail de thèse. Qu'elle trouve ici ma profonde reconnaissance pour ses explications très pédagogiques, son sens de rigueur, et son esprit critique très perspicace qui m'ont permis de mener dans les meilleures conditions ce travail de thèse.

Mes remerciements vont également au Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose (GEHT), et la Société Française d'Hématologie d'avoir cru en ce projet et ont financé mes années de thèse.

J'exprime ensuite ma plus profonde gratitude à Madame le Docteur Marie-Christine BOUTON, et Monsieur le Docteur Bernard LE BONNIEC qui ont gentiment accepté de rapporter cette thèse, de même que pour leur participation à ce jury. Leurs nombreuses remarques et suggestions prestigieuses ont permis d'améliorer la qualité de ce travail.

Je tiens également à remercier Madame le Professeur Pascale GAUSSEM, et Monsieur le Docteur Jean-Luc PLANTIER, qui ont eu la gentillesse de faire partie de ce jury en tant qu'examinateurs.

J'aimerais adresser un remerciement particulier à Madame le Docteur Véronique PICARD, et Monsieur le Docteur François SALLER, pour leur sympathie et leur soutien tout au long de ces années.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes. Que me pardonnent celles que j'oublie ici, mais j'adresse une pensée particulière à Madame le Professeur Myriam TAVERNA (UMR CNRS 8612), Madame le Docteur Claire SMADJA (UMR CNRS 8612), Monsieur le Professeur Jean-Daniel BRION (BIOCIS), Monsieur le Docteur Mouad ALAMI (BIOCIS), et Monsieur le Docteur Abadallah HAMZE (BIOCIS), pour leurs précieux conseils.

J'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable, grâce à l'ensemble des membres de l'équipe EA 4531. Je pense particulièrement à Allan de Quevilly, Yasmine de Kabylie, Stéphane d'Arles, Sylvie de Carpentras, et Antonella de Sicilia. FAZOU vous dit Merci pour votre bonne humeur.

Un immense merci aux plateformes de l'IFR141 (Valérie, Stéphanie, Céline, et Claudine) pour leur aide dans les collaborations entreprises au cours de ce travail de recherche.
Mes dernières pensées iront vers mon grand-père, ma famille, mes amis, et à RANNOU pour leur soutiens sans faille.

RESUME

Les anticoagulants hépariniques sont largement utilisés dans la prophylaxie et le traitement des pathologies thrombotiques. Ces médicaments qui regroupent l'héparine standard (HNF), les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) et le fondaparinux, partagent le même mécanisme anticoagulant en potentialisant l'antithrombine (AT), un inhibiteur physiologique de la coagulation. Leur utilisation en thérapeutique est associée à un risque hémorragique important, et le seul antidote disponible à l'heure actuelle est le sulfate de protamine actif vis à vis des HNF, seulement partiellement vis-à-vis des HBPM, et totalement inefficace contre le fondaparinux pour lequel il n'existe aucun antidote. En outre, le sulfate de protamine est un produit peu maniable responsable de nombreux effets secondaires. C'est dans ce contexte que nous avons entrepris de développer une AT inactive mais toujours capable de lier les héparines comme antidote du fondaparinux et des autres dérivés héparíniques. Cette AT dépourvue d'activité anticoagulante pourra entrer en compétition avec l'AT du patient. Le dérivé héparinique responsable du surdosage sera ainsi déplacé de sa cible et engagé dans une liaison avec une AT inactive. Pour produire une telle AT, nous avons, (1) exprimé un double variant d'AT portant 2 mutations (AT-N135Q-Pro394) en cellules HEK293, (2) modifié de l'AT plasmatique par la 2,3-butanedione (AT-BD), un réactif chimique capable de modifier la chaine latérale des arginines. Le variant AT-N135Q-Pro394 possède une activité anti-Xa inférieure à 0,02% en présence de dérivés héparíniques, et une affinité à l'héparine augmentée d'un facteur 3 en comparaison à l'AT plasmatique. L'AT-BD possède elle une activité anti-Xa réduite mais non négligeable (≈ 12%) et une affinité à l'héparine 20 fois meilleure, comparée à l'AT plasmatique. Malgré ces différences de propriétés biochimiques, dans du plasma humain surchargé en dérivés héparíniques, ces 2 AT modifiées neutralisent d'une façon similaire les HNF, les HBPM et le fondaparinux. De même, elles neutralisent efficacement le fondaparinux et les HNF in vivo, dans un modèle murin. Nous avons donc, au cours de ce travail, développé et décrit pour la première fois un antidote spécifique du fondaparinux. Cet antidote pourra en outre constituer une alternative séduisante au sulfate de protamine en cas de surdosage aux HNF et HBPM vis à vis desquelles il est aussi efficace.

TABLE DES MATIERES

Liste des figures **1**

Liste des tableaux **3**

Liste des abréviations **4**

I- RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES **8**

Chapitre 1 : L'antithrombine, un anticoagulant physiologique majeur *9*

A- L'hémostase et la coagulation 9

B- La régulation de la coagulation 11

Chapitre 2 : L'antithrombine *14*

A- La biosynthèse et la distribution de l'antithrombine *in vivo* 14

B- Relation Structure-fonction de l'antithrombine 17

1- La superfamille des SERPIN 17

2- Les propriétés structurales de l'antithrombine 19

a- Structure primaire et modifications post-traductionnelles de l'antithrombine 19

b- Les différentes conformations de l'antithrombine 20

b-1- La forme native 20

b-2 La forme latente 22

b-3 Les formes polymérisées 23

b-3.1 Modèle « boucle-feuillet β A » 23

b-3.2 Modèle des formes polymérogènes 24

3- Mécanisme d'inhibition des sérine-protéases par l'antithrombine 25

a- La base moléculaire de l'inhibition des sérine-protéases de la coagulation par l'antithrombine . 25

b- L'importance des résidus de la boucle réactive dans l'activité inhibitrice de l'antithrombine 26

4- La potentialisation de l'activité anticoagulante de l'antithrombine par les dérivés hépariniques 28

a- Le domaine d'interaction à l'héparine 28

b- Le mécanisme d'activation allostérique de l'antithrombine par l'héparine 29

b-1 L'activation allostérique de l'AT par le pentasaccharide 30

b-2 L'effet matriciel de l'héparine dans la potentialisation de l'activité inhibitrice de l'AT 33

5- Déficits héréditaires en antithrombine et risques thrombotiques 33

Chapitre 3 : Les anticoagulants héparíniques *35*

A- Physiopathologie de la maladie thromboembolique 35

B- Epidémiologie de la maladie thromboembolique 36

C- Les anticoagulants dans le traitement des maladies thrombotiques 37

D- Les anticoagulants héparíniques 38

1- L'héparine standard ou non fractionnée (HNF) 38
a- Structure et propriétés physico-chimiques 38
b- Les héparines standard commercialisées 41
c- L'activité anticoagulante et antithrombotique de l'héparine standard 42
c-1 Interaction avec l'AT 42
c-2 Interaction avec le « 2è cofacteur de l'héparine (HCII) » 43
d- Pharmacocinétique de l'HNF 43
e- Limitations et effets secondaires des traitements par l'héparine standard 44
e-1 Limitations pharmacocinétiques 44
e-2 Limitations biophysiques 44
e-3 Effets secondaires 45
2- Les Héparines de Bas Poids Moléculaire (HBPM) 46
a- Structure et propriétés physico-chimiques 46
b- Activité des HBPM sur la coagulation 48
c- Pharmacocinétique des HBPM 49
d- Limitations et effets secondaires 49
3- Le fondaparinux sodique 49
a- Structure et propriétés physico-chimiques 50
b- Mécanisme d'action 51
c- Pharmacocinétique du fondaparinux sodique 51
d- Les différences majeures du fondaparinux comparé aux HNF et HBPM 51
E- Les différentes stratégies de neutralisation des héparines 52
1- L'utilisation du sulfate de protamine 52
2- Les stratégies mécaniques utilisées en thérapeutique pour éliminer les héparines 54
3- L'utilisation des facteurs procoagulants 54
4- Les différentes stratégies alternatives proposées pour neutraliser les anticoagulants hépariniques 55

II- OBJECTIF DE L'ETUDE 58

III- L'APPROCHE RECOMBINANTE (Article 1) 61

IV- L'APPROCHE CHIMIQUE (Article 2) 73

V- DISCUSSION ET PERSPECTIVE 112

VI- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 124

LISTE DES FIGURES

Page

Fig 1 : Représentation schématique de l'activation de la coagulation physiologique 10
Fig 2 : Représentation schématique des majeurs systèmes de régulation physiologique de la coagulation 12
Fig 3 : Modèle d'élimination de l'AT in vivo 16
Fig 4 : L'archétype de structure tridimensionnelle des SERPIN 17
Fig 5 : Structure de la chaîne glycane de l'AT plasmatique 20
Fig 6 : Structure tridimensionnelle de la forme native de l'AT 20
Fig 7 : La nomenclature et la représentation de Schester et Berger des résidus de la boucle réactive de l'AT 20
Fig 8 : Structure tridimensionnelle de la forme latente de l'AT 22
Fig 9 : Modèle de polymérisation des SERPIN : « Boucle-feuillet β A » 24
Fig 10 : Modèle de polymérisation des formes polymérogènes des SERPIN 25
Fig 11 : Schéma simplifié du mécanisme catalytique des sérine-protéases 25
Fig 12 : Modèle d'inhibition d'une sérine protéase par une SERPIN 25
Fig 13 : Représentation des résidus du domaine d'interaction à l'héparine de l'AT 29
Fig 14 : Modèle d'activation allostérique de l'AT par l'héparine 31
Fig 15 : Diversité et organisation structurale de l'héparine 39
Fig 16 : Modèle moléculaire d'une chaîne d'héparine 39
Fig 17 : Distribution des poids moléculaires des HNF et des HBPM 48
Fig 18 : Comparaison des structures chimiques du motif pentasaccharide de l'héparine et du fondaparinux 50
Fig 19 : Schéma relationnel entre l'arginine et le phénylglyoxal 75
Fig 20 : Schéma relationnel entre l'arginine et la 1,2-cyclohexanedione 75
Fig 21 : Schéma relationnel entre l'arginine et la 2,3-butanedione 76
Fig 22 : Structures chimiques des composés dérivés de la modification de l'arginine par la 2,3-butanedione 77
Fig 23 : Structures chimiques de la naphtoquinone 4-sulfonate, de l'acide croconique, et du benzile 78
Fig 24 : Position des arginines impliquées dans l'activité anticoagulante de l'AT en présence d'héparine 78

Fig 25 : Superposition des cartes peptidiques de l'AT contrôle et de l'AT-BD 81
Fig 26 : Localisation des arginines modifiées par la 2,3-butanedione sur l'AT 84

LISTE DES TABLEAUX

Page

Tableau 1 : Les structures secondaires de l'AT 21

Tableau 2 : Constante cinétique d'inhibition ou kon des protéases de la coagulation par l'α-AT 30

Tableau 3 : Liste des héparines non fractionnées commercialisées en France 41

Tableau 4 : Caractéristiques physico-chimiques des HBPM commercialisées 48

Tableau 5 : Comparaison du fondaparinux aux autres anticoagulants hépariniques 51

Tableau 6 : Gradient de phase B 81

Tableau 7 : Les arginines identifiées dans les peptides séquencés 82

LISTE DES ABREVIATIONS

ACT	Activated coagulation time
ACTH	Adrenocorticotropin hormon
AT	Antithrombine
AT-BD	Antithrombine-Butanedione
CEC	Circulation extra corporelle
CK18	Cytokératine 18
Crma	Cytokine response modifier A
DMSO	Dyméthyl sulfoxyde
EP	Embolie pulmonaire
EPCR	Endothelial protein C Receptor
FT	Facteur tissulaire
GAG	Glycosaminoglycane
Gle	Glucosamine
GluA	Glucorinic acid
GPI	Glycophosphatidyl inositol
HBPM	Héparine de bas poids moléculaire
HCII	Heparin cofactor II
HDL	High density lipoprotein
HEK293	Human embryonic kidney 293
HNF	Héparine non fractionnée
KD	Constante de dissociation à l'équilibre
LDL	Low density lipoprotein
LRP	Low density lipoprotein receptor related protein
Maldi	Matrix-Assisted-laser-desorption-ionization
MS	Mass spectrometry
MTEV	Maladie thrombo-embolique veineuse
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
Pdb	Protein data bank
PEDF	Pigment epithelium derived factor
PF4	Platelet factor 4
PFC	Plasma frais congelé

PI9	Protease inhibitor 9
RCL	Reactive center loop
SCCA 1	Squamous cell carcinoma antigen 1
SDS PAGE	Sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis
SEC-R	Serpin Enzym Complex – Receptor
SERPIN	Serine protease inhibitor
TCA	Temps de céphaline activée
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TIH	Thrombocytopénie induite à l'héparine
TM	Thrombomoduline
TNBS	Trinitrobenzene sulfonic acid
TOF	Time of Flight
TVP	Thrombose veineuse profonde

Les thromboses artérielles ou veineuses sont des pathologies très fréquentes des pays industrialisés, dont les complications sont nombreuses, souvent graves, et parfois fatales. Parmi les agents anti-thrombotiques utilisés en thérapeutique pour traiter les pathologies thrombotiques, les anticoagulants héparíniques occupent une place importante. Ces médicaments qui regroupent l'héparine standard, les héparines de bas poids moléculaire, et le fondaparinux, partagent le même mécanisme d'action, celui de potentialiser l'activité anticoagulante d'un inhibiteur physiologique de la coagulation : « l'antithrombine ».

Malgré l'utilité incontestable de ces médicaments, la principale complication liée à leur utilisation est d'ordre hémorragique. L'héparine standard peut être neutralisée par le sulfate de protamine aussi utilisé pour neutraliser les héparines de bas poids moléculaire, même si celui-ci ne présente qu'une efficacité partielle vis à vis de ces dernières. En revanche, le sulfate de protamine n'a aucun effet vis-à-vis du fondaparinux, pour lequel il n'y a aucun antidote actuellement. En outre, le sulfate de protamine possède des effets secondaires importants comme des complications hémorragiques, allergiques, et cardiovasculaires, et le développement d'une approche alternative spécifique a déjà fait l'objet de nombreux travaux de recherche.

Connaissant la base moléculaire de l'activité anticoagulante des dérivés héparíniques et la relation structure-fonction de l'antithrombine, notre équipe propose une antithrombine dénuée d'activité anticoagulante, mais qui a conservé sa capacité à lier les héparines. Cette antithrombine inactive sera capable d'entrer en compétition avec l'antithrombine plasmatique du patient, pour capturer les molécules de dérivé héparíniques, et leur effet anticoagulant sera neutralisé. Alors, nous proposons un antidote commun, spécifique à tous les anticoagulants héparíniques. Il sera non seulement capable de neutraliser le fondaparinux pour lequel il n'existe aucun antidote, mais il sera une alternative intéressante au sulfate de protamine pour les héparines de bas poids moléculaire et à l'héparine standard.

Ce travail de thèse a donc consisté à mettre au point cet antidote original par deux approches différentes : une approche recombinante, et une approche chimique. Ces antithrombines modifiées ont ensuite été caractérisées, puis testées pour leur propriété antidote des anticoagulants héparíniques.

Après une première partie de rappels bibliographiques consacrés à la place de l'antithrombine dans la coagulation, la biochimie et les principales caractéristiques structurales puis fonctionnelles de l'antithrombine, et aux anticoagulants héparíniques, la seconde partie présente les résultats des travaux menés au cours de ce travail de thèse. L'ensemble de ces résultats est présenté sous forme de deux articles. Le premier, publié en

2011, rapporte la caractérisation de l'antithrombine recombinante inactive comme antidote des anticoagulants hépariniques, et le second de la caractérisation des propriétés antidotes d'une antithrombine modifiée chimiquement vis-à-vis des anticoagulants hépariniques. Ce deuxième article est actuellement soumis pour publication

I- RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre 1 : L'antithrombine, un anticoagulant physiologique majeur

A- L'hémostase et la coagulation

L'hémostase est l'ensemble des mécanismes qui concourent à maintenir la fluidité du sang mais aussi à colmater les brèches vasculaires pour arrêter les hémorragies. En cas de lésion vasculaire, on observe une vasoconstriction réflexe, et le déclenchement de l'hémostase dite primaire initiée par adhésion des plaquettes sanguines au site de la lésion. Les plaquettes, cellules anucléées représentant moins de 1‰ du volume total de cellules sanguines, sont ensuite activées et agrègent afin de former un clou plaquettaire relativement lâche qui nécessite, en fonction du diamètre du vaisseau endommagé, une consolidation ultérieure par un réseau de fibrine. L'activation des plaquettes entraîne un changement morphologique de ces dernières ainsi qu'une exposition de phospholipides anioniques au niveau de la couche externe de leur membrane plasmique. Les membranes des plaquettes activées fournissent ainsi une surface d'interaction pour les facteurs de la coagulation. Ces facteurs participent à des réactions enzymatiques en cascade aboutissant à la génération locale de thrombine, enzyme clé de la coagulation (Figure 1). La thrombine transforme le fibrinogène soluble en fibrine insoluble et l'évènement final est la formation d'un caillot composé de fibrine et de plaquettes activées.[1]

La majorité des réactions enzymatiques impliquées dans la cascade de la coagulation sont des réactions de protéolyse limitée convertissant des zymogènes de sérine protéase en enzymes actives. *In vivo*, la rupture de l'endothélium expose les tissus extravasculaires au sang, et l'initiation de la coagulation est due à l'exposition à la circulation sanguine du facteur tissulaire (FT), une protéine transmembranaire présente dans l'adventice de la paroi vasculaire.[1] En présence de calcium, le FT se lie à la forme zymogène du Facteur VII (FVII) et au Facteur VII activé (FVIIa) présent en très faible quantité dans le plasma à l'état physiologique. Le FVIIa lié au FT va alors déclencher la coagulation en activant les Facteurs IX et X en FIXa, FXa respectivement. Le FVIIa en lui-même n'exprime que peu d'activité protéolytique envers ses substrats FIX et FX, alors qu'une fois associé au FT en présence de phospholipide, cette activité est augmentée d'un facteur supérieur à 5500, *in vitro*.[2,3] Pour amplifier cette phase d'initiation de la coagulation, le FVII qui se lie lui aussi au FT, est principalement activé par le FVIIa disponible.[4]

Le complexe FT-FVIIa génère suffisamment de FXa pour activer de faible quantité de prothrombine en thrombine. Les premières traces de thrombine produites au cours de cette phase d'initiation induisent alors l'activation des plaquettes qui vont exposer des surfaces phospholipidiques chargées négativement, mais aussi l'activation des cofacteurs V (FV) et VIII (FVIII) respectivement en FVa et FVIIIa. Le cofacteur FVIII circule dans le sang associé au facteur de von Willebrand, une protéine impliquée dans la formation initiale du clou plaquettaire. Une fois activée par la thrombine, il se dissocie du facteur von Willebrand pour se lier au FIXa et former, à la surface des plaquettes et en présence du calcium, le « complexe tenase ». La formation de ce complexe est essentielle pour l'amplification de la coagulation et permettre la génération d'une quantité de thrombine suffisante pour la formation du thrombus fibrino-plaquettaire. La production du FXa est augmentée d'un facteur 50 à 100 par rapport à celle générée lors de la phase d'initiation de la coagulation.[5] A son tour, en présence de calcium, le FXa s'associe à son cofacteur FVa sur la surface phospholipidique membranaire pour former le « complexe prothrombinase ». Ce dernier va activer la prothrombine en thrombine conduisant à une génération explosive de thrombine. Enfin, une dernière voie d'auto-amplification va venir renforcer la génération de thrombine. Elle passe par l'activation du Facteur XI (FXI) en FXIa par la thrombine. Le FXIa produit, active le FIX en FIXa, qui à son tour, va activer du FX supplémentaire, contribuant ainsi à la génération finale de thrombine.[6]

La quantité de thrombine est alors suffisante pour qu'il y ait clivage du fibrinogène soluble en fibrine insoluble et formation du thrombus fibrino-plaquettaire. Afin de stabiliser le réseau de fibrine formé, la thrombine active également le Facteur XIII (FXIII) en Facteur XIII activé (FXIIIa). Cette enzyme est une transglutaminase qui crée des liaisons covalentes transversales fortes et nombreuses entre les monomères de fibrine, permettant la formation d'un réseau entrelacé, stabilisant fortement le caillot préformé.[1] Le thrombus ainsi consolidé sera détruit par le système fibrinolytique dans un second temps, lorsque l'intégrité des zones vasculaires lésées aura été restaurée.

L'activation de la coagulation par l'exposition du FT constitue le mécanisme par lequel la coagulation est initiée *in vivo* en réponse à un traumatisme vasculaire. Cependant, *in vitro*, des surfaces chargées négativement comme le verre ou le kaolin permettent aussi de déclencher la coagulation par une voie alternative qui implique les facteurs dits « de contact » : le Facteur XII (FXII), la prékallicréine, et le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM), qui activent le FXI en FXIa. A son tour, ce dernier transforme le FIX en FIXa.

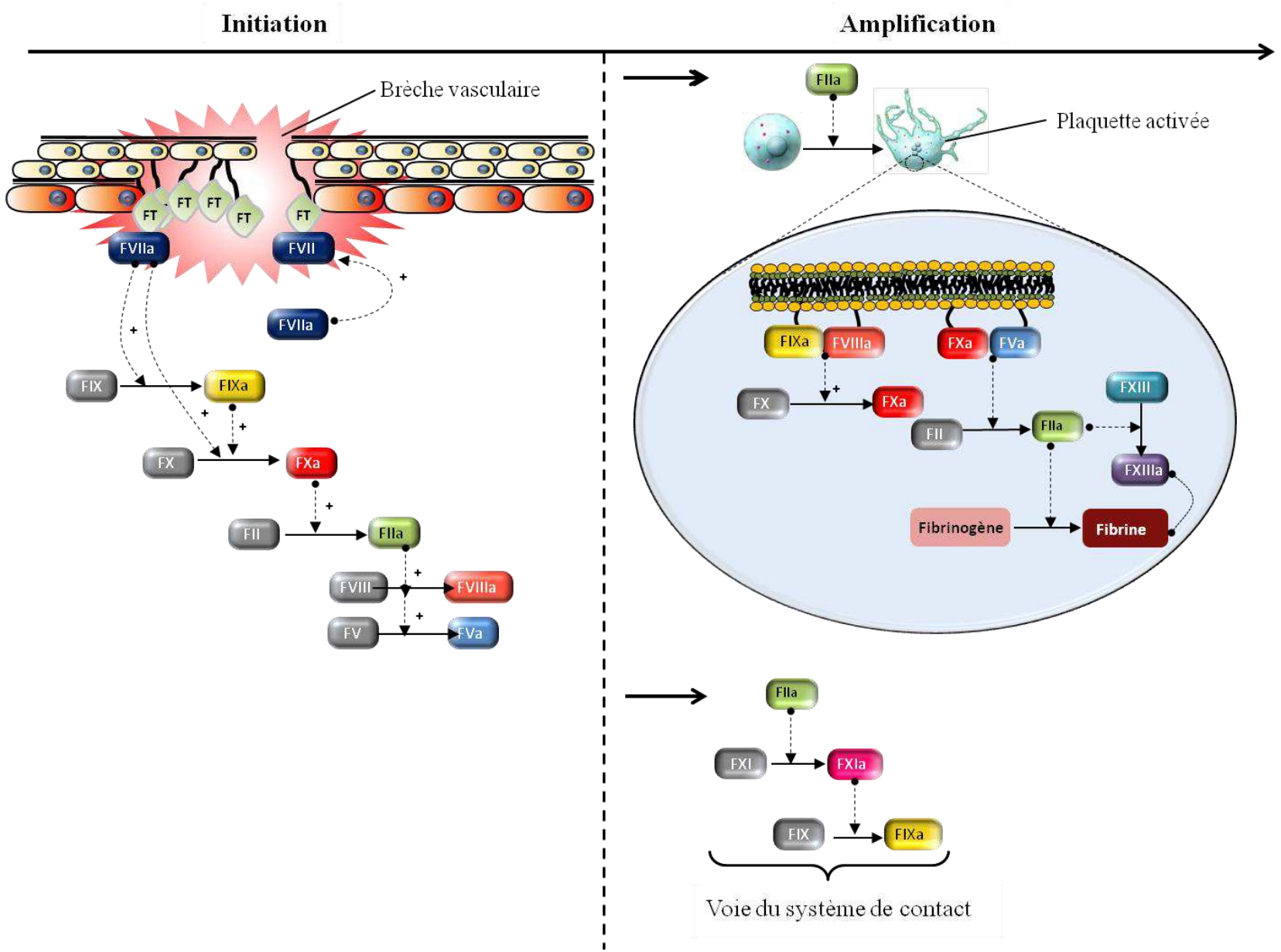


Figure 1 : Représentation schématique de l'activation de la coagulation physiologique selon Dahlback B.[1]

L'importance physiologique de cette voie semble être non significative car les patients déficitaires en protéines du système contact (FXII, KHPM ou prékallicréine) ne présentent pas de syndromes hémorragiques.[1]

B- La régulation de la coagulation

La rapidité de la réponse à une lésion vasculaire est assurée par des phénomènes d'activation rétroactive qui permettent à la cascade de la coagulation de s'auto-amplifier. Toutefois, le fait que ces réactions se déroulent à la surface des membranes cellulaires (plaquettes activées, cellules endothéliales stimulées) permet de restreindre la localisation de la coagulation au site même de la brèche vasculaire et ainsi de limiter le risque d'obstruction du lit vasculaire.

De plus, le très fort potentiel d'amplification de la cascade de la coagulation est finement régulé par des inhibiteurs physiologiques permettant de maintenir la fluidité du sang. La régulation de la coagulation est relativement complexe et implique de nombreuses molécules anticoagulantes. Les principaux systèmes sont l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), le système protéine C, et l'antithrombine (AT) (Figure 2),[1] même si d'autres molécules comme le 2ème cofacteur de l'héparine, l'inhibiteur de protéase protéine Z-dépendante, la protéase nexine-I, l'α-2-macroglobuline, ou l'inhibiteur de complément C1 estérase, peuvent contribuer à la régulation de la coagulation.

L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) régule l'initiation de la coagulation en inhibant le FXa et le complexe FT-FVIIa.[7] En fait, c'est un inhibiteur de type « Kunitz » synthétisé majoritairement par les cellules endothéliales, et dont 85% se trouvent liées aux cellules endothéliales de la microvascularisation.[8]

Le TFPI circule dans le plasma à une concentration de ≈ 2,5nM, et 80% à 90% sont associés aux lipoprotéines (Lipoprotein low density ou LDL, High density lipoprotein ou HDL).[8,9] *In vivo*, il y a 2 isoformes majeures de TFPI : le TFPI α de 36kDa et le TFPI β de 28kDa.[7] L'inhibition de l'initiation de la coagulation par le TFPI se fait en 2 étapes. Dans un premier temps, le TFPI forme un complexe binaire avec le FXa par le domaine « Kunitz II », ce qui inhibe le FXa. Dans un second temps, le complexe se lie au complexe FT-FVIIa grâce à une liaison entre le 1er domaine « Kunitz » du TFPI et le FVIIa. Il se forme ainsi un

complexe quaternaire FXa-TFPI-FVIIa-FT, au sein duquel le FXa, le FVIIa, et le FT n'ont plus d'activité.[7]

Le second système est **le système de la protéine C** qui comprend des protéines plasmatiques (la protéine C et la protéine S), des récepteurs membranaires comme la thrombomoduline (TM) et l'EPCR (Endothelial Protein C Receptor), et a pour cibles les Facteurs Va et VIIIa.[10]

La protéine C circule dans le plasma sous la forme d'un zymogène inactif. Lorsque de la thrombine est générée, cette dernière va se lier à la TM présente à la surface endothéliale. Cette interaction de haute affinité ($K_D \approx 0,5nM$)[10] implique l'exosite I de la thrombine, une région importante pour son activité catalytique vis-à-vis du fibrinogène, ce qui va réduire son activité procoagulante.[11] De son côté, la protéine C se lie à un récepteur endothélial l'EPCR, ce qui la rapproche du complexe TM-thrombine, et la présente sous une conformation adéquate pour être activée. La thrombine liée à la TM peut alors hydrolyser la protéine C en protéine C activée (PCa). *In vivo*, l'activation de la protéine C par le complexe TM-thrombine est augmentée d'un facteur ≈ 20 lorsqu'elle est liée à l'EPCR.[12]

L'activité anticoagulante de la PCa est augmentée en présence de 2 cofacteurs : la protéine S, une protéine vitamine K-dépendante, et la forme intacte du FV.

Plus de la moitié de la protéine S circule dans le plasma, liée à une protéine du système du complément, la « C4b binding protein ». Seules ≈30% circulent sous forme libre, peuvent s'associer et jouer le rôle de cofacteur de la PCa.[13] L'interaction entre la protéine S et la PCa semble réduire la distance entre le site actif de la PCa et la membrane phospholipidique, et permet de réorienter le site actif par rapport aux sites de clivage au niveau des FVa et FVIIIa. *In vivo*, la protéine S suffit à accélérer l'inactivation du FVa nécessaire pour le complexe « prothrombinase » par la PCa, alors qu'il nécessite le FV comme 2è cofacteur pour hydrolyser le FVIIIa impliqué dans le complexe « tenase ».[10]

Comme pour toutes les sérine-protéases de la coagulation, l'activité anticoagulante de la PCa est régulée par des inhibiteurs en particulier l'inhibiteur de la protéine C, l'α-1-antitrypsine, et l'α-2-macroglobuline.[10]

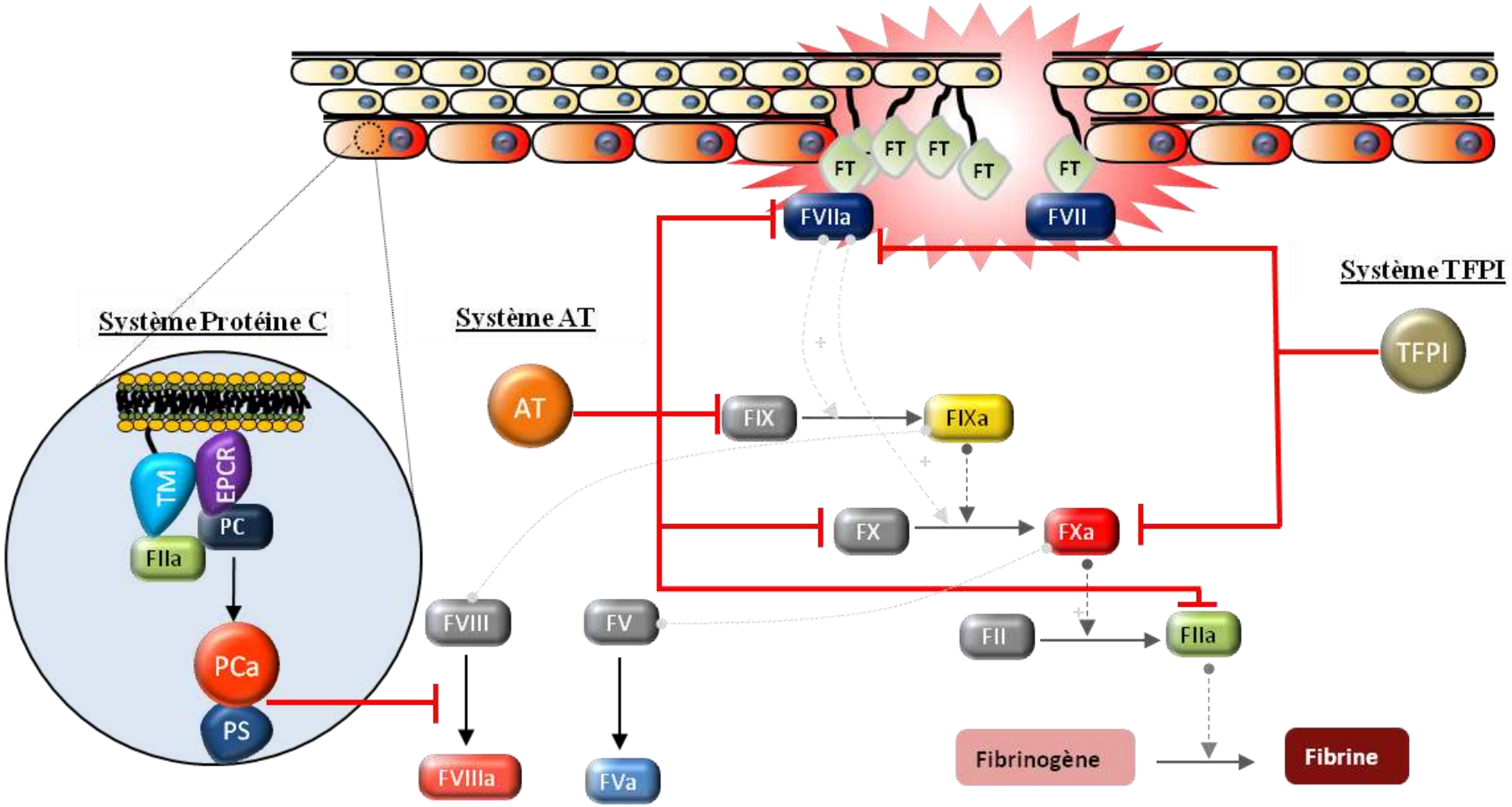


Figure 2 : Représentation schématique des majeurs systèmes de régulation physiologique de la coagulation.[1]

L'importance physiologique du système de la protéine C est démontrée par le fait que le déficit homozygote en protéine C ou en protéine S chez l'homme est associé à des pathologies thromboemboliques sévères dès la naissance.[14] Par ailleurs, des souris n'exprimant pas la protéine C ou la TM ne sont pas viables.[15,16]

Enfin, **l'antithrombine (AT)** est un inhibiteur majeur de la coagulation appartenant à la famille des Serpin (Cf chapitre 2). Elle circule dans le sang à une forte concentration (≈ 2-3µM), et inhibe presque toutes les sérines protéases impliquées dans la coagulation, notamment les Facteurs IIa, Xa, IXa, XIa, et secondairement la kallicréine, les Facteurs XIIa, et VIIa.[17] Elle forme un complexe covalent inactif avec l'enzyme (stœchiométrie 1/1), permettant de bloquer le site catalytique de l'enzyme cible.

L'inhibition des sérine-protéases de la coagulation par l'AT est relativement lente.[17] Il est connu depuis longtemps que les glycosaminoglycanes (GAG) polysulfatés peuvent accélérer fortement l'activité inhibitrice de l'AT.[18] Parmi ces GAG, l'héparine, extraite des muqueuses pulmonaires de bœuf ou intestinales de porc, est utilisée en thérapeutique comme anticoagulant puisqu'elle potentialise d'une manière importante l'inhibition des sérine-protéases de la coagulation par l'AT. Des analogues structuraux de l'héparine sont présents à la surface de beaucoup de cellules, notamment les cellules endothéliales, il s'agit des héparan-sulfates. En effet, une des variétés des héparan-sulfates endothéliaux présente le motif pentasaccharide de l'héparine, acteur majeur de son activité anticoagulante.[19] *In vitro*, les héparan-sulfates potentialisent l'activité inhibitrice de l'AT.[20] Il est donc communément admis qu'ils peuvent jouer un rôle dans la régulation de la coagulation *in vivo*. Cependant, de façon étonnante, des souris qui n'expriment pas d'héparan-sulfates ont une hémostase normale, laissant le débat sur le rôle anticoagulant des héparan-sulfates *in vivo* encore largement ouvert.[20,21]

L'AT est connue pour son rôle dans la régulation de la coagulation. D'autres activités biologiques de cet inhibiteur physiologique sont décrites, notamment un effet antiangiogénique[22] et un effet anti-inflammatoire,[23] mais en dehors de son activité anticoagulante, aucune des autres activités biologiques de l'AT ne semble avoir une relevance physiologique majeure connue.

Chapitre 2 : L'antithrombine

A- La biosynthèse et la distribution de l'antithrombine *in vivo*

L'AT est principalement synthétisée dans le foie et secrétée dans le plasma à une concentration aux alentours de 2 à 3µM.[24] Ainsi, le niveau d'AT chez les patients qui souffrent de pathologies hépatocellulaires sévères (cirrhose hépatique, cas de transplantation de foie…) est fortement diminué.[25] *In vitro*, une lignée de cellules cancéreuses hépatiques humaines (HepG2) et des cellules hépatiques différentiées de souris synthétisent et sécrètent de l'AT biologiquement active.[26,27] Enfin, des études ont aussi montré la présence d'AT dans l'appareil de Golgi des hépatocytes de rat.[28] Toutefois, d'autres études ont décrit la présence de l'AT en petite quantité dans les cellules endothéliales, les plaquettes, les cellules rénales, les cellules des poumons, et les cellules astrogliales du cerveau, mais l'importance physiologique de ces sources secondaires n'est pas connue.[29-31]

Actuellement, peu de choses sont décrites sur la régulation de la biosynthèse de l'AT. Cependant, des études ont montré que le taux d'AT circulante chez les femmes traitées par des hormones ovariennes est diminué (≈ de 10-13%),[32] mais actuellement, il n'est pas encore établi le rôle de ces hormones dans la biosynthèse de l'AT. A l'inverse, l'insuline augmente la production de l'AT chez les HepG2 en culture.[33] Puis, les hormones thyroïdiennes (Tri-iodothyronine) et la vitamine A semblent être également capables d'augmenter la production de l'AT chez les HepG2.[34] Enfin, la production de l'AT chez l'homme croît avec l'âge, et reste stable à l'âge adulte.[35] Pourtant, certaines études ont montré que le taux plasmatique en AT chez les hommes décroit à partir de l'âge de 50 ans, ce qui pourrait être un facteur de risque thrombotique chez ces personnes.[36]

Une fois sécrétée, l'AT est retrouvée chez l'homme au moins dans deux compartiments : le plasma où elle exerce son activité physiologique, et le compartiment extravasculaire, où elle est éliminée. Carlson et al., en administrant de l'AT radio-marquée chez l'homme, proposent un modèle de distribution à trois compartiments. Le 1er compartiment est le plasma, le 2ème la surface vasculaire, et le 3ème le compartiment extravasculaire. Ainsi, dans ce modèle 39,3% de l'AT sont retrouvées dans le plasma, 10,9% liées à la surface vasculaire et 49,6% se retrouvent dans le compartiment extra vasculaire.[37]

La demi-vie biologique de l'AT chez l'homme est estimée à ≈ 2,8 jours.[38] Des études pharmacocinétiques de l'AT chez des modèles animaux et chez l'homme, ont donc montré l'importance de la surface vasculaire dans l'élimination de l'AT *in vivo*, et ont décrit 2 phases distinctes de l'élimination de l'AT :

- une première phase cinétiquement rapide pendant laquelle l'AT est capturée à la surface vasculaire

- puis, une seconde phase plus lente pendant laquelle l'AT est transférée dans le compartiment extravasculaire.[39]

En dépit de nombreuses études réalisées, le mécanisme d'élimination de l'AT i*n vivo* est encore mal connu. Cela dit, il est admis actuellement que cette élimination est associée à la formation du complexe « AT-protéase ». En effet, le complexe « AT-thrombine »est éliminé de la circulation sanguine plus rapidement que l'AT seule.[40]

Des études *in vivo* ont montré qu'après administration du complexe « AT-thrombine » radio-marqué, le complexe se localise majoritairement associé aux hépatocytes, ce qui montre l'importance de ces cellules dans le catabolisme de l'AT *in vivo*.[40]

Par ailleurs, le complexe « AT-thrombine » se lie très bien à la vitronectine, d'ailleurs, ce complexe a été souvent détecté, associé à la vitronectine par le biais de la thrombine dans le plasma, laissant supposer une élimination de l'AT dans un complexe ternaire « AT-protéase-vitronectine ».[40]

Il est également connu que le complexe « AT-thrombine-vitronectine » se lie très bien aux héparan-sulfates à la surface des hépatocytes et cellules endothéliales. Ainsi, en présence d'héparine ou protamine (inhibiteur d'héparine), on diminue considérablement l'élimination du complexe, *in vitro*, et *in vivo*.[40]

Il est aussi rapporté le rôle éventuel d'une protéine membranaire, appartenant à la famille des filaments intermédiaires de la kératine (cytokératine 18 ou CK18). En effet, cette protéine est exprimée dans de nombreux tissus dont le tissu hépatique, et elle lie le complexe « AT-thrombine ». Alors, un anticorps anti-CK 18 diminue l'internalisation du complexe « AT-thrombine » dans des cellules hépatiques de rat (HTC).[40]

Des études ont montré que la CK 18 est co-exprimée, donc co-localisée avec les récepteurs LRP α et β (Low-density lipoprotein receptor-related protein). D'ailleurs, la CK 18 est co-immunoprécipitée avec le LRP β. Or, il est connu que la vitronectine se lie à une séquence peptidique très conservée chez les protéines du complément (C6,C7, C8, C9), une

séquence qui se trouve également chez le récepteur LRP α.[41] En effet, en bloquant les LRP présents à la surface des cellules HepG2, l'élimination du complexe « AT-thrombine » est retardée, alors qu'en présence de vitronectine, l'élimination du complexe « thrombine-PAI-1 », une Serpin impliquée dans la fibrinolyse, est accélérée.[40]

L'ensemble de ces observations sont résumées dans le modèle de métabolisme de l'AT *in vivo*, proposé par Wells et al., (Fig 3).[40] Alors le complexe « AT-protéase » s'associe à la vitronectine dans le plasma. Le complexe ternaire va être capturé à la surface des cellules, essentiellement hépatiques, par les héparan-sulfates, puis transféré par la suite à la CK18. Ce transfert ainsi que le rôle des récepteurs LRP sont encore peu connus, mais il est suggéré qu'une fois le complexe avec la CK18 formé, le récepteur LRP α se lie à la vitronectine. La formation d'un complexe de cette taille permettrait certainement de stabiliser le complexe « AT-protéase », aboutissant à son internalisation par endocytose, et sa dégradation à l'intérieur des cellules.

D'un autre côté, d'autres études ont montré que le complexe « AT-thrombine-vitronectine » se lie très bien aux héparan-sulfates à la surface des cellules endothéliales, par l'intermédiaire de la vitronectine. Cette liaison est suivie d'un transfert du complexe dans la matrice sous-endothéliale,[42] ce qui pourrait être une voie d'élimination alternative de l'AT.

En outre, plusieurs études ont également montré que le complexe « AT-protéase » peut être reconnu par le récepteur de complexe Serpin-enzyme (SEC-R) à la surface des hépatocytes ou des monocytes, et qu'après association au récepteur, le complexe serait internalisé pour être dégradé par les enzymes lysosomiales, mais ces voies d'élimination sont encore très peu connues.[40]

Enfin, rien n'est décrit sur le mécanisme d'élimination des AT inactives.

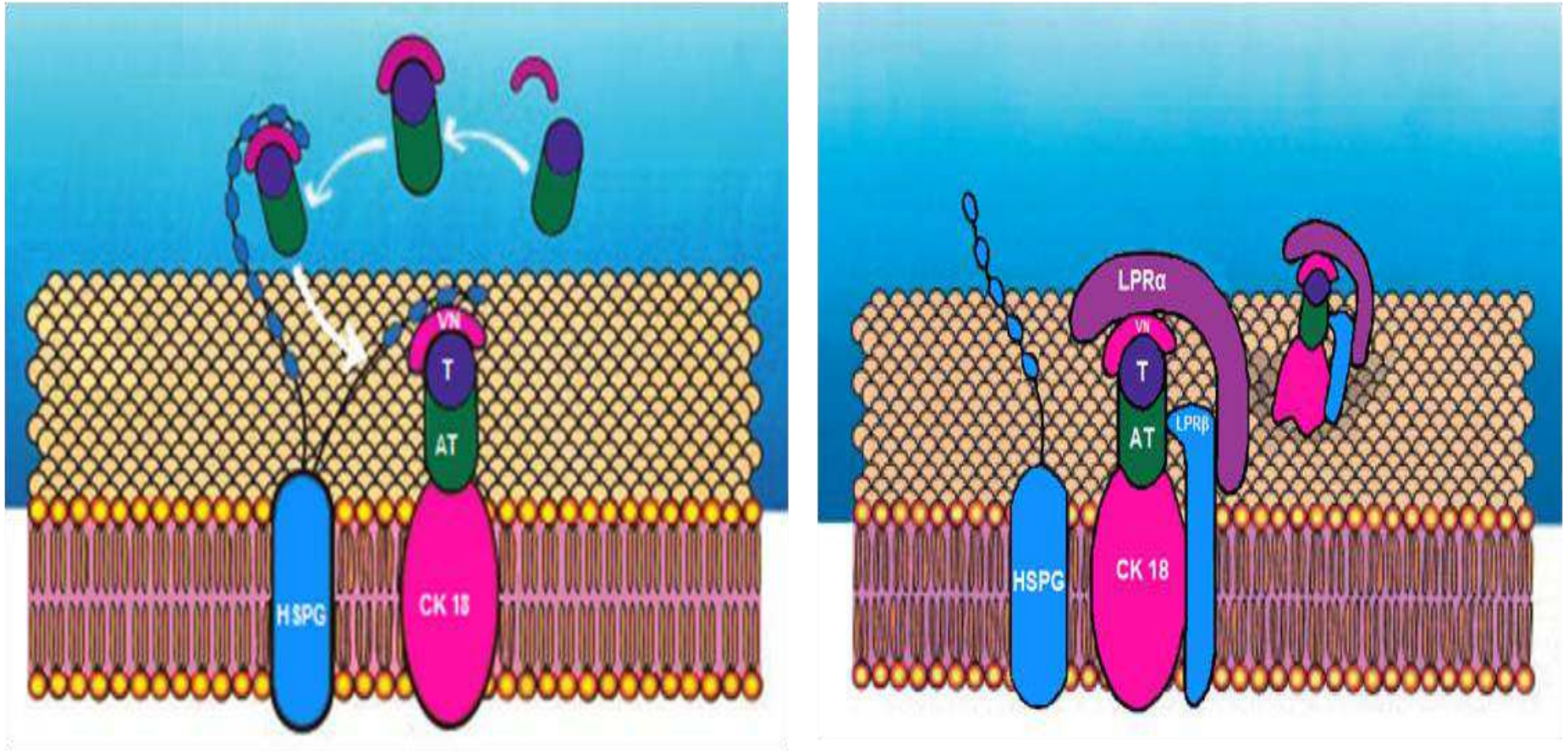


Figure 3: Modèle d'élimination de l'AT *in vivo*. En vert, l'AT. En cyan, la thrombine. En violet rose, la vitronectine (VN). En bleu, les héparan-sulfates (HSPG). En rose, la cytokératine 18 (CK18). En violet, récepteur LRPα (LRPα). Thrombine (T). Récepteur LRPβ (LRPβ). Image tirée de la publication de l'équipe de Wells, 1999.[40]

B- Relation Structure-fonction de l'antithrombine

1- La superfamille des SERPIN

Par définition, SERPIN est l'acronyme anglo-saxon de Serine-Protease Inhibitor ou inhibiteur des sérine-protéases. Les Serpin sont largement distribuées dans la nature puisqu'elles sont présentes aussi bien dans les règnes animal et végétal, que chez les virus. En 2006, la superfamille des Serpin a répertorié plus de 1500 protéines. Chez les eucaryotes, elles sont regroupées en 16 familles distinctes notées A à P. Dans la nomenclature des Serpin, la protéine est désignée SERPINXy, où X signifie la famille d'appartenance, et y le numéro de la Serpin dans la famille. Ainsi, l'antithrombine est la SERPINC1.[43]

Les Serpin ont une structure tridimensionnelle homologue. En effet, leur conformation tridimensionnelle est très conservée avec environ 80% de la séquence arrangée en 3 feuillets β (A, B, C) et 8 ou 9 hélices α. La structure tridimensionnelle de la forme native de SERPINA1 ou α1-antitrypsine constitue l'archétype des Serpin (Fig 4). En revanche, les Serpin ont une homologie de séquence très modérée (≈ 20-40%).[44] Ce sont des protéines généralement monocaténaires de 40 à 100kDa, qui peuvent être glycosylées ou non.

La majorité des Serpin inhibent les sérine-protéases de la famille de la « chymotrypsine ou de la trypsine » (α1-antitrypsine, antithrombine…). Cependant plusieurs d'entre elles inhibent d'autres catégories de protéase comme la PI9 (Protease inhibitor-9) et la CrmA (Cytokine response modifier A) qui inhibent les caspases (cystéine-protéase).[44] En outre, d'autres Serpin n'ont pas du tout d'activité inhibitrice comme l'ovalbumine ou le PEDF (Pigment epithelium derived factor). Ces protéines ont été classées parmi les Serpin du fait de l'homologie structurale qu'elles partagent avec les Serpin à fonction inhibitrice.

Les Serpin à propriété inhibitrice possèdent diverses activités biologiques, notamment dans la coagulation sanguine (antithrombine), dans la fibrinolyse (1er inhibiteur de l'activateur de plasminogène ou PAI-1), dans la voie du complément (C1- inhibitor) ou encore dans l'inflammation (α1-antitrypsine).[44]

En outre, les Serpin à fonction inhibitrice présentent également une boucle non structurée exposée à la surface de la molécule qui constitue le centre réactif (RCL pour reactive center loop). Cette boucle réactive, située dans la partie C-terminale de la protéine, est composée d'une vingtaine d'acides aminés (Fig 4), et se comporte en pseudo-substrat de la

sérine-protéase cible, ainsi les Serpin agissent comme substrat suicide des protéases. En effet, la Serpin interagit avec la protéase comme un substrat ordinaire. Le clivage du site actif au niveau de la boucle réactive provoque un réarrangement conformationnel de la Serpin, avec insertion de la portion N-terminale de la boucle réactive dans le feuillet β A. A l'issue de ce réarrangement, la protéase se trouve piégée dans un complexe covalent inactif.

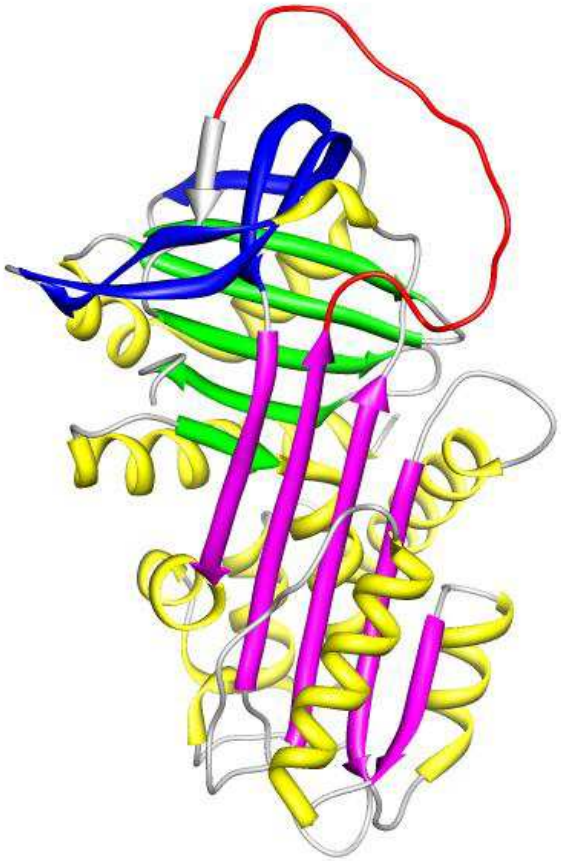


Figure 4 : L'archétype de structure tridimensionnelle des SERPIN : **« α-1 antitrypsine »** (Code pdb 3NE4). Feuillet β A coloré en magenta ; feuillet β B coloré en vert ; feuillet β C coloré en bleu. 9 hélices α (A à I) colorés en jaune. Boucle réactive (RCL) colorée en rouge. Image réalisée sur UCSF Chimera.

2- Les propriétés structurales de l'antithrombine

a- Structure primaire et modifications post-traductionnelles de l'antithrombine

L'AT a une homologie de séquence primaire très modérée par rapport aux autres Serpin, au minimum 23% avec l'angiotensinogène et au plus 42% avec la Serpin SCCA1 (Squamous Cell Carcinoma Antigen 1).[44]

C'est une glycoprotéine monocaténaire composée de 432 acides aminés à l'état mature dont la structure tridimensionnelle est stabilisée par 3 ponts disulfures (Cys8-Cys128 ; Cys21-Cys95 ; Cys247-Cys430). C'est une protéine globulaire existant sous deux glycoformes : l'α-AT de 58kDa, la forme plasmatique majoritaire et la β-AT de 56kDa qui possède une chaîne glycane de moins, et représente moins de 10% de l'AT circulante chez l'homme.[45] La partie protéique de l'AT représente environ 85-87,5% de sa masse moléculaire (~ 49kDa). Quatre sites consensus de N-glycosylation sont présents sur la protéine et les Asn96 ; 135 ; 155 ; 192 portent chacun une chaîne glycane identique de ~ 2,25kDa, pour l'α-AT. Ces chaînes sont bi-antennées et terminées par de l'acide sialique. Elles sont donc composées essentiellement de manopyranose, galactopyranose, glucopyranose et de l'acide sialique (Fig 5).[46] En 1995, Picard V. et al., ont démontré par mutagenèse dirigée que la N-glycosylation de l'AT est efficace s'il y a une thréonine en 2nde position en aval du site Asparagine, alors que la présence d'une Sérine à cette position s'accompagne d'une glycosylation partielle. C'est ce qui caractérise la β-glycoforme (β-AT), partiellement glycosylée sur l'N135.[47]

Récemment, une étude de la glycosylation de l'AT dérivée d'un pool de plasma humain par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a permis d'émettre l'hypothèse d'une micro-hétérogénéité au niveau de la terminaison des chaînes glycanes, mais ces isoformes dont la structure glycanique diffère de celle décrite par Franzen et al., restent en proportion négligeable.[48] En tout cas, des études d'isoéléctro-focalisation montrent que le point isoélectrique (PI) varie de 4,7 à 5,2 selon les isoformes.[49]

En dehors de la glycosylation, l'existence d'une éventuelle phosphorylation sur la Sérine 36 a été suggérée après capture des phosphopeptides, issus d'une digestion enzymatique des protéines du sérum humain, sur une colonne de dioxyde de titanium couplée à la spectrométrie de masse en tandem.[50]

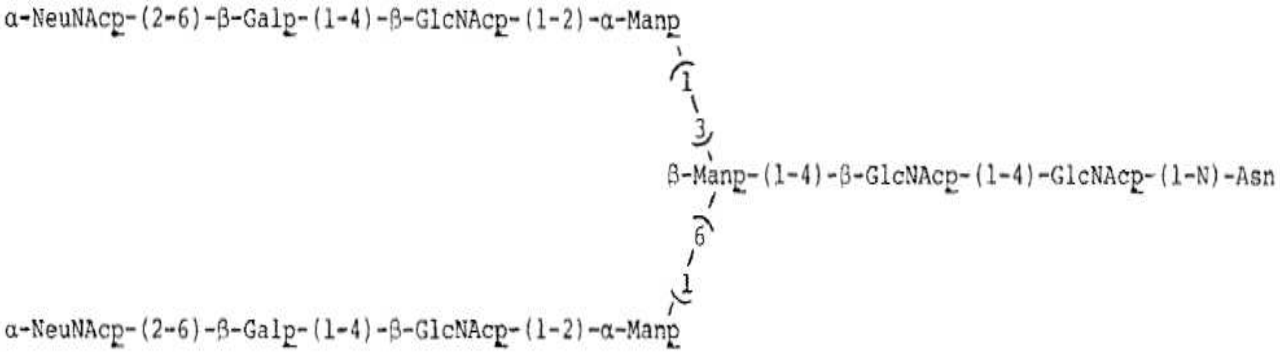


Figure 5: Structure de la chaîne glycane de l'AT plasmatique selon Franzen et al., *JBC* 1980[46]
Légende : NeuNac : acide N-acétylneuraminique ou acide sialique ; Gal*p* : galactopyranose ; GlcNAc*p* : 2-acétomido-2-deoxyglucopyranose ; Man*p :* manopyranose.

b- Les différentes conformations de l'antithrombine

Comme toutes les Serpin à fonction inhibitrice, l'AT peut se présenter sous différentes conformations tridimensionnelles. Les plus connues sont la forme native, la forme latente, et la forme « polymérisée ».

b-1- La forme native

Depuis la résolution de la 1ère structure cristallographique de l'AT native par Carrell R. et al., en 1994,[51] plusieurs structures des différentes conformations de l'AT humaine ont été publiées, et sont accessibles dans la base de données des protéines (RCSB PDB Protein Data Bank). Toutes les structures cristallographiques de l'AT montrent l'arrangement tridimensionnel caractéristique des Serpin avec 3 feuillets β centraux (A, B, C) et 9 hélices α (A à I) (Fig 6). Ainsi, les feuillets β A, B et C de l'AT sont organisés respectivement en 5, 6 et 4 brins (tableau 1).

Enfin, une séquence de 24 résidus (377-400), organisée en une boucle très mobile exposée au solvant, est responsable de sa fonction inhibitrice. Cette boucle comprend l'arginine en position 393, qui constitue le site actif de l'AT (Fig 7).[52] Selon la nomenclature de Schechter et Berger, l'arginine 393 est nommée P1. Les acides aminés situés en N-terminale du résidu P1 sont numérotés P2 jusqu'à P17 alors que les résidus en C-terminal de ce même P1 sont désignés P1' jusqu'à P7' (Fig 7).

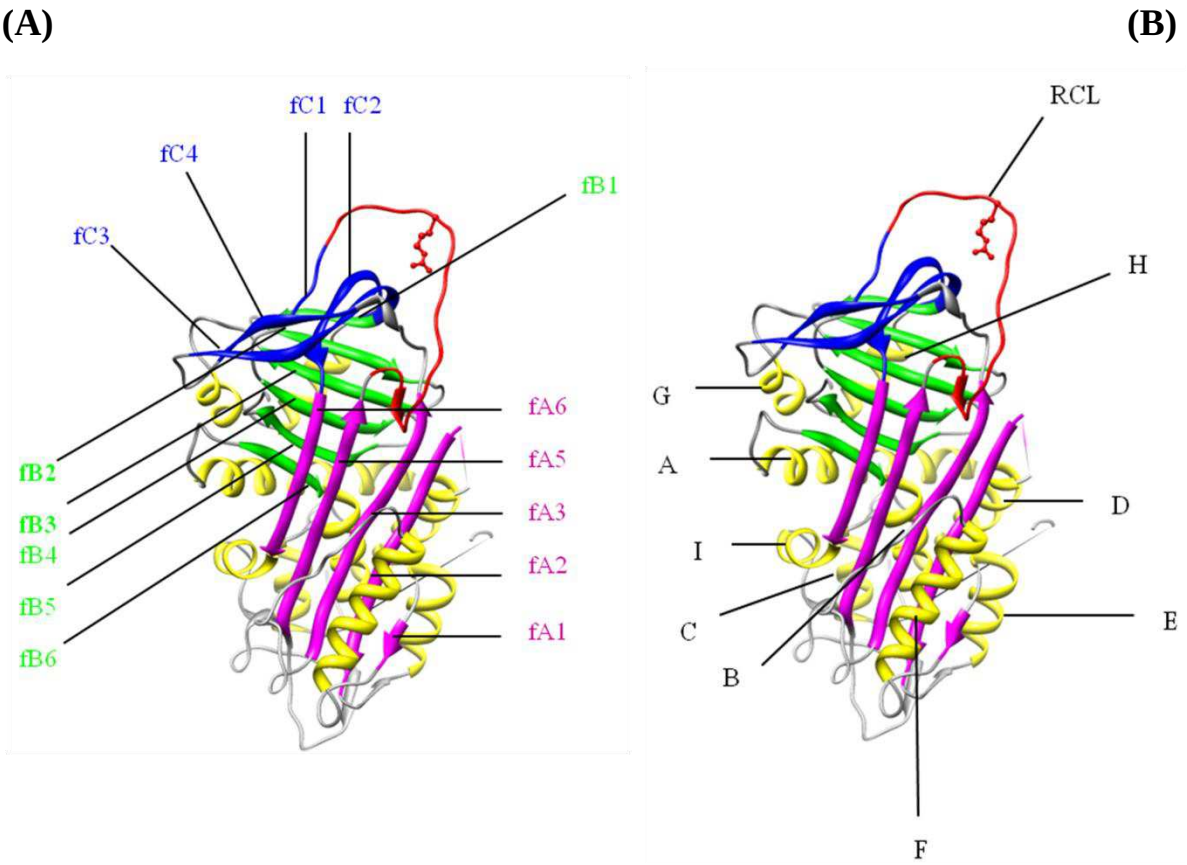
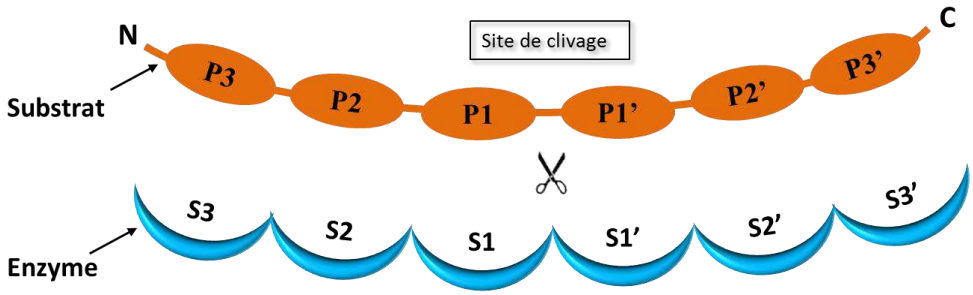


Figure 6: Structure tridimensionnelle de la forme native de l'AT (Code pdb 1ANT). (A) Les feuillets β. En magenta, feuillet β A. En vert, feuillet β B. En bleu, feuillet β C. (B) Les hélices α en jaune. La boucle réactive (RCL) en rouge. Image réalisée sur UCSF Chimera

(A)



(B)

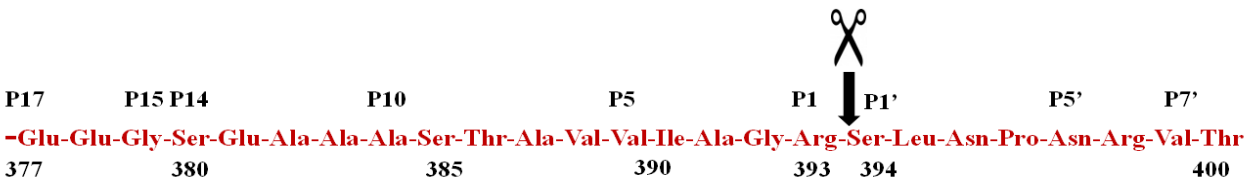


Figure 7 : La nomenclature (A) et la représentation (B) de Schechter et Berger des résidus de la boucle réactive de l'AT (Reactive center loop ou RCL)

Tableau 1 : Les structures secondaires de l'AT selon la base de données UnitprotKB (Référence AT P01008)

Acides aminés	Nombre d'acides aminés	Structure secondaire	Brin
46-68	23	Hélice	A
75-79	5	Feuillet B	fB6
80-91	12	Hélice	B
96-105	10	Hélice	C
115-131	17	Hélice	D
136-149	14	Feuillet A	fA2
156-166	11	Hélice	E
170-172	3	Feuillet A	fA1
179-193	15	Hélice	F
213-224	11	Feuillet A	fA3
234-240	7	Feuillet C	fC4
246-257	12	Feuillet C	fC3
258-263	6	Feuillet B	fB1
267-274	8	Feuillet B	fB2
279-285	7	Feuillet B	fB3
292-298	7	Hélice	G
301-310	10	Hélice	H
314-321	8	Feuillet C	fC2
323-330	8	Feuillet A	fA6
331-337	7	Hélice	I
365-375	11	Feuillet A	fA5
400-403	4	Feuillet C	fC1
408-414	7	Feuillet B	fB4
419-426	8	Feuillet B	fB5

b-2 La forme latente

L'AT peut adopter une autre conformation dite « latente » qui correspond à l'insertion de la RCL non clivée dans le feuillet β A. *In vitro*, cette forme peut être obtenue, par exemple en chauffant l'AT 10 heures à 60°C en présence de citrate.[53] Ainsi, certains auteurs ont montré que de la forme latente d'AT pouvait être présente dans les préparations d'AT thérapeutique, suite à la pasteurisation.[54,55]

Biochimiquement, elle adopte une structure « hyper stable », résistante aux agents dénaturants. La migration électrophorétique sur un gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes et le profil d'élution sur colonne échangeuse d'anion montrent que l'AT latente est plus anionique que la forme native.[53,56] Cette forme lie l'héparine avec une faible affinité, et est dépourvue d'activité anticoagulante. En revanche, la forme latente possède une activité antiangiogénique et antiprolifération.[57]

Selon l'équipe de Robin Carrell, la transition de la forme native en forme latente se fait en 2 étapes.[53] Lors de la première étape, cinétiquement rapide, la boucle réactive s'insère partiellement dans le feuillet β A. S'en suit une rotation de 24° du brin 4 du feuillet β C (Région 234-240), vers l'extérieur du corps de la molécule qui facilite la délocalisation du brin 1 du feuillet β C pour permettre l'intégration totale de la boucle réactive dans le feuillet β A. Dans la deuxième étape plus lente, la boucle réactive s'insère totalement dans le feuillet β A et des réseaux ioniques avec les structures adjacentes (brins 5 et 3 du feuillet β A, hélice α F) permettent de stabiliser la conformation (Fig 8).

Il est décrit que certains variants naturels d'AT (AT Rouen VI, AT Wibble, AT Wobble) sont très thermolabiles, et se convertissent facilement en forme latente *in vitro*.[56,58] Alors, il a été suggéré que cette instabilité pourrait participer au risque thrombotique observé chez les porteurs de ces mutations, induisant un déficit qualitatif en AT.

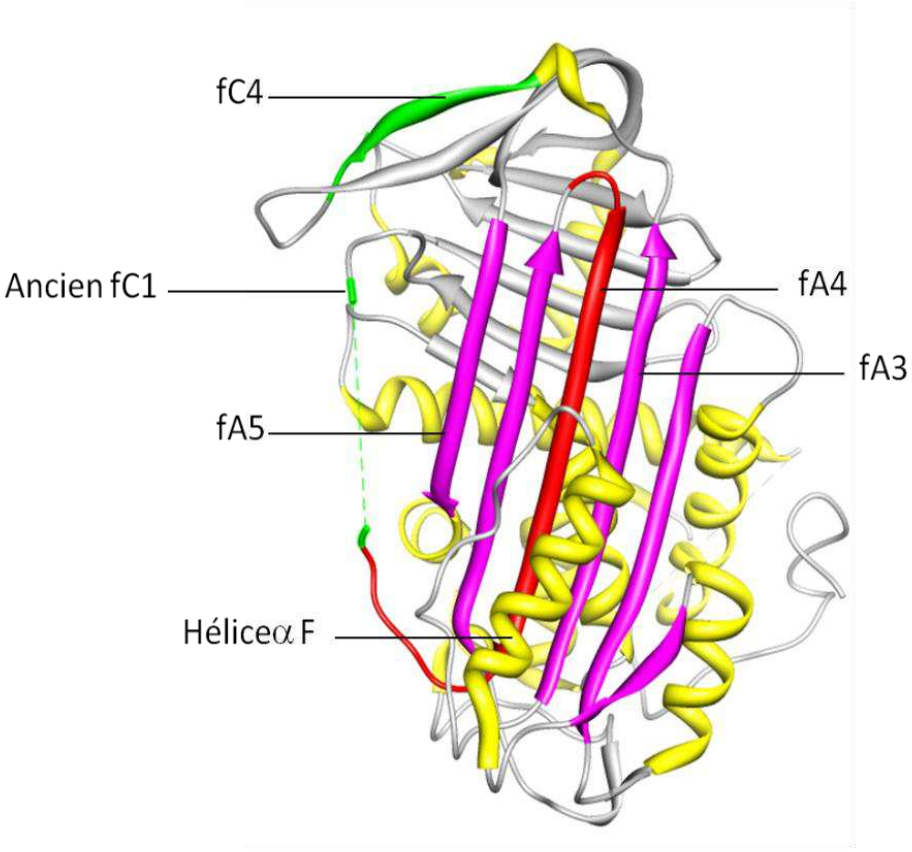


Figure 8: Structure tridimensionnelle de la forme latente de l'AT (Code pdb 2BEH). En jaune : les hélices α. En magenta : le feuillet β A. En rouge : insertion de la boucle réactive dans le feuillet β A (brin 4A). En vert : région 236-240 du feuillet β C (brin 4C) et l'ancien brin 1C. Image réalisée sur UCSF Chimera.

b-3 Les formes polymérisées

La polymérisation des Serpin donne des protéines inactives, « hyper stables », souvent non sécrétées et retenues dans les cellules. *In vivo*, ce processus de polymérisation des Serpin est impliqué dans des pathologies appelées « serpinopathies ». Dans le cas de l'AT, la transformation de l'AT en ces formes thermodynamiquement stables est associée à un déficit en AT et donc à des manifestations thrombotiques.[58,59]

Pour comprendre le mécanisme de polymérisation *in vivo* des Serpin comme l'AT, beaucoup d'études, notamment par cristallographie, ont été réalisées et ont permis de proposer plusieurs modèles moléculaires de polymérisation. Il est cependant très difficile d'avoir une idée de la relevance physiologique des mécanismes proposés.[60]

Les formes polymérisées sont associées à une conformation inactive, donc une incapacité de l'AT à inhiber ses enzymes cibles, ce qui laisse imaginer que la boucle réactive est inaccessible, donc éventuellement insérée dans le feuillet β A, comme dans les formes clivée et latente. Les 2 modèles les plus décrits sont la « polymérisation boucle-feuillet β A », et la « polymérisation des formes polymérogènes ».[60]

b-3.1 Modèle « boucle-feuillet β A »

C'est le 1er modèle moléculaire de polymérisation décrit pour une Serpin. Cette polymérisation résulte de l'insertion partielle de la RCL d'une molécule d'AT dans le feuillet β A d'une autre AT, qui à son tour, va s'insérer dans une 3ème molécule (Fig 9). Ce mécanisme a été conforté par l'étude de la polymérisation d'un variant de l'α1-antitrypsine, le Z-mutant (mutation D342K), caractérisé par une instabilité des brins 3 A et 5 A. *In vitro*, le mécanisme donne un oligomère de Serpin de 4 à 10 monomères sur gel de polyacrylamide. La vitesse de polymérisation dépend de la température et de la concentration en Serpin.[61]

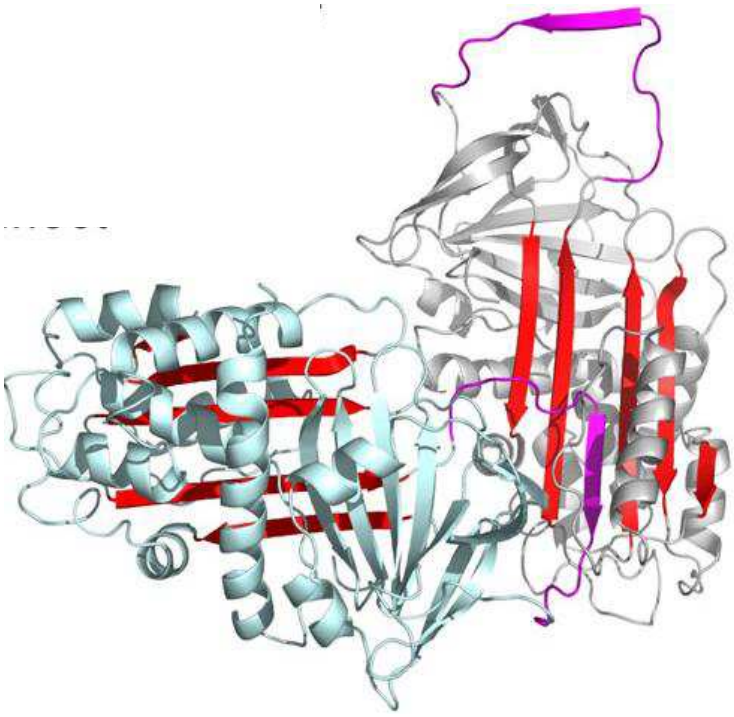


Figure 9: Modèle de polymérisation des SERPIN : Boucle-feuillet β A. En magenta : boucle réactive. En rouge : feuillet β A. Image tirée de la publication de Whisstock et al., 2010.[61]

b-3.2 Modèle des formes polymérogènes

L'équipe de James Huntington a proposé, à partir de la structure cristallographique d'un dimère auto-terminé d'AT (Variant P80S), un autre modèle moléculaire.[62] L'AT adopte une conformation particulière : « la forme polymérogène », caractérisée par un détachement du brin 5 du feuillet β A et de la boucle réactive, qui s'insèrent dans le feuillet β A d'une autre molécule polymérogènes, qui à son tour va s'insérer dans une autre molécule polymérogène (Fig 10).

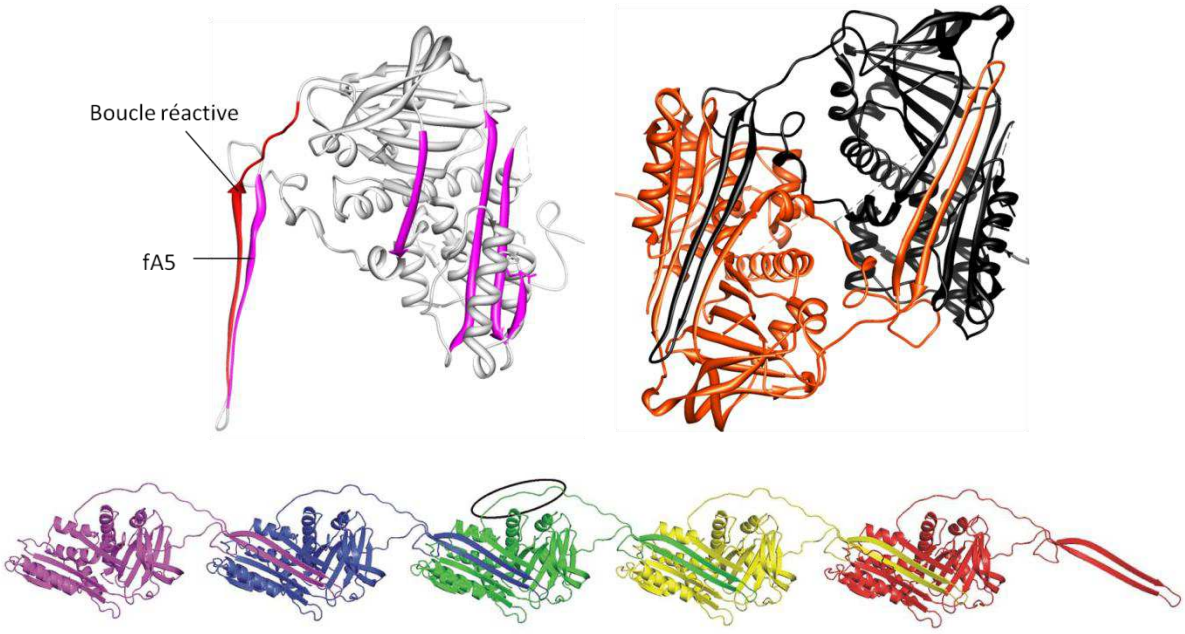


Figure 10 : Modèle de polymérisation des formes polymérogènes des SERPIN. En haut, à gauche : « AT polymérogène ». En haut, à droite : dimère auto-terminé de « formes polymérogènes » d'AT. (Code pdb 2ZNH) Images réalisées sur UCSF Chimera. En bas : Modèle moléculaire proposé par l'équipe de James Huntington, *Nature*, 2008.[62]

3- Mécanisme d'inhibition des sérine-protéases par l'antithrombine

a- La base moléculaire de l'inhibition des sérine-protéases de la coagulation par l'antithrombine

L'AT forme un complexe équimolaire stable avec les sérine-protéases cibles, et elle agit comme « substrat suicide » des sérine-protéases.[63] Les sérine-protéases sont parmi les enzymes les plus étudiées et les mieux connues. La connaissance de leur mécanisme d'action a beaucoup contribué à la compréhension de la formation du complexe « AT-protéase ».

Lors d'une réaction classique « sérine-protéase/substrat », l'interaction entre le site catalytique de l'enzyme et le site de clivage du substrat (Arginine ou lysine en P1) aboutit à la formation d'un « complexe Michaelien » non covalent. Ce dernier évolue en complexe « acyle-enzyme » par formation d'une liaison ester entre la sérine195 du centre actif de l'enzyme et le résidu P1 du substrat, entrainant le clivage de la liaison P1-P1', et la libération du fragment en aval du site de clivage P1. Puis, l'hydrolyse de ce complexe (dé-acylation) entraine la régénération de l'enzyme et la libération du fragment N-terminal du substrat clivé (Fig 11).[64]

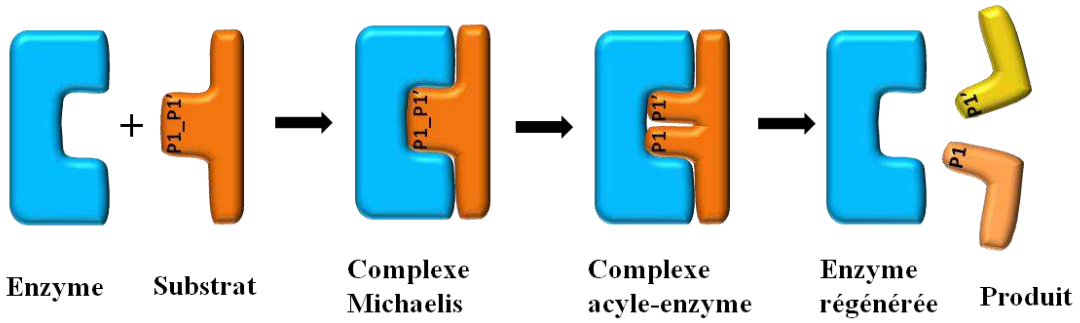


Figure 11 : Schéma simplifié du mécanisme catalytique des sérine-protéases[64]

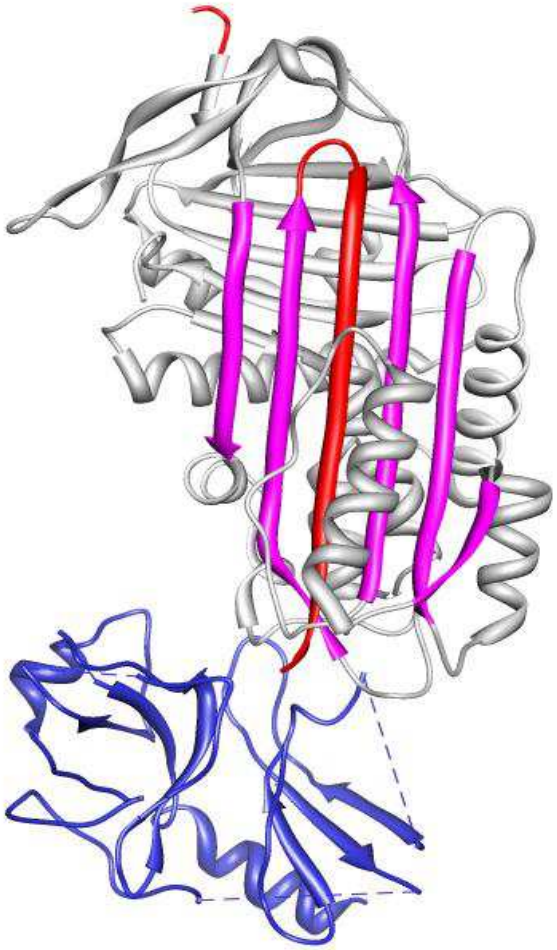


Figure 12 : Modèle d'inhibition d'une sérine-protéase par une SERPIN : structure tridimensionnelle du complexe covalent trypsine/α1-antitrypsine (Code pdb 1EZX). En magenta : feuillet β A. En rouge : boucle réactive clivée avec insertion d'une partie dans feuillet β A (brin 4A). En bleu : trypsine inactivée. Image réalisée sur UCSF Chimera.

Dans le cas de l'AT, qui agit comme un pseudo-substrat de la protéase, il se forme un complexe « acyle-enzyme » par une liaison ester entre l'R393 de l'AT (P1) et la S195 du centre actif de l'enzyme, mais le clivage entre P1 et P1' déclenche un changement conformationnel de l'AT, qui aboutit à l'insertion du fragment de la boucle réactive attaché à l'enzyme dans le feuillet β A pour former le brin supplémentaire 4A. Ce changement conformationnel a pour conséquence un déplacement de 70 Å de l'enzyme, alors expulsée vers le bas de l'AT (Fig 12), ce qui empêche la dé-acylation classique, et donc la dissociation du complexe enzyme/AT. La structure de la protéase est déformée par la force de traction exercée par le réarrangement conformationnel de l'AT et le frottement entre le corps de la protéase et celui de l'AT thermodynamiquement stable. Ainsi, l'enzyme se trouve piégée dans un complexe covalent inactif.[65]

Cependant, l'interaction AT-protéase peut conduire à 2 voies réactionnelles, la voie de l'inhibition et la voie du clivage. Le clivage et la cinétique d'insertion du brin 4A de l'AT, sont les étapes limitantes de la réaction d'inhibition. Ainsi, si la catalyse est plus rapide que l'insertion, l'AT est clivée comme un substrat classique et la protéase n'est pas inhibée. Par contre, si l'insertion est plus rapide que la catalyse, l'enzyme est inactivée dans un complexe covalent avec l'AT. Le comportement de l'AT comme substrat ou inhibiteur dépend de nombreux facteurs qui conditionnent la réaction : température, force ionique, pH, ou présence de cofacteur.[66] *In vitro,* dans des conditions proches de la physiologie (pH proche de la neutralité ; force ionique : 0,15M ; température 20-37°C), c'est la voie de l'inhibition qui est largement majoritaire.[66]

b- L'importance des résidus de la boucle réactive dans l'activité inhibitrice de l'antithrombine

La boucle réactive de l'AT est constituée de 24 acides aminés allant de l'acide glutamique 377 (P17) jusqu'à la leucine 400 (P7'). Elle est le site d'interaction de l'AT avec ses enzymes cibles dont la liaison se fait en aval de l'R393 (résidu P1) (Fig 7).

En tant que pseudo-substrat, l'AT est également soumise, comme un substrat classique, aux contraintes stériques dictées par la structure du centre actif de l'enzyme. Alors, le résidu P1 qui est la cible de l'attaque enzymatique, et les acides aminés immédiatement voisins doivent accommoder la géométrie de la poche catalytique de l'enzyme.

L'R393 de l'AT est déterminante pour la spécificité de l'enzyme à inhiber. D'ailleurs, l'importance de ce résidu est démontrée par l'incapacité de nombreux variants naturels de l'AT substitués en P1, à interagir avec les sérine-protéases de la coagulation. Alors, l'AT Glasgow (R393H), l'AT Pescara (R393P), et l'AT London (Del-R393) sont dénuées d'activité anticoagulante.[67,68]

Les autres résidus de la boucle réactive contribuent également à l'activité inhibitrice de l'AT. Ainsi, la substitution de la sérine 394 (P1') dans des variants naturels comme AT de Denver (S394L) ou dans les variants recombinants (S394G ; S394A ; S394T ; S394V ; S394C ; S394M ; et S394P) entraîne une baisse plus ou moins importante de l'activité anticoagulante.[69,70]

Il a été suggéré que le rôle principal du résidu P1' est de stabiliser le complexe Michaelien, afin de favoriser son évolution vers le complexe « acyle-enzyme ». Pour pouvoir s'accommoder géométriquement au sous-site S1' de l'enzyme, le résidu P1' doit avoir une taille optimale : un acide aminé ayant une courte chaîne latérale, préférentiellement polaire. Ainsi, la substitution de ce résidu par une glycine, une thréonine, ou une alanine modifie à peine la capacité inhibitrice de l'AT, alors qu'une substitution par une proline, ou méthionine induit une perte dramatique de son activité anticoagulante.[69]

Il faut noter aussi que la sélectivité de la poche S1'de l'enzyme est très importante pour la réaction. Dans le cas de la thrombine, elle est partiellement occupée par une lysine, ce qui donne moins d'espace pour le résidu P1', et cela contribue à la grande sélectivité de l'enzyme.[70] En revanche, il est décrit que le sous-site S1' du FXa est assez large et spacieux. Des études de sélectivité du sillon catalytique de ces 2 enzymes ont d'ailleurs confirmé la grande sélectivité de la thrombine, comparée au FXa, ce qui explique pourquoi les variants S394I inhibe le FXa, et non la thrombine.[71,72]

La glycine en P2 semblerait jouer un rôle dans la présentation du site actif dans une conformation optimale afin de faciliter l'interaction avec la sérine 195 de la poche catalytique de l'enzyme. Cela a été démontré par l'AT Stockholm (G392D), un variant naturel qui est dépourvu d'activité anticoagulante et les variants recombinants G392P, G392V, G392Q, G392D, G392K.[73] Une étude récente a démontré que le résidu en P2 interagit spécifiquement avec un résidu apolaire étroit du sous-site S2 de l'enzyme cible, ce qui lui permet de déterminer la spécificité de l'enzyme cible.[74]

Des études de mutagenèse dirigée ont montré que l'alanine en P3 et l'asparagine en P3' jouent un rôle dans la spécificité de l'enzyme à inhiber. Ainsi, leur substitution par des acides aminés acides (D ou E), permet de dissocier l'activité anti-Xa et l'activité anti-IIa de l'AT.[71]

Beaucoup d'études ont été faites sur la région du P13-P15 de l'AT (G379-S380-E381). Des structures cristallographiques de l'AT à l'état natif montrent que ces résidus constituent la « région charnière », partiellement insérée dans le feuillet β A grâce à des liaisons ioniques avec le domaine d'interaction à l'héparine.[75,76] Ces liaisons sont rompues après activation allostérique de l'AT par l'héparine, ce qui favorise l'interaction de l'AT et les enzymes cibles.[77].

En fait, la boucle réactive de l'AT est une séquence peu structurée. Alors, en plus de la région charnière qui maintient la boucle réactive dans sa conformation native, une liaison ionique entre l'R393 et l'acide glutamique 255 permet de garder la boucle réactive partiellement insérée dans le feuillet β A, une conformation moins inhibitrice comparée à la forme activée par l'héparine.[78]

4- La potentialisation de l'activité anticoagulante de l'antithrombine par les dérivés héparíniques

a- Le domaine d'interaction à l'héparine

L'AT possède un cluster d'acides aminés particulièrement basique appelé « Heparin binding site » (HBS) et impliqué dans l'interaction à l'héparine. La liaison à l'héparine entraine une activation allostérique de l'AT, permettant de potentialiser son activité anticoagulante.

Cette interaction de l'AT avec l'héparine a fait l'objet de très nombreuses d'études qui ont permis d'identifier précisément l'HBS. Dès 1973, Rosenberg et Damus ont déjà décrit qu'une région riche en lysines et arginines, est impliquée dans la potentialisation de l'activité de l'AT par l'héparine. Pour ce faire, ils ont modifié l'AT par de l'acide sulfonique 2,4,6-trinitrobenzène (TNBS) ou par des α-dicarbonyles (Cyclohexanedione, 2,3-butanedione).[79] Au milieu des années 80, l'utilisation de ces familles de réactif chimique a permis de mettre

en évidence les premiers résidus impliqués dans l'interaction AT/héparine(K114 ; K125).[80] Les caractérisations moléculaire et biologique des variants naturels d'AT d'affinité à l'héparine réduite, ont également contribué à la compréhension du rôle des résidus concernés dans l'interaction à l'héparine.[81] Enfin, des approches de mutagenèse dirigée réalisée ont confirmé l'importance des résidus basiques (K11, R13, R24, R47, K125, R129, R145) proches de l'extrémité N terminale de l'AT dans son interaction avec l'héparine.[82]

La découverte du motif pentasaccharide de l'héparine, responsable de son activité anticoagulante, et dont chaque sucre est symbolisé par une lettre (DEFGH), a contribué à situer l'HBS et à la compréhension de l'activation allostérique de l'AT par l'héparine.[83]

La résolution de la structure cristallographique du complexe intermédiaire « AT-pentasaccharide » a permis de situer avec précision les résidus de l'AT qui interagissent avec l'oligosaccharide. (Fig 13).[84] Toutes ces données ont permis de situer le domaine d'interaction à l'héparine essentiellement au niveau de l'extrémité N-terminale, de l'hélice α A et de l'hélice α D de l'AT (Fig 13).

b- Le mécanisme d'activation allostérique de l'antithrombine par l'héparine

L'effet potentialisateur de l'héparine sur l'activité inhibitrice de l'AT dépend de 2 mécanismes, l'activation allostérique de l'antithrombine par le motif pentasaccharide de l'héparine, et l'effet matriciel des longues chaînes d'héparine. L'activation allostérique de l'AT est très importante pour l'inhibition des FXa et FIXa. En revanche, elle est moins importante pour l'inhibition de la thrombine qui dépend plus de l'effet matriciel des longues chaînes d'héparine (Tableau 2).

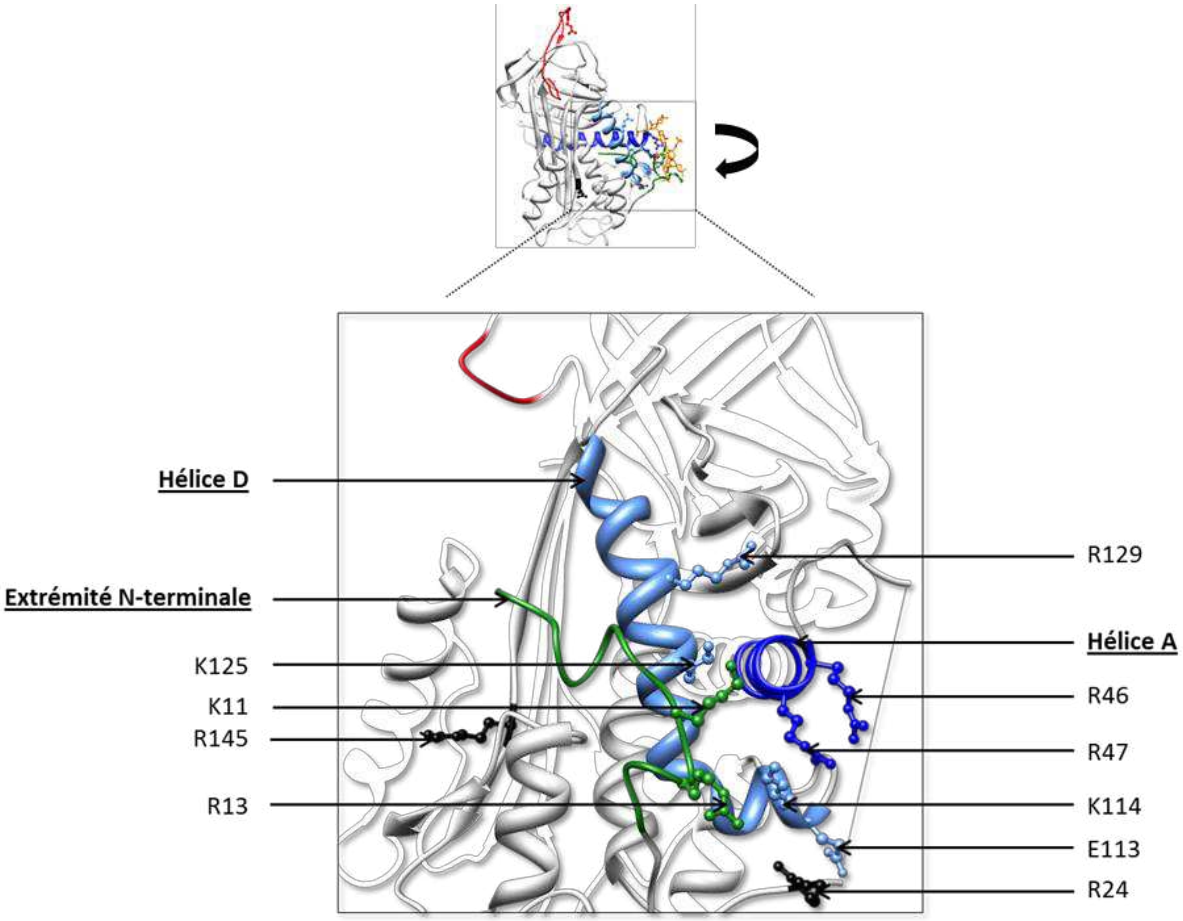


Figure 13: Représentation des résidus du domaine d'interaction à l'héparine de l'AT (HBS). Structure cristallographique du complexe intermédiaire : « AT-pentasaccharide » (Code pdb 1AZX). En ribbon : AT et en stick jaune orangé: pentasaccharide.

Tableau 2: Constante cinétique d'inhibition ou kon ($M^{-1}s^{-1}$) des protéases de la coagulation par l'α-AT, à 20-25°C, pH 7,4, force ionique : 0,15M[17]

Enzyme	Sans activateur	En présence de pentasaccharide	Facteur d'accélération
Thrombine	$7,5x10^3$	$2,0x10^4$	≈ 2,6
Facteur Xa	$2,5x10^3$	$7,5x10^5$	≈ 300
Facteur IXa	$1,3x10^2$	$3,0x10^4$	≈ 230

b-1 L'activation allostérique de l'AT par le pentasaccharide

L'interaction entre l'AT et l'héparine induit une augmentation de la fluorescence intrinsèque de l'AT (~ 40%), un changement de sa propriété spectrale en UV, et de la propriété de dichroïsme circulaire, ce qui supporte l'existence d'une activation allostérique de l'AT par l'héparine.[85] Actuellement, il est admis que le pentasaccharide induit le même changement conformationnel que l'héparine au niveau de l'AT, et qui se déroule en 3 étapes successives.[77,86]

Dans un premier temps, le pentasaccharide interagit à l'AT avec une K_D1 de l'ordre du µM. Cette interaction réversible induit un premier changement conformationnel, permettant d'augmenter l'affinité entre les 2 molécules (K_D2 ≈ 300nM). Puis un 2è changement conformationnel implique cette fois l'extension de l'hélice D, suivi de l'expulsion de la région N-terminale de la boucle réactive (P13-P15), normalement enfouie dans le feuillet β A à l'état natif (Région charnière). Cette dernière étape va augmenter considérablement l'affinité entre les 2 molécules (K_D3 ≈ 3nM).[77]

Par ailleurs, dans quelle mesure ces changements conformationnels de l'AT augmentent l'inhibition des protéases, notamment les FXa et FIXa, est une question encore discutée. Ainsi, il a été proposé par exemple que l'expulsion de la boucle réactive consécutive au changement conformationnel, permet d'augmenter l'accessibilité du site actif de l'inhibiteur.[87] Cependant, cette hypothèse n'explique pas l'inefficacité du pentasaccharide dans l'inhibition de la thrombine par l'AT. En effet, l'activation allostérique de l'AT a peu d'effet sur l'inhibition de la thrombine. D'autres études ont suggéré aussi que l'activation allostérique de l'AT crée des exosites supplémentaires sur l'AT, qui seraient spécifiques des

FXa et FIXa, et impliqueraient au moins la Y253.[88] Des études de la région charnière de la boucle réactive de l'AT par mutagenèse dirigée ont montré que l'exposition des exosites est associée à l'activation allostérique et à l'expulsion de la région charnière de l'AT.[77] Cependant, selon l'équipe de Steeven Olson, les exosites du brin 3 du feuillet β C seraient déjà présents dans la structure de l'AT native, mais co-localisés avec des surfaces répulsives qui diminuent l'interaction avec l'enzyme.[86]

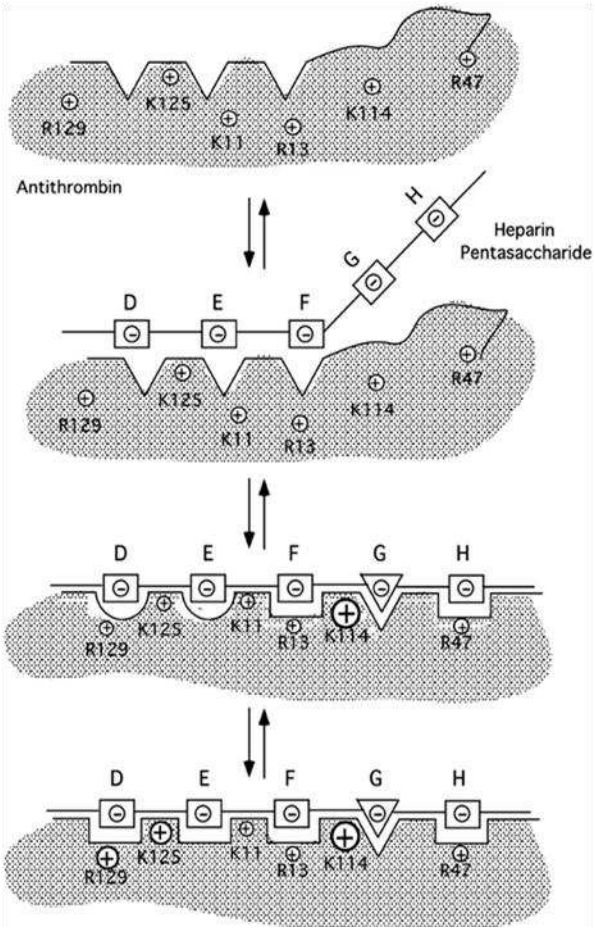


Figure 14: Modèle d'activation allostérique de l'AT par l'héparine. Image tirée de la publication de Olson ST et al., Biochimie, 2010[86]

Dans le modèle proposé par l'équipe de Steeven Olson en 2010 (Fig 14),[86] le pentasaccharide, par l'intermédiaire du trisaccharide DEF (Cf chapitre 3), se lie aux résidus K11 et K125 de l'hélice α D, et de l'extrémité N-terminale de l'AT. Cette interaction de faible affinité (de l'ordre du μM) entraine un premier changement conformationnel avec rotation de de l'hélice α D, la formation de l'hélice α P, et la compression de l'hélice α A. Cela permet de repositionner en surface la K114, qui va interagir avec le groupement 3-O-sulfate du saccharide F. Puis, cela permet également de renforcer la liaison entre les résidus K11, K125,

et R129 avec le trisaccharide DEF. . La formation de l'hélice α P, et la compression de l'hélice α A vont rapprocher les R13, R46, et R47, permettant l'interaction avec le reste du pentasaccharide GH.

Enfin, dans une dernière étape, on observe le 2ème changement conformationnel issu de l'extension de l'extrémité C-terminale de l'hélice α D. En conséquence, le noyau aromatique de l'Y131 est exposé, et des interactions hydrophobes renforcent la stabilité de la conformation de l'HBS, entraînant la fermeture du feuillet β A et l'expulsion de la région charnière de la boucle réactive.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, cette activation allostérique est aussi associée à l'apparition d'un exosite, qui semblerait jouer un rôle important dans l'inhibition des FXa et FIXa.

En effet, il est connu depuis le début des années 2000 que l'héparine potentialise l'inhibition des FXa et FIXa par l'AT, en impliquant une deuxième surface de contact aux protéases, en plus de la boucle réactive de l'AT : « exosite ».[89] En travaillant sur des AT-α_1Proteinase inhibitor chimères, et par mutagenèse dirigée, l'équipe de Steeven Olson a montré que cet exosite concerne la séquence 246-258 sur le brin 3 du feuillet β C de l'AT.[90] Puis, il a été également montré que les résidus les plus importants dans l'interaction avec les protéases sont l'Y253 et l'E255.[88] Cette même équipe a réussi à montrer, par des études de cinétique rapide, que l'exosite permet de stabiliser le « complexe Michaelien » réversible, formé entre l'AT et les protéases, non seulement en augmentant la constante cinétique d'association (kon), mais aussi en diminuant la constante cinétique de dissociation des deux molécules.[91] Ainsi, cet exosite contribuerait à une augmentation de l'activité anti-Xa et anti-IXa de l'AT, en présence d'héparine, approximativement d'un facteur 30 à 50.[92,93]

Récemment, la résolution des structures cristallographiques des complexes Michaeliens entre l'AT activée par l'héparine et le FXa,[94] ou le FIXa[95] ont conforté l'importance de cet exosite, situé dans le feuillet β C de l'AT, qui interagit avec l'R150 de la boucle d'autolyse des FXa et FIXa.

b-2 L'effet matriciel de l'héparine dans la potentialisation de l'activité inhibitrice de l'AT

En présence d'héparine, l'inhibition des protéases, et surtout de la thrombine, est potentialisée.[96] Dans le cas particulier de l'inhibition de la thrombine, l'activation allostérique de l'AT par le pentasaccharide n'est pas suffisante pour une inhibition optimale. En effet, seule une chaîne héparinique composée d'au moins de 18 unités saccharidiques permet d'accélérer l'inhibition de la thrombine par l'AT dans un mécanisme de type matriciel. Cette inhibition est plus de 1000 fois plus importante que celle induite par le pentasaccharide.[17] Les 18 unités saccharidiques sont suffisamment longues pour lier en même temps la thrombine et l'AT, permettant de rapprocher l'enzyme et l'inhibiteur avec une orientation favorable de la boucle réactive de l'AT dans le sillon catalytique de la thrombine. En 2004, la résolution de la structure cristallographique du complexe ternaire « AT-Thrombine-Héparine » a permis de confirmer ce mécanisme dit « matriciel ».[97] La liaison entre l'AT et l'héparine implique le pentasaccharide et l'HBS de l'AT. La thrombine, elle, se lie à une autre partie de l'héparine par l'intermédiaire de son « exosite II » riche en résidus basiques (R93 ; R101 ; R233 ; K236 ; K240).[97]

L'héparine pourrait aussi servir de matrice à la liaison entre l'AT et les autres protéases de la coagulation, notamment le FXa, ce qui augmente d'une manière modérée la constante cinétique d'inhibition du FXa par l'AT (≈ 60 fois), comparé à l'inhibition en présence du pentasaccharide.[98]

Du fait de sa liaison à l'héparine, l'AT est donc au cœur du mécanisme d'action des dérivés héparíniques, classe d'anticoagulant majeur utilisés dans le traitement et la prévention de la maladie thromboembolique, comme nous le verrons dans la suite de ce travail.

5- Déficits héréditaires en antithrombine et risques thrombotiques

L'étude des déficits héréditaires en AT a largement contribué à la connaissance de la relation structure fonction de cette protéine. Les déficits en AT sont transmis de façon autosomale dominante et associés à des thromboses récurrentes.[99]

En se basant sur les dosages antigénique et fonctionnels de l'AT dans le plasma, David Lane a classé les déficits héréditaires en AT en 2 groupes (déficits de type I et type II) et répertorié les mutations du gène de l'AT.[81] Des mises à jour de cette banque de données de

mutation du gène de l'AT chez l'homme sont accessibles dans la base de données.[100] Les déficits de type I (quantitatifs) sont définis par une diminution parallèle de l'antigène et de l'activité de l'AT, généralement à des taux de l'ordre de 50%.

Les déficits de type II sont définis par la présence en circulation d'une AT d'activité anticoagulante réduite. De nombreuses mutations ont été identifiées comme étant la cause de ces déficits. Il s'agit le plus souvent d'une mutation d'un seul nucléotide entrainant la substitution d'un acide aminé. Trois régions de la molécule sont particulièrement impliquées dans les déficits de type II : la région du site actif (Type IIa : Position 382-384, et positions proches du résidu 394), le site de liaison à l'héparine (Type IIb, Positions 41 ; 47 ; 99 ; 129), et la partie C-terminale (Type IIc : Positions 402 ; 404-407 ; 429). Les variants de la partie C-terminale sont appelés « pléiotropiques » puisqu'ils sont associés non seulement à un taux de sécrétion diminué, mais aussi à une activité abaissée, et une affinité à l'héparine diminuée. La majorité des mutations de type II sont de nature hétérozygote, à l'exception de quelques mutations au niveau du domaine d'interaction à l'héparine (Ex : AT Budapest III ; AT Kumamoto)[101,102], et au niveau de la boucle réactive (Ex : AT Cambridge II),[103] et sont associées à des troubles thrombotiques veineux et artériels sévères.[81]

Chapitre 3 : Les anticoagulants hépariniques

A- Physiopathologie de la maladie thromboembolique

Le thrombus est le produit final de la coagulation sanguine et l'agrégation plaquettaire, et on parle de thrombose lorsque le thrombus obture un vaisseau sanguin.

Le thrombus est composé de cellules, de fibrine, et de sang. Il peut se former dans les veines, les artères, le cœur, et la microcirculation. La proportion relative de cellules et de fibrine dépend des facteurs hémodynamiques (flux sanguin, force de cisaillement).[104] Ainsi, le thrombus artériel se forme dans des conditions de flux sanguin élevé. Il est principalement composé d'agrégats plaquettaires et de mince feuillet de fibrine. En revanche, le thrombus veineux se forme préférentiellement dans les zones de stase et essentiellement composé de globules rouges, d'une importante quantité de fibrine et relativement peu de plaquettes.

Quand un thrombus artériel obstrue une artère, une stase de la circulation sanguine se produit. Avec le temps, ce thrombus, change de structure progressivement.[105] Notamment, les leucocytes, attirés par chimiotactisme par des substances libérées par les plaquettes activées et les fragments protéolytiques des protéines plasmatiques, s'incorporent dans le thrombus. Généralement, le thrombus artériel se forme dans les régions où le flux sanguin est perturbé ou au niveau des sites de rupture d'une plaque d'athérosclérose, exposant le « sous-endothélium » thrombogène aux plaquettes et aux protéines de la coagulation. En cas de thrombus non occlusif, il peut s'incorporer dans la paroi du vaisseau et accélérer la croissance des plaques d'athérosclérose.[106]

L'activation simultanée de la coagulation sanguine et des plaquettes est importante dans la thrombogenèse artérielle. Ces deux mécanismes sont étroitement liés *in vivo* puisque la thrombine, enzyme clé de la coagulation est un puissant activateur des plaquettes. Une fois activées, ces dernières vont stimuler à leur tour le processus de la coagulation.[104]

Par conséquent, le traitement de la thrombose artérielle combine souvent l'utilisation des antiagrégants plaquettaires et des anticoagulants.[104]

En ce qui concerne le thrombus veineux, il se forme habituellement dans les membres inférieurs. Trois facteurs principaux (triade de Virchow) favorisent la survenue d'une thrombose veineuse :[107]

- le ralentissement du flux sanguin (stase),

- la modification de l'hémostase (hypercoagulabilité, thrombophilie),
- et les lésions de la paroi vasculaire.

L'importance de ces trois facteurs varie d'un patient à un autre. Ainsi, une lésion manifeste de la paroi veineuse ne constitue ni une condition nécessaire ni une condition suffisante pour générer une thrombose.[107] De même, une stase veineuse seule reste un stimulus insuffisant de la thrombose veineuse. La stase veineuse peut favoriser l'adhésion leucocytaire, l'hypoxie du tissu endothélial et l'accumulation des facteurs procoagulants.[108] Un déséquilibre du système de la coagulation va aussi favoriser la survenue d'épisodes thrombotiques. Ce déséquilibre peut être héréditaire, ou plus souvent, observé dans différentes situations physiopathologiques comme les cancers, la chirurgie, les traumatismes, ou la grossesse.

En conséquence, les anticoagulants sont utilisés pour la prévention et le traitement des maladies thromboemboliques veineuses.[104]

En outre, un thrombus intracardiaque peut également se former sur des valves cardiaques inflammées ou endommagées ou sur l'endocarde adjacent à une région infarcie ou sur des valves artificielles.[104] Là encore, l'activation de la coagulation sanguine semble jouer un rôle important dans la pathogenèse de thrombus intracardiaque.[104]

Les anticoagulants sont donc aussi utilisés dans la prévention et le traitement des thrombus intracardiaques, et chez les patients ayant des prothèses valvulaires cardiaques.

B- Epidémiologie de la maladie thromboembolique

En fonction de l'artère concernée, les thromboses artérielles vont principalement se manifester par des infarctus du myocarde et des accidents vasculaires cérébraux (AVC). Aux Etats-Unis, entre 2005 et 2008, les AVC ont touché environ 7 millions d'adultes âgés de plus de 20 ans et sont responsables du décès d'une personne sur 18 en 2008.[109]

La maladie thromboembolique veineuse (MTEV) comprend, elle, les thromboses veineuses profondes (TVP) et les embolies pulmonaires (EP). Dans les pays occidentaux, la maladie thromboembolique veineuse touche en moyenne 1 personne sur 926 par an et elle serait responsable d'une mortalité estimée entre 0,5 et 6,5 %.[110] Ainsi, la TVP et l'EP seraient

responsables au niveau national de taux de mortalité respectif de 1,9 pour 1 000 000 décès et de 7,2 pour 100 000 décès.[111]

C- Les anticoagulants dans le traitement des maladies thrombotiques

Par définition, les anticoagulants sont les médicaments qui permettent de corriger ou modifier un état procoagulant chez l'homme. Les 2 classes d'anticoagulant les plus largement utilisées sont les dérivés héparíniques et les antagonistes de la vitamine K (AVK).[112] Nous nous focaliserons sur les anticoagulants héparíniques regroupant l'héparine standard ou non fractionnée (HNF) ; les héparines de bas poids moléculaire (HBPM), et le fondaparinux sodique.

Les anticoagulants héparíniques occupent une place importante dans la prophylaxie et le traitement des troubles thrombotiques. L'« American College of Chest Physicians », en 2008, a émis des recommandations cliniques pour la prise en charge des troubles thrombotiques. Ces recommandations, basées en majorité sur les résultats des essais cliniques, préconisent notamment l'utilisation de dérivés héparíniques dans différentes situations chirurgicales et médicales.[113] Pour les patients atteints de TVP ou d'EP confirmées, l'administration initiale d'HBPM en sous cutanée, suivie d'administration d'HNF en intraveineuse ou en sous cutanée est recommandée. D'autres alternatives dont l'utilisation d'HNF ou de fondaparinux en sous cutanée sont aussi proposées. Un relais par des AVK doit rapidement instauré, sauf chez certains patients, comme des patients cancéreux chez qui le traitement par AVK ne peut être instauré tant que le cancer reste actif. Par ailleurs, les dérivés héparíniques sont les seuls à être utilisables au cours de la grossesse.

En outre, dans la chirurgie cardiaque, l'HNF est l'anticoagulant le plus utilisé en Circulation extracorporelle (CEC) parce qu'elle a un effet rapide, elle peut être neutralisée par le sulfate de protamine, et son activité est mesurable à l'aide de tests de coagulation comme le temps de coagulation activée (ACT). En revanche, les HBPM et le fondaparinux ne sont pas, pour le moment, utilisés en CEC cardiaque puisqu'ils ne peuvent pas être antagonisés d'une manière efficace. Dans le cas d'épuration extra-rénale, et de circuit de perfusion, l'HNF et les HBPM peuvent être utilisés, uniquement pour les patients à faible risque hémorragique.[113]

D- Les anticoagulants héparíniques

Les anticoagulants héparíniques ont une activité anticoagulante commune. Ils activent l'inhibiteur physiologique de la coagulation : « l'antithrombine ». Dans l'ensemble de notre travail, nous avons volontairement considéré le fondaparinux sodique comme un dérivé héparinique sur la base de son mécanisme d'action, même si, du fait de son mode de fabrication complètement différent des HNF et HBPM, il est considéré comme le chef de file d'une nouvelle classe, celle des pentasaccharides anticoagulants.

1- L'héparine standard ou non fractionnée (HNF)

a- Structure et propriétés physico-chimiques

L'héparine a été découverte en 1916 par Mc Lean qui a pu mettre en évidence l'effet anticoagulant de ce mucopolysaccharide. Dès les années 30, l'Héparine a été utilisée dans le traitement de l'embolie pulmonaire par voie intraveineuse et, les années 70, par la voie sous cutanée.[114]

L'héparine est un glycosaminoglycane (GAG), et un polymère osidique linéaire. Elle est constituée d'une répétition d'une unité diholoside, dont le protomère est formé d'un acide hexuronique avec une glucosamine liés par une liaison osidique. Dans l'héparine, l'acide uronique est souvent l'acide L-iduronique (IdoA), remplacé quelquefois par l'acide D-glucuronique (GluA). Cet acide iduronique est lié par une liaison α-1,4 avec une glucosamine (Glc), qui, elle, est liée à l'acide iduronique suivant (Fig 15). Un certain nombre de fonction alcool ou amine peuvent être sulfatées: fonctions amine et alcool primaire de la glucosamine, fonction alcool secondaire du carbone n°3 de la glucosamine, et quelquefois fonction alcool secondaire du carbone n°2 de l'acide iduronique.[115]

Au cours de la synthèse, l'acide glucuronique (GluA) peut être épimérisé en C5 pour donner de l'acide iduronique (IdoA). De son côté, la glucosamine peut être soit N-acétylée (GlcNAc), soit N-sulfatée (GlcNS). Une 6-O-sulfatation (GlcNAc(6S) ou GlcNS(6S)) et même une 3-O-sulfatation sur les GlcNS (GlcNS(3S) ou GlcNS(3,6S)) peuvent également

avoir lieu. Les deux formes épimérisées (acide iduronique et glucosamine) peuvent également subir ensuite une 2-O-sulfatation : IdoA(2S) et GlcA(2S) (Fig 15).[115]

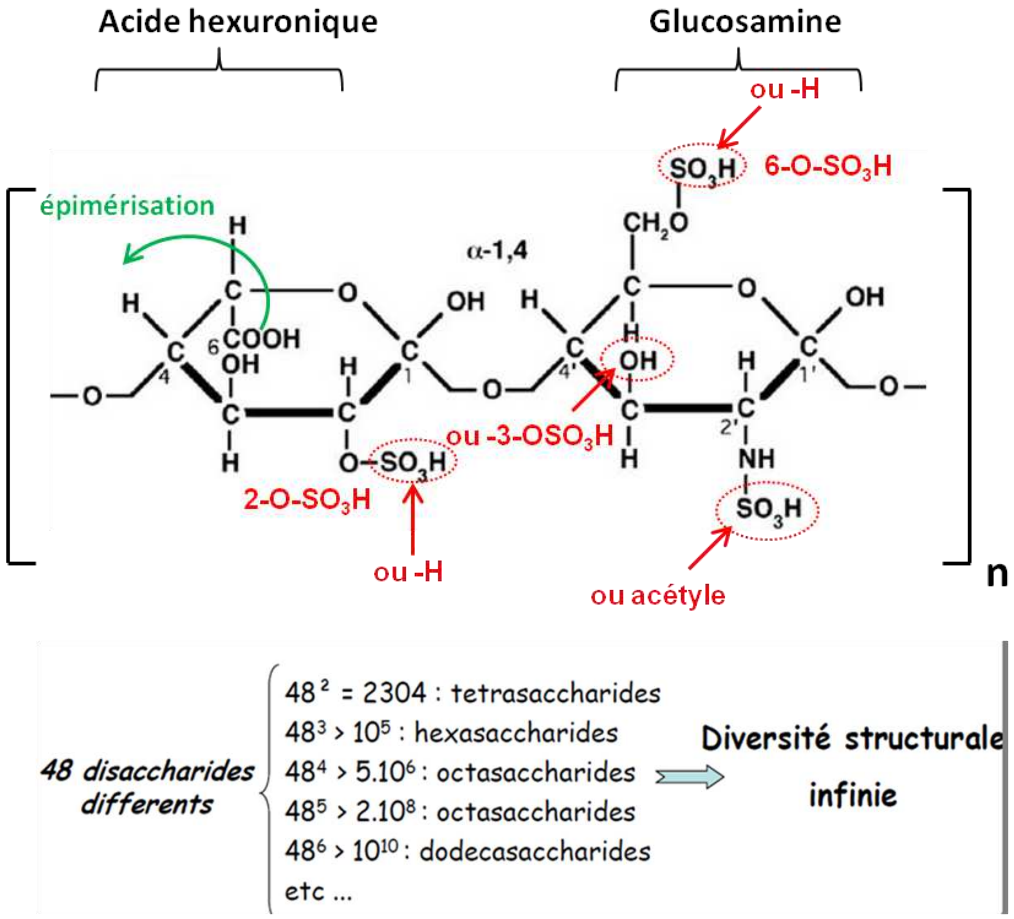


Figure 15 : Diversité et organisation structurale de l'héparine. Unité disaccharidique composée d'un acide hexuronique (4GlcAa) et d'une glucosamine (GlcNScα1). Ce motif disaccharidique 4GlcAa1-4GlcNScα1 est ainsi répété n fois et peut subir jusqu'à 5 modifications telles qu'une désulfatation de la GlcNS suivie d'une acétylation; des sulfatations ou une désulfatation peuvent également avoir lieu en position 3 et 6 sur la GlcNS ainsi qu'en position 2 sur la glucosamine. Le carbone C5 de l'acide héxuronique peut subir une épimérisation qui convertit l'acide glucuronique (GluA) en acide iduronique (IdoA).

Toutes ces modifications génèrent, le long d'une chaîne oligosaccharidique de ce type, une hétérogénéité et donc une variabilité de structure quasiment infinie. En effet, 48 disaccharides différents sont théoriquement possibles, et c'est leur combinaison qui va engendrer cette diversité structurale (Fig 15).

La nature des motifs saccharidiques constitutifs de l'héparine a été caractérisée par plusieurs équipes,[116,117] et il est possible de distinguer trois types de séquence dans une chaîne d'héparine (Fig 16) :

- une région majoritaire dans la chaîne d'héparine, constituée de la répétition de l'unité disaccharidique régulière trisulfatée : « acide iduronique 2-O-sulfate-(α1-4)-glucosamine N-sulfate-6-O-sulfate » ;

- puis, une séquence variable, minoritaire, et intercalaire, dont l'unité disaccharidique, qui est disulfatée, est composée d'une glucosamine 2-N-sulfatée, pouvant être aussi 6-O-sulfatée, associée à un acide uronique qui lui, peut-être 2-O-sulfaté ou non, selon la variabilité de la séquence. Il est à noter que la base moléculaire de la variabilité de cette séquence est encore mal connue ;

- enfin, une séquence pentasaccharidique, représentant le tiers de la séquence d'héparine. Cette région particulière est très sulfatée, caractérisée par une unité centrale de glucosamine 3-O-sulfatée, très importante dans l'activité anticoagulante de l'héparine. Elle est composée de trois unités de glucosamine, pouvant avoir une N-sulfatation en position 2, et une O-sulfatation en position 6. Ces glucosamines sont séparées d'un acide iduronique, qui lui est 2-O-sulfaté, et d'un acide glucorinique. Il est admis actuellement que cette séquence se lie à l'AT, et est responsable de l'activation allostérique de l'inhibiteur physiologique. Les osides composant le pentasaccharide sont nommés, de gauche à droite, DEFGH (Fig 16).

L'héparine est synthétisée par les mastocytes situés dans les tissus conjonctifs. Elle est synthétisée sous forme de protéoglycane (PM : 750 000 à 100 0000 kDa) dont le corps protéique est la « serglycine ». Plusieurs chaînes d'héparine (PM : 60 000 à 100 000 kDa) sont liées à ce corps protéique. Une fois cette synthèse terminée, les chaînes sont clivées aléatoirement par les héparinases pour donner des fragments plus petits (PM : 5000 à 25000 kDa, PM moyen : 15KDa ≈ 45 unités osidiques) qui vont être stockés dans des granules de sécrétion du cytoplasme des mastocytes. Ainsi, les héparines utilisées en thérapeutique sont extraites des mastocytes localisés dans les muqueuses intestinales de porc ou pulmonaires de bovin. Les caractéristiques structurales des héparines dépendent de leur origine tissulaire et de leur procédé d'extraction.[118]

Le complexe pentasaccharide-AT inhibe très efficacement le facteur Xa, et cette activité dépend du groupement sulfate en position 3 du motif F car en le substituant, toute affinité pour l'AT et donc toute activité anti-Xa est abolie.[119] Les quatre groupements sulfates essentiels pour l'interaction avec l'AT sont entourés sur la figure 16.

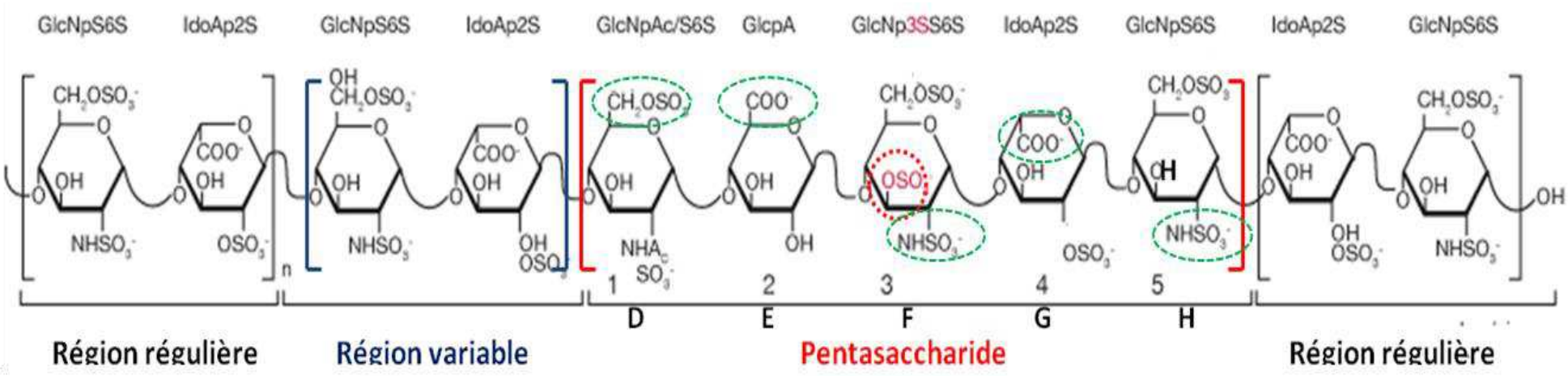


Figure 16: Modèle moléculaire d'une chaîne d'héparine d'après Choay, 1986.[116] Les groupements entourés sont importants dans l'interaction avec l'AT.

Les sels d'héparine habituellement utilisés en thérapeutique (sels de sodium, calcium, magnésium) sont très solubles dans l'eau ou dans les solutés de chlorure de sodium ou de glucose. Par contre, ils sont insolubles dans la plupart des solvants organiques. Ceci permet de les extraire facilement de solutions aqueuses par simple addition d'un solvant miscible à l'eau comme l'alcool éthylique. L'excellente solubilité des sels d'héparine permet de préparer des solutions très concentrées (25 000 UI/ml à 40 000 UI/ml).

Du fait de l'hétérogénéité de leur poids moléculaire, le titrage de l'activité anticoagulante s'impose pour les héparines utilisées en thérapeutique. Elle s'exprime en Unité Internationale et la Pharmacopée Européenne exige en 2012 qu'elle soit supérieure à 180 UI/mg d'héparine cristallisée.

b- Les héparines standard commercialisées

En France, la majorité des HNF sont commercialisées essentiellement par les industries pharmaceutiques *Sanofi-Aventis* et *Pan-pharma*. D'autres, en proportion très faible, sont fabriquées par l'industrie pharmaceutique danoise *Leo Pharmaceutical* et le laboratoire pharmaceutique français *Soludia*. En outre, les dites héparines non fractionnées sont disponibles soit sous forme calcique, soit sous forme sodique (Tableau 3).

Tableau 3: Liste des Héparines non fractionnées commercialisées en France (VIDAL 2012)

DCI	Nom commercial	Activité spécifique	Voie d'administration	Fournisseur
Héparine calcique	Calciparine®	25000UI/mL	Injection sous-cutanée	Sanofi-Aventis
Héparine calcique	Héparine calcique®	25000UI/mL	Injection sous-cutanée	Pan-Pharma
Héparine sodique	Héparine Choay®	5000UI/mL	Injection intraveineuse	Sanofi-Aventis
Héparine sodique	Héparine Sodique® Pan pharma	5000UI/mL	Injection intraveineuse	Pan-Pharma
Héparine sodique	Héparine LEO®	100 ou 5000UI/mL	Injection intraveineuse	Leo Pharmaceutical
Héparine sodique	Héparine Soludia®	666,6UI/mL	Injection intraveineuse	Soludia

c- L'activité anticoagulante et antithrombotique de l'héparine standard

Les héparines possèdent des activités biologiques multiples : anti-thrombotique due essentiellement par son activité anticoagulante, antiangiogénique, anti-inflammatoire modérée, et même une action dans le métabolisme lipoprotéique.[120] Toutes ces activités sont dues à l'interaction de l'héparine avec différentes protéines dont l'AT, le 2è cofacteur de l'héparine (HCII) ainsi qu'à l'interaction avec les cellules endothéliales vasculaires. Mais la seule propriété pour laquelle les héparines sont utilisées en thérapeutique à l'heure actuelle est son activité anticoagulante.

c-1 Interaction avec l'AT

Comme nous l'avons rappelé dans le chapitre précédent, l'AT est un inhibiteur des sérine-protéases de la coagulation. Physiologiquement, l'inhibition se produit lentement. Brièvement, l'héparine, en se fixant sur le domaine d'interaction à l'héparine riche en résidus basiques de l'AT par l'intermédiaire du pentasaccharide, modifie la conformation de l'AT et accélère son action anti-sérine-protéase en réalisant un complexe équimolaire dans des conditions stœchiométriques (Détails Cf chapitre 2). Une fois constitué, ce complexe expose idéalement le site actif de l'AT et peut alors se lier aux différentes protéases de la coagulation (facteurs IIa, Xa, IXa, XIa, XIIa) et inhiber leur action. Cependant, il est à noter que les facteurs IIa et Xa sont les deux facteurs les plus sensibles à l'inhibition par le complexe héparine/AT. De plus, la thrombine est plus sensible à cette inhibition que le facteur Xa.

Enfin, l'effet pharmacodynamique des héparines dépend de la longueur des chaînes oligosaccharidiques. En effet, pour inhiber la thrombine, il est nécessaire qu'un complexe ternaire se forme entre l'héparine, la thrombine et l'AT. En revanche, l'héparine par le biais du motif pentasaccharide active l'AT, et suffit pour inhiber le facteur Xa. Ainsi, les fragments de poids moléculaire (PM) inférieur à 5400 Da, soit 18 unités saccharidiques, perdent leur capacité à se fixer simultanément à la thrombine et à l'AT, et de ce fait sont essentiellement anti-Xa. Quant à ceux de PM supérieur ou égal à 5400 Da, ils seront à la fois anti-Xa et anti-IIa. L'héparine standard comprend des fragments de poids moléculaire variant de 5000 à 25000 Da et possède donc des actions sur les deux facteurs : Xa et IIa.[121]

La molécule d'héparine n'est pas catabolisée au cours de la réaction. Dès que la thrombine est fixée, l'affinité de l'héparine pour l'AT est de 100 à 1000 fois diminuée. Les molécules d'héparine sont alors libérées et peuvent agir à nouveau sur une nouvelle molécule d'AT.

c-2 Interaction avec le « 2è cofacteur de l'héparine (HCII) »

De façon moins importante, l'héparine peut catalyser l'inactivation de la thrombine par une autre Serpin« le 2è cofacteur de l'héparine (HCII)», un inhibiteur sélectif de la thrombine, circulant dans le plasma à une concentration de ≈ 1µM.[122] En effet, il est connu qu'*in vitro*, l'héparine lie moins bien l'HCII, comparé à l'AT dans les mêmes conditions physico-chimiques (K_D ≈ 10-30µM contre ≈ 10nM), elle est capable de potentialiser d'un facteur ≈ 2000 à 2500 l'inhibition de la thrombine par l'HCII.[122] La base moléculaire de cette réaction d'inhibition est encore mal connue, mais étant donné que l'affinité de l'héparine à l'HCII est similaire à celle entre l'AT et la séquence d'héparine de basse affinité pour l'AT (K_D ≈ 19µM),[123] il a été suggéré que cette propriété de potentialisation implique la séquence de l'héparine dénuée de pentasaccharide.[122]. En tout cas, cette action anticoagulante nécessite des concentrations plus importantes d'héparine que celles requises pour l'activité de l'AT.[124]

d- Pharmacocinétique de l'HNF

L'héparine franchit mal la barrière digestive et ne peut donc pas être administrée par voie orale.[125] Actuellement, seule la voie parentérale est utilisée en thérapeutique. Les HNF peuvent être administrées par voie IV ou sous-cutanée, et la biodisponibilité en sous-cutané est, comme attendu, inférieure à la voie IV (15-25%).[126]

L'héparine se lie à un grand nombre de protéines plasmatiques, contribuant à la variabilité de sa réponse anticoagulante chez les patients atteints de troubles thromboemboliques. Elle se lie également aux cellules endothéliales, et aux macrophages,[121] ce qui rend sa pharmacocinétique encore plus complexe. En outre, en se liant au facteur von Willebrand, elle inhibe les fonctions plaquettaires von-Willebrand-dépendantes.[121]

Le métabolisme de l'héparine se fait par 2 mécanismes :

- un mécanisme rapide et saturable, qui dépend de sa liaison aux récepteurs cellulaires (endothélium, macrophage), aboutissant à sa dépolymérisation.[127]

- puis, un mécanisme non saturable, relativement lent, essentiellement rénal.[121]

La $t_{1/2}$ biologique de l'héparine varie de 30mn à 150mn selon la dose, après bolus IV.[121]

e- Limitations et effets secondaires des traitements par l'héparine standard

L'utilisation de l'héparine standard en thérapeutique présente des limitations de différents types.

e-1 Limitations pharmacocinétiques

L'héparine, chargée négativement, se lie de façon non spécifique à diverses protéines plasmatiques (glycoprotéines riches en histidine[128], vitronectine[129], lipoprotéines[130], et fibronectine[131]), mais aussi à des protéines secrétées par les plaquettes (facteur 4 plaquettaire ou facteur Von Willebrand)[121] ou sur les cellules endothéliales. Ces liaisons indépendantes du motif pentasaccharide entraînent une biodisponibilité réduite à faible dose (au maximum 25% en sous-cutané), une courte demi-vie plasmatique (au maximum 3 heures après injection IV) et une variabilité de la réponse anticoagulante marquée chez les patients atteints de maladies thromboemboliques. Ainsi, l'effet anticoagulant n'étant pas prévisible, l'utilisation d'une héparine standard nécessite une surveillance biologique et un ajustement posologique en fonction des résultats biologiques obtenus.

e-2 Limitations biophysiques

Au sein du complexe héparine/AT, la molécule d'héparine ne peut inhiber ni la thrombine liée à la fibrine, ni le FXa engagé dans le complexe prothrombinase.[121] Ainsi, les enzymes associées au thrombus peuvent encore contribuer à la croissance du thrombus même lors d'un traitement à l'héparine. Ces défauts d'inactivation entraînent une efficacité limitée, plus particulièrement dans les cas d'angor, d'angioplastie coronaire à haut risque et de thrombolyse coronaire.

e-3 Effets secondaires

Les deux effets secondaires majeurs du traitement par HNF sont l'hémorragie et la thrombopénie induite à l'héparine (TIH).

* Risques hémorragiques [132] : le risque hémorragique est l'un des effets secondaires les plus important de l'héparinothérapie. Ce risque est influencé par quelques facteurs : la dose d'héparine administrée, l'état clinique du patient, les caractéristiques du patient et enfin, l'utilisation concomitante d'antiagrégants ou d'agents thrombolytiques. Les hémorragies majeures, nécessitent l'utilisation de l'antidote de l'héparine (Sulfate de protamine), des transfusions sanguines, et l'arrêt du traitement. Elles se produisent chez moins de 5% des traités et sont relativement rares lors d'un traitement prophylactique.

* Thrombocytopénie induite par héparine (TIH) : Il s'agit d'une complication immuno-allergique redoutable du traitement par l'HNF. Cette complication se manifeste par une diminution du nombre de plaquettes (Thrombopénie), qui survient généralement entre le 5ème et le 21ème jour de traitement, et peut s'accompagner de manifestations thrombotiques.[133]

A partir d'une étude rétrospective (1984-2004), Martel et al., en 2005 ont décrit que l'administration prophylactique en sous cutanée d'HNF est associé à un risque d'environ 2,6% de développer une TIH.[134] Lorsqu'il s'agit de chirurgie orthopédique, ce risque est d'environ 5%. En revanche, il est réduit à 0,8% dans le cas d'une prophylaxie par l'HNF chez des patients hospitalisés pour des raisons non chirurgicales. Enfin, le taux de mortalité chez ces patients est de 10-20%.[135]

Certaines situations médicales favorisent l'apparition de TIH. En chirurgie cardiaque, au décours d'une circulation extracorporelle, l'administration d'HNF induit fréquemment la production d'anticorps impliqué dans la TIH. En fonction des études, 25% à 70% des patients, produisent de tels anticorps, 5 à 10 jours après l'intervention.[136] Par contre, la TIH survient uniquement chez 1-3% des patients qui sont traités par de l'HNF après l'intervention chirurgicale. En revanche, dans le cas de transplantation cardiaque, l'incidence est de 11%[137]. En tout cas, il semble que l'incidence des TIH soit plus importante en cas d'administration IV, comparée à une administration sous-cutanée.

La TIH est provoquée par des anticorps qui reconnaissent le complexe multimoléculaire facteur 4 plaquettaire (PF4)/héparine, et que certains patients vont développer au cours d'un traitement héparinique. Ces anticorps reconnaissent un néo-épitope exposé lors du changement conformationnel du tétramère de PF4 induit par l'héparine.[138] L'induction du changement de conformation du PF4 dépend de la longueur et du degré de sulfatation des chaînes de glycosaminoglycanes, ce qui explique les différences d'incidence des TIH observées avec les différentes héparines (HNF>HBPM). Les complexes PF4/héparine qui se fixent à la surface des plaquettes, sont reconnus par ces anticorps, conduisant à la formation de complexes IgG/PF4/héparine, ce qui va activer les plaquettes. Il en résulte une agrégation intra-vasculaire des plaquettes, associée à une chute de leur nombre et une activation de la coagulation. Une activation endothéliale est aussi observée et contribue à la survenue des complications thrombotiques observées chez ces patients.

* Autres effets secondaires: Chez certains patients traités avec de l'héparine standard, il peut survenir des réactions cutanées type nodules inflammatoires, des lipodystrophies, ou ecchymoses aux points d'injection.[139] Par ailleurs, on observe dans certains cas une ostéoporose induite par héparine, particulièrement dans les traitements de longue durée (supérieure à 4-5 mois) utilisant de fortes doses d'HNF (≥ 15000 UI/jour).[140] Cependant sa pathogenèse reste encore peu comprise. Il a été suggéré que l'héparine pourrait supprimer la formation des ostéoblastes et augmenter le nombre et l'activité des ostéoclastes, conduisant ainsi à une perte osseuse. Enfin, une élévation modérée des transaminases a été rapportée chez environ 5% des patients traités par HNF.[141]

2- Les Héparines de Bas Poids Moléculaire (HBPM)

Dans les années 80, les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) ont été développées.[142] Comparée aux HNF, elles présentent une activité anti-IIa réduite par rapport à l'activité anti-Xa et des meilleures propriétés pharmacocinétiques.

a- Structure et propriétés physico-chimiques

Les HBPM sont isolées à partir des HNF. En général, plus de 60% des chaînes d'HBPM ont des poids moléculaires inférieurs à 8kDa.[143] En fonction des préparations, la quantité des chaînes supérieures à 5kDa, qui normalement minoritaires, est très variable. Ces

longues chaînes sont indispensables pour l'inhibition de la thrombine, ce qui explique la variabilité et la diminution de l'activité anti-IIa des différentes HBPM.

En principe, les HBPM peuvent être préparées soit par fractionnement d'HNF, soit par sa dépolymérisation partielle. Cependant, aucune des HBPM disponibles actuellement en thérapeutique n'est préparée par fractionnement bien que les premiers travaux sur les HBPM ont utilisé plutôt des HBPM isolées par fractionnement.[144]

Plusieurs méthodes de dépolymérisation partielle sont utilisées pour produire des HBPM.[145] La plus commune est le clivage de la liaison osidique après une glucosamine N-sulfatée, par de l'acide nitreux ou d'un nitrite organique (Dalteparine ; reviparine ; nadroparine). Dans cette dépolymérisation, la glucosamine N-sulfatée, site de clivage, subit également une désamination, laissant un anhydromannose non naturel sur la terminaison non-réductrice des chaînes.

La seconde méthode peut être soit chimique, soit enzymatique. Il s'agit d'un clivage de la liaison osidique avant un acide uronique par réaction de β-élimination, ce qui laisse un acide uronique insaturé non naturel à l'extrémité non-réductrice de la chaîne oligosaccharidique. En général, on procède à un clivage alcalin par hydrolyse des groupes esters de la chaîne héparinique (Enoxaparine). Dans le cas d'une hydrolyse enzymatique, seule la tinzaparine est produite en utilisant des héparinases bactériennes.

La troisième méthode est la dépolymérisation oxydative, qui utilise soit du peroxide d'hydrogène, soit un mélange de peroxide d'hydrogène avec de cuivre (Parnaparine).

Ainsi, la dépolymérisation des longues chaînes d'héparine donne des HBPM différentes structuralement selon la méthode de dépolymérisation utilisée. En plus, il peut y avoir des modifications chimiques plus subtiles sur les séquences des HBPM produites, et qui peuvent affecter leur activité biologique. Tout ceci explique l'hétérogénéité des HBPM.

Les HBPM ont une distribution des PM comprise entre 1kDa et 10kDa et une masse moléculaire moyenne de l'ordre de 5kDa (Fig 17). La teneur en pentasaccharide, qui lie l'AT, sur les chaînes d'HBPM est peu décrite. En plus, en fonction des approches, cette teneur est très variable. Ainsi, en chromatographie d'affinité à l'AT par exemple, il y aurait au plus 13 à 14% de pentasaccharide anticoagulant dans les chaînes d'HBPM.[146]

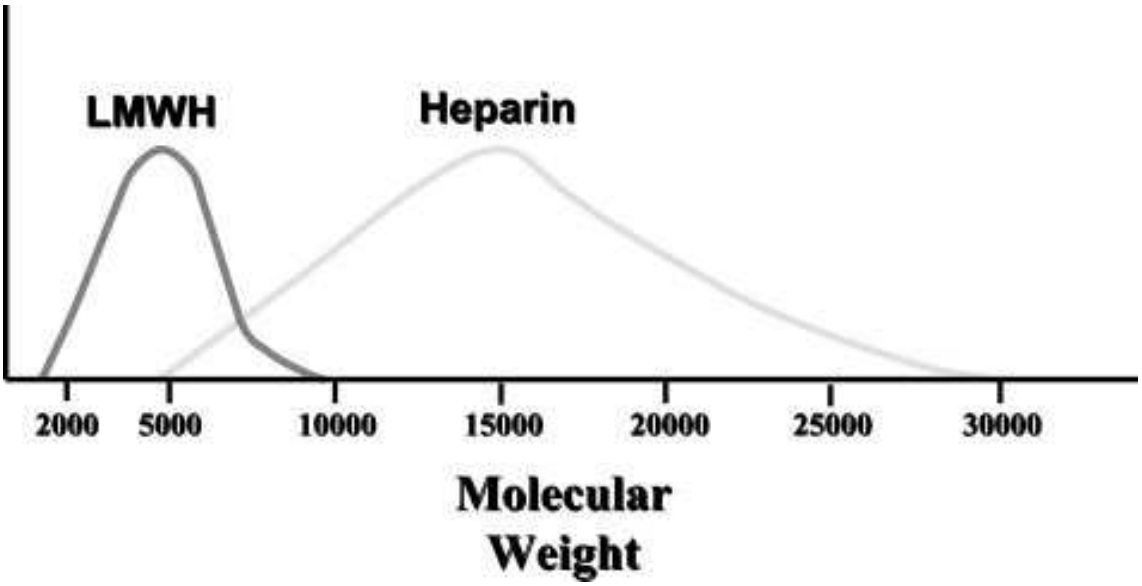


Figure 17: Distribution des poids moléculaires des HNF et HBPM.[121]

En outre, leur forte électronégativité leur donne une bonne solubilité dans de l'eau car on peut solubiliser jusqu'à 500 mg d'HBPM cristallisées dans 1mL d'eau.

b- Activité des HBPM sur la coagulation

Le mécanisme d'action des HBPM est analogue à celui de l'HNF : elles agissent en tant que cofacteur de l'AT. Leur faible masse moléculaire fait que le complexe qu'elles forment avec l'AT est beaucoup plus actif vis-à-vis du FXa que du FIIa car les courtes chaînes ne peuvent pas se lier à la thrombine. En effet, la masse moléculaire des chaînes polysaccharidiques influe sur les propriétés anticoagulantes des HBPM : l'activité anti-Xa est indépendante de la masse moléculaire, contrairement à l'activité inhibitrice de la thrombine qui requiert environ 18 unités monosaccharidiques (5400 Da). Ainsi, les procédés de préparation des HBPM pouvant varier, les molécules obtenues ont des activités biologiques variables et le rapport entre les activités anti-Xa et anti-IIa qui les caractérise est situé, en moyenne, entre 2 et 4 (Tableau 4).[121]

Tableau 4: Caractéristiques physicochimiques des HBPM commercialisées[142]

DCI	Nom commercial	Fournisseur	Méthode de dépolymérisation	PM (pharmacopée)	Rapport anti-Xa/anti-IIa
Enoxaparine sodique	Lovenox®	**Sanofi-Aventis**	Dépolymérisation alcaline du dérivé ester benzylique de l'héparine	3 500 – 5 500 (4 500)	(3,3 – 5,3) 3,9
Dalteparine sodique	Fragmine®	**Pfizer**	Dépolymérisation chimique (acide nitreux)	5 600 – 6 400 (6 000)	(1,9 – 3,2) 2,5
Tinzaparine sodique	Innohep®	**Leo Pharma**	Dépolymérisation enzymatique (Flavobacterium heparinum)	5 500 – 7 500 (6 500)	(1,5 – 2,5) 1,6
Parnaparine sodique	Fluxum®	**Alfa Wassermann,**	Catalyse radicalaire par peroxyde d'hydrogène	4 000 – 6 000 (5 000)	(1,5 – 3,0) 2,3
Nadroparine calcique	Fraxiparine®	**GSK**	Dépolymérisation chimique (acide nitrique) puis fractionnement	3 600 – 5 000 (4 300)	(2,5 – 4,0) 3,3
Reviparine	Clivarine®	**Knoll France**	Dépolymérisation chimique (acide nitreux)	NR	4,2

Légende :

NR = Non renseigné ; **PM =** Poids moléculaire moyen

c- Pharmacocinétique des HBPM

Plusieurs études ont montré que la pharmacocinétique des HBPM est beaucoup plus favorable que celle des HNF.[121] Les HBPM ont une biodisponibilité presque de 100% lorsqu'elle est administrée à des doses faibles, avec un Tmax variant de 3 à 5 heures. La $t_{1/2}$ biologique d'élimination se situe entre 3 à 6 heures après l'injection SC. En revanche, l'élimination essentiellement rénale des HBPM complique leur utilisation chez les patients souffrant d'insuffisance rénale.

d- Limitations et effets secondaires

Le risque hémorragique reste toujours le plus grand souci de l'utilisation des HBPM en thérapeutique même si ce risque est souvent décrit comme étant moins élevé, comparé à l'héparine standard en fonction des études. L'équipe de Van Dongen a montré par exemple que dans le traitement de thrombose veineuse profonde, ce risque hémorragique est de 1,2% contre 2% pour l'héparine standard,[147] alors que Crowther et Warkentin ont décrit un risque similaire pour les 2 types de dérivé héparinique (≈ 2%).[148] Par contre, il semble être bien établi qu'en cas de prophylaxie, les HBPM voient le risque de saignement diminué de moitié.[148] Autre point à signaler est que les HBPM peuvent induire de la TIH mais avec une incidence plus faible que celle observée lors de l'utilisation d'HNF (≈0,2%).[149] Le développement de l'ostéoporose existe aussi avec le traitement par HBPM mais que ce soit sur les études faites chez les animaux, ou chez l'homme, l'incidence est plus faible, comparée à l'héparine standard. [150]

3- Le fondaparinux sodique

Au début des années 80, l'équipe de Choay et celle de Lindahl ont proposé le motif pentasaccharidique noté DEFGH (Fig 16 et 18), comme la plus petite unité de l'héparine qui lie l'AT, et responsable de son activité anticoagulante. L'équipe de Choay a pu synthétiser par voie chimique le pentasaccharide DEFGH et a montré sa très haute affinité pour l'AT, affinité dépendant en particulier du groupement 3-O-sulfate (Fig 18).[151] Ainsi, le fondaparinux

sodique a été synthétisé à partir du pentasaccharide de haute affinité pour l'AT et constitue la dernière classe d'anticoagulant de type héparinique mise sur le marché.

a- Structure et propriétés physico-chimiques

Le fondaparinux sodique est un sel sodique, analogue du pentasaccharide responsable de l'activité anticoagulante de l'héparine (Fig 18). C'est une molécule parfaitement définie obtenue par synthèse chimique à partir d'oligosaccharides,[152] et qui nécessite plus de cinquante étapes de synthèse chimique.

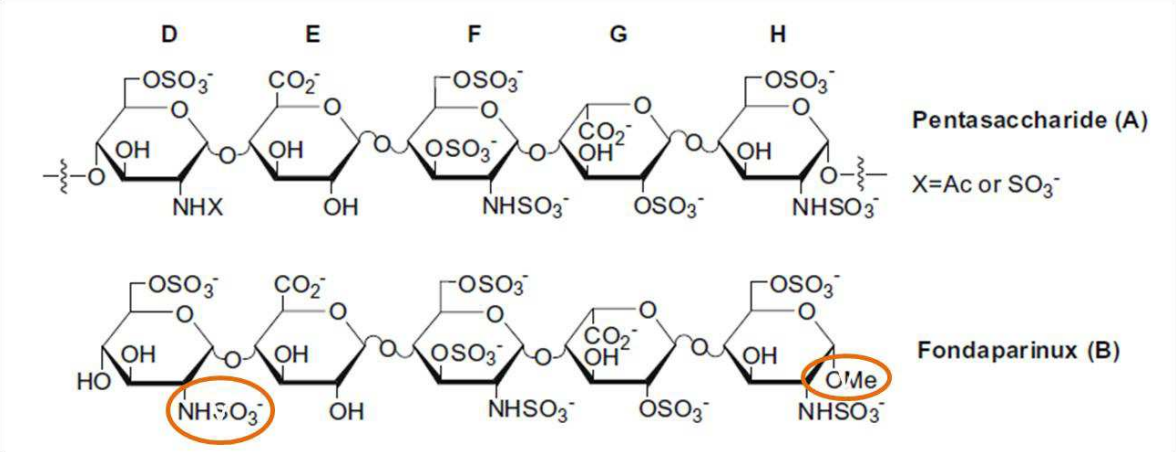


Figure 18 : Comparaison des structures chimiques du motif pentasaccharidique (A) de l'héparine et du fondaparinux (B). Les différences entre les 2 structures sont entourées. Image tirée de la publication de Chen Chen, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009.[152]

Même si la structure du fondaparinux a été faite à partir du motif anticoagulant de l'héparine, quelques modifications chimiques ont été introduites, notamment : un groupement méthyle, pour stabiliser l'extrémité réductrice et de minimiser l'interaction non spécifique aux protéines plasmatiques. Cela rend le fondaparinux structurellement distincte de son homologue natif et fonctionnellement plus puissant en raison de sa plus grande affinité pour l'AT. Comme le montre la figure 18, le fondaparinux est une entité chimique unique (1728 Da), constituée de 3 unités D-glucosamine séparées par une unité d'acide D-glucuronique, une unité d'acide L-iduronique, et portant plusieurs groupes sulfonâtes, très importants pour l'interaction avec l'AT.

b- Mécanisme d'action

Le fondaparinux se lie avec une forte affinité à sa cible physiologique : l'AT (KD ≈ 36 nM, à pH 7,4, force ionique 0,15M, température ≈ 25°C).[153] Aux doses thérapeutiques habituelles, 94% du fondaparinux plasmatique se lient à l'AT[154] et des études ont montré qu'il ne se lie à aucune autre protéine plasmatique (Albumine, α1-acide glycoprotéine …).[155] La liaison est rapide, et non covalente comme celle entre l'héparine et l'AT. Il induit un changement conformationnel de l'AT et son activation, comme les autres dérivés héparíniques. Le fondaparinux ne potentialise que l'inhibition du FXa et pas celle de la thrombine puisqu'il a un poids moléculaire inférieur à 5400 Da. Enfin, comme pour les autres dérivés héparíniques, après inhibition du FXa, le fondaparinux est libéré de l'AT et peut catalyser la liaison d'une autre molécule d'AT et de FXa.

c- Pharmacocinétique du fondaparinux sodique

Le fondaparinux a un profil pharmacocinétique linéaire.[156] Administré par voie sous cutanée, l'absorption du fondaparinux est complète, et rapide. Son volume de distribution est proche de celle du plasma (7-11L). Le fondaparinux atteint la concentration plasmatique maximale environ 1,7 heure après administration. Sa $t_{1/2}$ biologique d'élimination est environ 17 heures et indépendante de la dose. La métabolisation du fondaparinux n'est pas décrite, donc il est essentiellement excrété par voie rénale sous forme inchangée.[119]

d- Les différences majeures du fondaparinux comparé aux HNF et HBPM

Plusieurs études ont comparé le fondaparinux aux autres dérivés héparíniques, le tableau 5 résume l'essentiel des différences constatées entre les 3 anticoagulants héparíniques.[154] En plus de son origine synthétique qui le distingue des HBPM et HNF d'origine animale, le fondaparinux a une pharmacocinétique très favorable. C'est en effet le composé qui présente la biodisponibilité la plus élevée et la t ½ vie la plus longue permettant une seule administration journalière. Par ailleurs, il semble que le fondaparinux sodique a un faible risque d'induire de TIH. Les très rares cas rapportés dans littérature sont discutables et l'imputabilité du fondaparinux n'a pas été clairement établie.[157-159] Il constitue même une alternative à l'utilisation des HBPM et HNF en cas de suspicion de TIH. [160]

Tableau 5 : Comparaison du fondaparinux aux autres anticoagulants héparinoïques

	HNF	**HBPM**	**fondaparinux**
Origine	Animale	Animale	Synthétique
Mécanisme d'action	Activation de l'AT et de l'HCII	Activation de l'AT	Activation de l'AT
Cible	Inhibe les FIIa, FXa, FIXa, FXIIa,	Inhibe le FXa, et faiblement le FIIa	Inhibe exclusivement le FXa
Administration et biodisponibilité	IV ; Sc (≈30% biodisponibilité)	Sc (≈ 90% biodisponibilité)	Sc (≈94% biodisponibilité)
Temps de demi-vie biologique	90mn (IV)	3-6H	17-21H
Liaison aux protéines plasmatiques	AT ; HCII ; lipase lipoprotéine ; ostéoblaste ; PF4…	Majoritairement AT, plus autres interactions mineures	AT
Voie d'élimination	Essentiellement cellulaire et rénale	Majoritairement Rénale	Rénale
Incidence de TIH	≈5%	≈0,2%	≈0%
Risque infectieux, allergique	+++	++	0
Incidence hémorragique[148]	SCA (4,5%) Prophylaxie TEV (3,5%) Traitement TEV (4,3%)[161]	SCA (3,3% à 4,7%) Prophylaxie TEV (1,5% à 1,7%) Traitement TEV (2,9%)[161]	SCA (2,2%) Prophylaxie TEV (1,1%)[162] Traitement TEV (1,2%)
Antidote	Sulfate de protamine (+++)	Sulfate de protamine (+)	Pas d'antidote

Légende : HNF : Héparine non fractionnée **; HBPM** : Héparine de bas poids moléculaire **; AT** : Antithrombine **; HCII** : 2è cofacteur de l'héparine **; IV** : Intraveineuse **; Sc** : Sous-cutanée **; SCA** : Syndrome coronarien aigue **; TEV** : Thromboembolisme veineux

Cependant son élimination exclusivement rénale entraine un risque d'accumulation et expose à un risque hémorragique non négligeable chez les patients ayant une insuffisance rénale.

E- Les différentes stratégies de neutralisation des héparines

Le risque hémorragique associé à l'utilisation des anticoagulants hépariniques est bien réel. Il est essentiellement lié à la biodisponibilité peu prédictible des HNF et donc aux variations des taux plasmatiques liées à cette pharmacocinétique défavorable. Ainsi, il y a une nécessité de faire un suivi biologique pour limiter les situations de surdosage. Quant aux HBPM et au fondaparinux, à cause de leur voie d'élimination essentiellement rénale, ce risque est majoré dans des populations particulières comme chez les patients atteints d'insuffisance rénale, âgés ou de faible poids corporel. En cas de surdosage, le seul antidote disponible est le sulfate de protamine, efficace vis à vis des HNF.[163] L'efficacité du sulfate de protamine, dans la neutralisation de l'activité anticoagulante des HBPM et du fondaparinux, a été évaluée *in vitro* et *in vivo* par plusieurs équipes et il est admis qu'il est partiellement actif vis-à-vis des HBPM, et complètement inefficace vis-à-vis du fondaparinux.[164] A côté des surdosages involontaires, des surdosages volontaires peuvent être réalisés notamment pour anticoaguler les circuits de circulation extracorporelle (CEC) comme en chirurgie cardiaque.

1- L'utilisation du sulfate de protamine

Le sulfate de protamine utilisé en thérapeutique est un polypeptide dérivé du sperme du saumon et d'autres espèces de poissons. Composé d'une trentaine d'acides aminés, le sulfate de protamine contient au moins 65% d'arginine. Il est fortement basique, et doté d'un bas poids moléculaire (≈4 000Da),[165] et forme un complexe nucléo-protamine extrêmement compacte. Ainsi, son rôle dans la condensation de l'ADN du spermatozoïde mature est bien décrit.[166] Il est connu que l'affinité de la liaison entre l'héparine et la protamine dépend considérablement de la force ionique, ce qui suppose une interaction de nature électrostatique.[167] Ces interactions font intervenir les groupements anioniques de l'héparine (sulfate et carboxylate) et les extrémités guanidines des arginines de la protamine pour former un complexe équimolaire.[168] L'affinité entre la protamine et l'héparine de faible affinité à l'AT (pauvre en pentasaccharide sulfaté anticoagulant) est inférieure à celle entre la

protamine et l'héparine riche en pentasaccharide.Cette observation a permis de supposer que l'efficacité de la neutralisation des héparines dépend de leur degré de sulfatation, hypothèse étayée par le fait que l'efficacité de la neutralisation des plusieurs HBPM commerciales dépend du degré de sulfatation des chaînes.[169] Par ailleurs, Dawes et Pepper, grâce à une colonne de protamine immobilisée sur sépharose, avaient montré que le rendement de capture d'héparine croît proportionnellement avec la taille des chaînes polysaccharidiques.[170] Ainsi, une héparine « decasaccharide » (<5400Da) se lie très mal à la colonne de protamine. La différence d'efficacité de neutralisation des dérivés héparíniques par la protamine pourrait donc s'expliquer par une différence de sulfatation et de taille moléculaire des chaînes polysaccharidiques.[169]

En outre, plusieurs effets indésirables de la protamine ont été rapportés. En dehors de l'efficacité partielle de cet antidote, il est souvent décrit que le sulfate de protamine possède un effet anticoagulant intrinsèque *in vitro*[171] et *in vivo*,[172] ce qui peut expliquer les effets rebond dose-dépendants de l'anticoagulation après le traitement.[173] Cet effet anticoagulant résulte de plusieurs mécanismes : inhibition directe du FXa ou du complexe AT-FXa[174], inhibition spécifique de l'activation du FV[175], inhibition de l'initiation de la coagulation par le FT[176], inhibition de la thrombine,[177] potentialisation de la fibrinolyse[178], ou encore inhibition de l'activation des plaquettes.[179] Il est aussi décrit que la protamine administrée chez des patients traités par de l'HNF après chirurgie cardio-pulmonaire, a une $t_{1/2}$ très courte (≈ 5 minutes) dont la conséquence pourrait être le relargage de l'héparine après élimination de la protamine.

Des cas d'allergie, voire des chocs anaphylactiques ont été aussi rapportés après utilisation de la protamine (Incidence <0,69%).[180] Cela s'explique par son origine animale et le fait qu'un nombre non négligeable de personnes sont allergiques aux protéines de poissons.

Une autre complication de l'utilisation de la protamine est l'effet hypotensif. Il est décrit que son effet cardio-hémodynamique est également multifactoriel. Il passe par une augmentation de la concentration d'oxyde nitrique (NO) très vasodilatateur[181], une diminution de la concentration en calcium dans le plasma[182], et une diminution de la contractilité des myocytes.[183]

2- Les stratégies mécaniques utilisées en thérapeutique pour éliminer les héparines

D'autres stratégies pour éliminer les anticoagulants comme le fondaparinux pourraient être envisagées chez les patients avec une hémorragie mettant en jeu le pronostic vital. Parmi ces techniques, l'hémodialyse, ou la transfusion de plasma frais congelé (PFC) peuvent être utilisées.[148] Mais, ce sont des pratiques invasives qui restent très marginales, uniquement en cas de situations urgentes.

L'hémodialyse est une méthode d'épuration du sang par la création d'un circuit de circulation extracorporelle et son passage dans un dialyseur. La dialyse consiste à mettre en contact le sang avec un liquide stérile (le dialysat) dont la composition est proche de celle du plasma au travers d'une membrane qui sert de filtre. Cette technique est déjà utilisée pour éliminer un inhibiteur direct de la thrombine (Hirudine) chez des patients insuffisants rénaux. A noter que cet anticoagulant n'a pas d'antidote spécifique et éliminé essentiellement par voie rénale comme le fondaparinux sodique.[184]

En revanche, la transfusion de plasma moins contraignante, s'agit d'administrer du plasma frais congelé (PFC) chez le patient. Warkentin et al., en 2002 ont décrit que dans les pays Nord-américains, en cas de complications hémorragiques majeures par les AVK, et qui nécessitent une neutralisation immédiate et rapide, la transfusion d'un PFC est déjà utilisée.[185]Cependant, plusieurs limitations sont décrites dont le risque allergique, ou le risque infectieux et donc de septicémie.

3- L'utilisation des facteurs procoagulants

Faute d'antidote, certains utilisent des stratégies non spécifiques pour neutraliser l'effet anticoagulant du fondaparinux. Parmi celles-ci, nous pouvons citer l'administration de FVIIa recombinant rapportée pour quelques cas[186], et l'administration de complexe prothrombique[187], dont le principe commun est d'activer ou de soutenir la coagulation.

Le FVIIa recombinant (rFVIIa), commercialisé sous le nom de Novoseven® est un agent pro-hémostatique, initialement développé pour le traitement des hémophiles allo-immunisés.[188]

Young G, et al, en 2007 ont comparé le thromboélastographe de sang humain surchargé en anticoagulants héparíniques (HNF ; HBPM ; fondaparinux) en présence de rFVIIa. Ils ont démontré que l'administration de rFVIIa permet de reverser l'activité anticoagulante des 3 dérivés héparíniques.[189] Le rFVIIa a aussi montré son efficacité dans la neutralisation du fondaparinux chez des volontaires sains.[190] Ainsi, quelques utilisations du rFVIIa pour neutraliser l'effet anticoagulant des héparines en milieu hospitalier ont également rapporté l'efficacité de ce produit pour cette indication. A ce jour, et en l'absence d'antidote spécifique du fondaparinux, le FVIIa semble être la meilleure stratégie en cas de surdosage.[191] Cependant l'utilisation de ce produit chez des patients souffrant de thromboses veineuses ou artérielles, fait craindre la survenue de complications thrombotiques chez ces malades.[190]

Le complexe prothrombique, constitué d'un concentré de facteurs vitamine K-dépendants (FII, FX, FIX et FVII), est capable de neutraliser l'effet du fondaparinux chez le lapin.[192] Par contre, aucune donnée n'est disponible quant à son utilisation comme antidote de fondaparinux chez l'homme. Cela dit, il est déjà recommandé en cas de surdosage par des inhibiteurs directs du FXa et de FIIa (Rivaroxaban ; Dabigatran ; Bivaluriban).[187]

4- Les différentes stratégies alternatives proposées pour neutraliser les anticoagulants héparíniques

Le Polybrène ou bromure d'hexadiméthrine est un polymère cationique utilisé pour améliorer la transfection des cellules en culture par les rétrovirus, pouvant potentiellement neutraliser les HNF et HBPM par interaction électrostatique. Ce polymère a montré une efficacité comparable à celle du sulfate de protamine pour neutraliser l'héparine dans du sang humain et dans un modèle de chirurgie cardio-pulmonaire de mouton.[193,194] Cependant, il est décrit que le complexe « polybrène-héparine » formé est moins stable que celui de la « protamine-héparine », ce qui laisse supposer un risque d'effet anticoagulant rebond après neutralisation.[195] Puis, ce produit est décrit comme néphrotoxique, ce qui, sans doute, a contribué à l'arrêt de son développement comme antidote des héparines.[196]

D'autres équipes ont proposé d'utiliser le facteur plaquettaire 4 recombinant (rPF4) comme alternative au sulfate de protamine. Le PF4 est physiologiquement synthétisé par les mégacaryocytes, stocké dans les granules α des plaquettes et libéré lors de la sécrétion plaquettaire. *In vitro*, et *in vivo*, dans un modèle murin, le rPF4 a la même efficacité que la protamine.[197,198] Il a aussi montré son efficacité à neutraliser l'HNF chez des patients qui ont subi une CEC en chirurgie cardiaque.[199] Toutefois, une étude réalisée chez le mouton a montré que le rPF4 induit une hypertension pulmonaire aigüe, associée à une vasoconstriction pulmonaire et un relargage de thromboxane dans le plasma.[200] Puis, on sait que les patients en chirurgie cardiaque ont un haut risque de développer des anticorps dirigés contre le complexe PF4/héparine, et développent de TIH. Donc, l'administration de rPF4 chez ces patients peut augmenter ce risque. En tout cas, aucune étude clinique sérieuse n'a évalué l'efficacité et la sécurité de l'utilisation du rPF4 pour neutraliser des HNF chez l'homme.

Une autre approche a consisté à utiliser des multimètres de peptides analogues du domaine d'interaction à l'héparine de plusieurs protéines.[201,202] Ces peptides sont bien capables de neutraliser l'effet des HNF et HBPM *in vitro* et chez le rat, mais n'ont aucun effet sur le fondaparinux.

D'autres peptides ont été évalués, notamment le « HepArrest », un peptide organisé intrinsèquement en hélice α. Il neutralise bien les HNF et HBPM, mais n'a pas été évalué pour le fondaparinux[203]. En plus, des auteurs pensent que sa structure en hélice lui donne moins de flexibilité pour interagir efficacement avec l'héparine linéaire.[202]

Différents peptides ont aussi montré, *in vitro* ou *in vivo*, leur capacité à neutraliser les héparines. Le premier « +18RGD » se lie fortement aux cellules, et cela pourrait compliquer son développement.[204] Le deuxième est une protamine de bas poids moléculaire qui neutralise les HNF, mais aucun test n'a été réalisé pour les autres dérivés héparíniques.[205] Puis, dans cette étude, la dose nécessaire pour neutraliser l'héparine est deux fois plus importante que celle de la protamine, ce qui laisse penser à un besoin d'administrer plus de quantité pour être efficace. Le troisième est le peptide « PM102 », proposé par l'équipe de Daniel Cushing, en 2010, de la famille des peptides complexes organisés en hélice α. Celui-ci neutralise l'HNF sur un modèle de rat mais rien n'est décrit quant à son efficacité vis à vis des autres dérivés héparíniques.[206]

Récemment, une équipe a démontré qu'un dérivé salicylamide « PMX60056 » neutralise les HNF et HBPM chez le rat, mais là encore, rien n'est décrit sur son efficacité vis-à-vis du fondaparinux.[207]

II- OBJECTIF DE L'ETUDE

Comme nous l'avons rappelé, les dérivés héparíniques regroupant les HNF, les HBPM et le fondaparinux sodique sont des médicaments très largement prescrits, et qui agissent en potentialisant l'action de l'inhibiteur physiologique de la coagulation : l'AT.

En pratique, les dérivés héparíniques sont administrés par voie sous cutanée, et les HBPM ou le fondaparinux sont généralement préférés aux HNF du fait de leur pharmacocinétique favorable et de l'incidence réduite de thrombopénie induite à l'héparine.

Ainsi, le fondaparinux sodique présente une très bonne biodisponibilité, certainement expliquée par une très faible liaison non spécifique aux cellules ou aux protéines circulantes, et sa $t_{1/2}$ de 17 heures permet une administration sous la forme d'injection journalière unique. C'est par ailleurs le seul dérivé héparinique à avoir un mode de préparation totalement synthétique ; or l'origine animale des autres dérivés héparíniques a été mise en cause dans la survenue d'accidents allergiques graves aux Etats Unis et en Allemagne 2008.[208]

Comme nous l'avons vu dans les rappels bibliographiques, le risque majeur lié à l'utilisation du fondaparinux est le risque hémorragique.[148] Ce risque est présent avec les HNF, mais l'existence d'un antidote, le sulfate de protamine permet de neutraliser l'héparine en cas de surdosage. Même si elle est en pratique utilisée dans les surdosages aux HBPM, la protamine est moins efficace avec ces formes d'héparines à chaînes plus courtes et moins chargées que les HNF, et reste enfin totalement incapable de neutraliser le fondaparinux.[148] Depuis la commercialisation de la forme curative du fondaparinux sodique en France, de nombreux cas de surdosages ont été rapportés justifiant la mise en place, début 2007, d'une enquête nationale de pharmacovigilance. A l'issue de cette enquête, l'Afssaps a décidé de diffuser en Juillet 2007 une « lettre aux prescripteurs » pour les mettre en garde contre le risque hémorragique lié à l'emploi de ce médicament.[209] La mise à disposition d'un antidote efficace du fondaparinux devrait permettre une utilisation plus large de ce médicament qui présente de nombreux avantages par rapport aux HNF et HBPM.

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris de développer une AT inactive comme antidote au fondaparinux sodique et aux autres dérivés héparíniques. Ce projet repose sur les résultats de nombreuses études des relations structure-fonction de l'AT et sur le mécanisme d'action des dérivés héparíniques.

Le principe de cet antidote est de produire une AT dépourvue d'activité anticoagulante, mais qui gardera sa capacité de liaison au motif pentasaccharidique des dérivés héparíniques. Elle pourra donc entrer en compétition avec l'AT du patient pour la liaison au pentasaccharide. Le dérivé héparinique responsable du surdosage sera ainsi déplacé

de sa cible et engagé dans une liaison avec une AT inactive, ce qui permettra de limiter les manifestations hémorragiques associées au surdosage. Un tel antidote pourra être utilisé pour neutraliser, avec la même efficacité, n'importe quel dérivé héparinique.

Pour produire une telle AT, 2 approches différentes ont été retenues, une approche recombinante (Article 1) et une approche chimique (Article 2).

III- L’APPROCHE RECOMBINANTE (Article 1)

Les connaissances actuelles concernant la relation structure-fonction de l'antithrombine[81] ont permis de modéliser et de produire des variants d'AT capables de lier le motif pentasaccharidique tout en étant incapables d'inactiver les FXa et FIIa. L'inhibition du FXa ou du FIIa par l'antithrombine passe par le clivage de la boucle réactive de l'AT (en P1-P1') et la formation d'un complexe stable inactif antithrombine/protéase. Cette réaction est catalysée par le pentasaccharide qui induit, après liaison à l'AT, une meilleure exposition de sa boucle réactive, et l'apparition de sites secondaires d'interaction entre l'antithrombine et la protéase.

La région P4-P4' de la boucle réactive étant, comme nous l'avons rappelé, primordiale pour l'interaction primaire des 2 molécules, une première approche pour produire un variant d'AT inactif consistait à délaiter, substituer ou insérer un résidu dans cette région (I390-P397). Des études sur le mécanisme d'action des sérine-protéases ont montré l'importance du résidu P1 du substrat dans ce mécanisme. Elles ont également montré qu'une proline en C-terminal de l'arginine P1 du substrat bloque la capacité d'hydrolyse par les protéases.[210]

Diverses possibilités étaient donc envisageables afin d'inactiver l'AT. L'option retenue par notre équipe qui a initié ce travail, a été de cibler les résidus P1 et P1' de différentes façons. Les plasmides permettant l'expression de 3 variants d'AT potentiellement inactifs ont été construits :

- en insérant une proline entre les résidus P1 (R393) et P1' (S394) (mutation Pro394) ;

- en substituant l'arginine 393 (P1) par une histidine (mutation R393H). En effet, les protéases telles que la thrombine ou le FXa présentent une sélectivité très stricte en position P1 qui devrait être une arginine ou une lysine ;

- et en délétant les résidus P1 (R393) et P1' (S394) pour supprimer le site de clivage des protéases sur l'antithrombine (mutation del393-394).

Pour augmenter l'affinité des variants de l'AT vis-à-vis des dérivés héparíniques, et pour réduire l'hétérogénéité de glycosylation due au système d'expression, nous avons éliminé une chaîne glycane sur l'antithrombine connue pour interférer avec la liaison aux héparines.[211] Pour cela, la séquence consensus de glycosylation en position 135 a été altérée en substituant le résidu asparagine 135 par une glutamine (mutation N135Q).

Les 3 mutations des résidus P1-P1' ont été combinées avec la mutation N135Q afin de développer trois doubles mutants d'AT : l'AT-N135Q-Pro394, l'AT-N135Q-R393H, et l'AT-N135Q-del393-394. Le plasmide codant pour le simple variant AT-N135Q a aussi été construit.

L'ensemble de ces constructions plasmidiques a été transfecté dans des cellules HEK293. Les productions ont été réalisées en milieu dépourvu de sérum de veau fœtal pour éviter la contamination de nos préparations d'AT recombinante par de l'AT bovine active. Le niveau de production moyen des différents variants était d'environ de 1mg.L^{-1}. Dans la suite de notre travail, nous avons concentré nos efforts sur les variants AT-N135Q, et AT-N135Q-Pro394, dont les résultats sont présentés dans l'article 1.

La purification des variants d'AT a été réalisée à l'aide de 4 étapes de chromatographie, avec un rendement global de purification de l'ordre de 10%:

- une étape d'affinité à l'héparine permettant de sélectionner les formes d'AT de haute affinité pour l'héparine ;
- une étape de gel filtration en vue de dessaler l'échantillon
- une étape sur une colonne d'échange d'anions ;
- et une étape d'échange de tampon par ultrafiltration.

La pureté de nos variants a été vérifiée par électrophorèse en SDS-PAGE. La différence de poids moléculaire liée à l'absence de la chaine glycane en position 135 de l'AT-N135Q-Pro394 et AT-N135Q est bien visible en SDS-PAGE.

Les constantes cinétiques d'inhibition de FXa ou de FIIa (kon) par l'AT en présence de cofacteur héparinique (Calciparine ou fondaparinux) ont ensuite été mesurées, montrant que l'insertion d'une proline en position 394 entraîne une perte d'activité anticoagulante du variant d'AT (AT-N135Q-Pro394) d'un facteur 5000 vis-à-vis du FXa et 600 000 vis-à-vis de la thrombine, comparés aux contrôles AT-N135Q et AT plasmatique.

L'affinité des 2 variants d'AT pour le pentasaccharide est modérément augmentée, d'un facteur 2,5 environ, par rapport à l'AT plasmatique.

Afin d'évaluer le potentiel antidote, donc la capacité du variant de l'AT à déplacer l'AT plasmatique de sa liaison au dérivé héparinique, nous avons réalisé des tests de compétition sur un plasma surchargé en dérivés héparinoïques, de telle sorte que la concentration en dérivé héparinique soit approximativement équivalente à 3 fois la concentration thérapeutique chez l'homme (fondaparinux 3mg.L^{-1} ; Enoxaparine 3UI anti-

Xa.mL^{-1} ; et Calciparine 1,8UI.mL^{-1}). Comme nous l'espérions, l'addition du variant d'AT N-135Q-Pro394 permet de neutraliser l'activité anti-Xa du fondaparinux, des HBPM, et des HNF de manière dose-dépendante. En outre, il neutralise également l'activité anti-IIa des HNF.

Enfin, nous avons testé l'activité antidote de ce variant *in vivo* vis à vis du fondaparinux. Nous avons choisi de travailler sur des souris de très faible poids (20g en moyenne), pour limiter la quantité de variant à administrer. Un travail de mise au point a été nécessaire, notamment pour chercher à déterminer le Tmax après administration de 500mg/kg de fondaparinux, et fixer le temps auquel devait se faire l'injection de l'antidote. Les résultats nous ont conduits à administrer l'antidote 10 minutes après le surdosage, car à ce temps la décroissance de la concentration en fondaparinux est assez lente permettant de limiter la variabilité d'une souris à l'autre. Malgré le nombre limité de souris traitées par l'antidote, les résultats obtenus sont très clairs et montrent que, dans ce modèle, une concentration d'AT-N135Q-Pro394 correspondant à 2,5 fois l'AT plasmatique murine neutralise l'activité anti-Xa du fondaparinux.

Dans ce premier article, nous avons donc décrit le premier antidote capable de neutraliser spécifiquement le fondaparinux sodique. Nous avons obtenu la preuve de notre concept, à savoir qu'une AT dépourvue d'activité anticoagulante peut se comporter comme un antidote de l'ensemble des dérivés hépariniques, y compris vis à vis du fondaparinux. Cependant, le faible niveau de production en cellules HEK293 et le mauvais rendement de purification de nos variants constituent une limitation majeure à une étude approfondie de notre variant en vue d'un développement futur. Nous avons donc essayé de développer un mode de production alternatif d'une AT inactive : c'est l'approche chimique qui fait l'objet de l'article 2.

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on October 1, 2012. For personal use only.

blood

2011 117: 2054-2060
Prepublished online November 3, 2010;
doi:10.1182/blood-2010-06-288522

Development of a recombinant antithrombin variant as a potent antidote to fondaparinux and other heparin derivatives

Elsa P. Bianchini, Judicael Fazavana, Veronique Picard and Delphine Borgel

Updated information and services can be found at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/117/6/2054.full.html

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections
Thrombosis and Hemostasis (502 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published weekly by the American Society of Hematology, 2021 L St, NW, Suite 900, Washington DC 20036.
Copyright 2011 by The American Society of Hematology; all rights reserved.

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on October 1, 2012. For personal use only.

Development of a recombinant antithrombin variant as a potent antidote to fondaparinux and other heparin derivatives

Elsa P. Bianchini,[1] Judicael Fazavana,[1] Veronique Picard,[1,2] and Delphine Borgel[1,3]

[1]Université Paris-Sud, Laboratoire d'hématologie, Châtenay-Malabry, France; [2]Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Bicêtre, Service d'Hématologie, Le Kremlin-Bicêtre, France; and [3]AP-HP, Hôpital Ambroise Paré, Service d'Hématologie et d'Immunologie, Boulogne-Billancourt, France

Heparin derivative-based therapy has evolved from unfractionated heparin (UFH) to low-molecular-weight heparins (LMWHs) and now fondaparinux, a synthetic pentasaccharide. Contrary to UFH or LMWHs, fondaparinux is not neutralized by protamine sulfate, and no antidote is available to counteract bleeding disorders associated with overdosing. To make the use of fondaparinux safer, we developed an antithrombin (AT) variant as a potent antidote to heparin derivatives. This variant (AT-N135Q-Pro394) combines 2 mutations: substitution of Asn135 by a Gln to remove a glycosylation site and increase affinity for heparins, and the insertion of a Pro between Arg393 and Ser394 to abolish its anticoagulant activity. As expected, AT-N135Q-Pro394 anticoagulant activity was almost abolished, and it exhibited a 3-fold increase in fondaparinux affinity. AT-N135Q-Pro394 was shown to reverse fondaparinux overdosing in vitro in a dose-dependent manner through a competitive process with plasma AT for fondaparinux binding. This antidote effect was also observed in vivo: administration of AT-N135Q-Pro394 in 2.5-fold molar excess versus plasma AT neutralized 86% of the anti-Xa activity within 5 minutes in mice treated with fondaparinux. These results clearly demonstrate that AT-N135Q-Pro394 can reverse the anticoagulant activity of fondaparinux and thus could be used as an antidote for this drug. (*Blood*. 2011;117(6):2054-2060)

Introduction

Unfractionated heparin (UFH) and low-molecular-weight heparins (LMWHs) are well-established anticoagulants commonly used to prevent or treat thromboembolic disorders and to prevent clotting of extracorporeal blood during hemodialysis and cardiac surgery. Besides the continuous monitoring required for UFH, both UFH and LMWHs have serious side effects, such as hemorrhage, heparin-induced thrombocytopenia,[1] or adverse reactions related to a contaminating product in heparins derived from animal tissues.[2] Fondaparinux is a synthetic pentasaccharide whose structure and mechanism of action present several homologies with UFH and LMWH. It will thus be designated as a heparin derivative in the present work. Fondaparinux is the first factor Xa (FXa) selective inhibitor that has received approval for clinical use. It has been evaluated in different clinical trials and appears at least as effective as enoxaparin (a LMWH) for several indications. It also appears safer compared with UFH or LMWHs because of its synthetic origin and its favorable pharmacokinetic profile, which allows a daily injection without continuous monitoring. Furthermore, only few rare cases of thrombocytopenia under fondaparinux treatment were reported, with controversy on a direct causal relationship between the drug and the symptoms in one case.[3-5]

As with every anticoagulant, heparin derivatives are associated with a bleeding risk, and with fondaparinux, this risk is potentiated by its long half-life of approximately 17 hours.[6] UFH and LMWHs can be totally or partially reversed by the administration of protamine sulfate, a nonspecific heparin inhibitor, but protamine sulfate is totally inactive toward fondaparinux. Moreover, the clinical use of protamine sulfate is associated with adverse side effects, including anaphylactic reactions,[7] and some researchers[8,9] have suggested that protamine sulfate may possess intrinsic anticoagulant properties. Indeed, the administration of excess protamine to neutralize UFH in cardiac surgery has been associated with increased bleeding.[10] Thus, a specific and effective antidote to fondaparinux and other heparin derivatives would be helpful in overdose situations and to neutralize excess of heparins after extracorporeal blood circulation.

The anticoagulant activity of heparins relies on their ability to bind antithrombin (AT), a physiologic inhibitor of major procoagulant proteases such as FXa and thrombin. Binding of heparin derivatives to AT increases its anticoagulant activity by several orders of magnitude.[11] Once AT has formed a complex with proteases, heparin derivatives are released and can further catalyze the inhibition of proteases by other AT molecules. To develop a specific antidote for all heparin derivatives, we designed an AT variant devoid of anticoagulant activity that exhibits a greater affinity for heparin derivatives than plasma AT (pAT). Such a variant is expected to compete with circulating pAT for heparin binding, neutralizing an excess of anticoagulant in an inert complex.

Inhibition of proteases by AT involves interaction of the inhibitor reactive center loop (RCL) within the protease active site, cleavage of the RCL, and irreversible complex formation. The conformation and amino acid sequence surrounding the scissile bond on the RCL (especially Arg393 and Ser394 at positions P1 and P1′, respectively, according to Schechter and Berger's nomenclature[12]) are critical for protease inhibition. Thus, to abolish AT anticoagulant activity, a Pro residue was inserted between Arg393 and Ser394, inducing a twist on the RCL able to prevent interaction

Submitted June 3, 2010; accepted October 25, 2010. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, November 3, 2010; DOI 10.1182/blood-2010-06-288522.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2011 by The American Society of Hematology

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on October 1, 2012. For personal use only.

with the target protease. Trypsin-like proteases are also unable to cleave before a proline in P1′ position.[13] Moreover, interaction with heparin derivatives depends on the glycosylation state of AT.[14] To gain affinity for heparin derivatives and thus increase the antidote potential of AT variant, Asn135 was substituted with Gln to block N-glycosylation.[15] Consequently, the AT variant (designated as AT-N135Q-Pro394), designed as an antidote for heparin derivatives, bears 2 point mutations: insertion of a Pro in position 394 and Asn135Gln substitution. We describe herein the production of this AT variant and demonstrate its ability to reverse the anticoagulant activity of heparin derivatives.

Methods

Preparation of recombinant ATs

The shuttle vector pENTR (Invitrogen) carrying full-length AT cDNA (pENTR-AT) was prepared from pCMV6-AT (Origene clone TC110831). Mutagenesis was performed with the use of the QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit according to the manufacturer's recommendations (Agilent Technologies). First, substitution of codon Asn135 by codon Gln was performed with pENTR-AT as a template to generate pENTR-AT-N135Q, and then a Pro codon was inserted between codons Arg393 and Ser394 to prepare vector pENTR-AT-N135Q-Pro394. Both cDNAs were transferred into eukaryote expression vector pCDNA 3.2 by recombination by the use of Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen). The final expression constructs were verified by sequencing.

HEK-293 cells (LGC Standards), grown in "DMEM/F-12" containing 2mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL Streptomycin, and 5% fetal bovine serum (Invitrogen), were transfected with 20 μg of plasmid DNA by calcium-phosphate coprecipitation. Stable expression cell lines were selected by G418 and screened for AT secretion by enzyme-linked immunosorbent assay and Western blotting (Human Antithrombin Bio-Assay ELISA Kit; Euromedex). For both mutated ATs, a single stable expression clone was expanded into "cell factories nunclon" (Nunc) as previously described.[16] Conditioned media, harvested daily, were treated with 5mM benzamidine and 5mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) and stored at −20°C after contrifugation. AT variants were purified from conditioned media by heparin affinity on a HiPrep Heparin FF 16/10 column (GE Healthcare) equilibrated with 20mM phosphate buffer, 0.4M NaCl, and 0.1mM EDTA, pH 7.4. Nonspecifically bound proteins were eluted in the same buffer containing 0.8M NaCl, and high-affinity AT was step-eluted in the same buffer containing 2M NaCl. This latter fraction was loaded on a Hiload 16/60 superdex 200 column (GE Healthcare) equilibrated in 20mM phosphate buffer, 0.02M NaCl, and 0.1mM EDTA, pH 7.4, to decrease salt concentration. Fractions between 75 mL and 95 mL after injection were pooled and then applied on a 1-mL resource Q column (GE Healthcare) equilibrated in the same buffer. AT was eluted with a linear gradient from 0.02M to 0.5M NaCl and concentrated by ultrafiltration with a 30 000-Da cutoff membrane. The AT concentration was estimated by absorbance at 280nM with an absorption coefficient $\epsilon = 0.65\ g^{-1}.L.cm^{-1}$, and the integrity of purified AT was tested by electrophoresis on 10% acrylamide/bisacrylamide gel in native and denaturing conditions followed by silver staining. Finally, AT preparations were aliquoted and stored at −80°C before use for functional assay.

Kinetics of proteases inhibition by ATs

The second-order rate constants (kon) for inhibition of FXa and thrombin (Enzyme Research Laboratories) were measured in the presence of a saturating concentration of fondaparinux (Arixtra; GSK) or UFH (heparin sodium; Panpharma) under pseudo first-order conditions in a continuous or discontinuous assay.[17] All experiments were performed at 25°C in kinetic buffer (20mM phosphate buffer, 0.15M NaCl, 0.1mM EDTA, and 0.1% polyethylene glycol-8000, pH 7.4). With pAT or AT-N135Q, inhibition kinetics were initiated by the addition of enzyme (2nM) to a prewarmed mix containing AT (20-200nM), fondaparinux (200nM), or UFH (1 U/mL) and chromogenic substrate (200μM, S2238 for thrombin or S2765 for FXa; Instrumentation laboratory). Substrate hydrolysis was measured at 405 nm, and the kon values were obtained by fitting the data to the equation for slow-binding inhibition and corrected for the competition introduced by the substrate.[18] For AT-N135Q-Pro394, kon values were estimated in a discontinuous assay in which FXa or thrombin (100nM) were incubated with AT (5μM) in the presence of fondaparinux (10μM) or UFH (10 U/mL) for a period of time ranging from 10 minutes to 24 hours. Residual FXa or thrombin activity was then measured by 20-fold dilution of the previous mixture in S2765 or S2238 (200μM). Absorbance at 405 nm was recorded, and the kon values were estimated by fitting the substrate hydrolysis initial rate curve as a function of incubation time to one phase exponential decay equation.

Affinity of ATs for fondaparinux

Dissociation equilibrium constants (K_D) were estimated by monitoring AT intrinsic fluorescence enhancement upon fondaparinux binding with the use of a LS50B spectrofluorimeter (PerkinElmer Life Sciences) with excitation and emission wavelengths of 280 (slit 3) and 340 (slit 5) nm, respectively.[19] The reactions were performed in kinetic buffer in the presence of 100nM AT and fondaparinux (0-400nM), and data were fitted to the equilibrium binding equation by nonlinear regression assuming a stoichiometry of 1. Before the estimation of K_D, heparin binding sites were titrated in AT samples with the use of AT 1μM and fondaparinux 0-10μM. Data were recorded with excitation and emission slits of 3 nm and fitted to the same equation. Plasma-derived AT (Aclotine, LFB) was used as a positive control.

Evaluation of heparin derivative reversal properties of AT-N135Q-Pro394 in plasma

Antidote potential of AT-N135Q-Pro394 to heparin derivatives was first evaluated by its ability to decrease heparin-induced anti-FXa activity with the Sta-Rotachrom Heparin assay (Diagnostica-Stago) in a pool of citrated normal human plasma. Plasma was supplemented with UFH (0.05-1.8 U/mL), LMWH (enoxaparin [Lovenox], 0.1-3 U/mL; Sanofi-Aventis), or fondaparinux (0.1-3 mg/L) and incubated with AT-N135Q-Pro394 (1:1 volume ratio) in kinetic buffer. After 5 minutes, anti-FXa activity was measured following the manufacturer's recommendations. With the use of a modified Sta-stachrom ATIII assay (Diagnostica-Stago), antidote potential of AT-N135Q-Pro394 was also evaluated by its ability to inhibit anti–thrombin activity. In brief, plasma supplemented with UFH was incubated with AT-N135Q-Pro394 (1:1 volume ratio) and then diluted in chromogenic substrate. The reaction was then initiated by the addition of bovine thrombin diluted in kinetic buffer. Absorbance increase at 405 nm was measured, and anti–thrombin activity was compared to a standard curve established with varying UFH concentrations.

AT-N135Q-Pro394 antidote activity in mice

The antidote activity of AT-N135Q-Pro394 was evaluated in Swiss female albino mice (Janvier). Animal experiments were approved by the University of Paris ethical committee and performed in accordance with the European guidelines for animal experimentation. Twelve mice, 8 for placebo (phosphate-buffered saline [PBS]; Invitrogen) and 4 for AT-N135Q-Pro394, were included in this pilot study. The mean body weight of animals was 20 ± 2 g, and mice were randomly divided in 2 groups. Each mouse was first anesthetized with sodium pentobarbital administered intraperitoneally and then received fondaparinux, 0.5 mg/kg (subcutaneous administration). After 10 minutes, placebo (PBS) or AT-N135Q-Pro394 diluted in PBS was injected in the retro-orbital plexus. Five minutes later, blood was withdrawn by vena cava puncture with the use of syringes containing trisodium citrate. Plasma was obtained by immediate centrifugation for 15 minutes at 2300*g* and stored at −40°C until analysis. Anticoagulant activity of fondaparinux in mouse plasma was evaluated by measuring anti-FXa activity with the Sta-Rotachrom heparin assay as described previously in the section.

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on October 1, 2012. For personal use only.

Table 1. Second-order rate constants (kon) of FXa or thrombin inhibition by pAT and AT variants in the presence of indicated heparin derivative.

	kon ($M^{-1}.s^{-1}$) ± SEM	
Antithrombin	FXa + fondaparinux	Thrombin + UFH
pAT	$(1.67 \pm 0.11) \times 10^5$	$(1.02 \pm 0.09) \times 10^7$
AT-N135Q	$(2.20 \pm 0.07) \times 10^5$	$(1.38 \pm 0.16) \times 10^7$
AT-N135Q-Pro394	32.6 ± 4.4	15.2 ± 2.5

Fast inhibition rate constants (kon > 10^4 $M^{-1}.s^{-1}$) were estimated in a continuous assay, whereas slow inhibition rate constants (kon < 10^4 $M^{-1}.s^{-1}$) were estimated in a discontinuous assay as described in lines 1 and 2. Errors represented the SEM from 2 or more experiments.

AT indicates antithrombin; FXa, factor Xa; pAT, plasma AT; and UFH, unfractionated heparin.

Results

Anticoagulant activity of AT variants compared with pAT

To evaluate impact of the mutations on anticoagulant activity, second-order rate constants (kon) for inhibition of FXa or thrombin by AT variants or pAT were estimated in the presence of saturating heparin derivative concentration (UFH and fondaparinux were used to catalyze thrombin and FXa inhibition, respectively). Protease inhibition rate constants were found comparable for AT-N135Q and pAT (Table 1), suggesting that the procedure for production of recombinant AT did not significantly impair AT anticoagulant activity. However, inhibition rate constants of FXa and thrombin by AT-N135Q-Pro394 were barely measurable, even at high AT concentration, and found at least 3 orders of magnitude lower than kon values measured with AT-N135Q. This finding showed that protease inhibition reactions were too slow, even in the presence of fondaparinux or UFH. Therefore, as expected, AT-N135Q-Pro394 was mostly devoid of anticoagulant activity.

Affinity of plasma and recombinant ATs for fondaparinux

Olson et al[15] have shown that AT *N*-glycosylation interferes with heparin derivative binding and that removal of the Asn135 glycosylation site increases AT heparin affinity. Fondaparinux affinity of both AT variants was compared with pAT. Concentration of each AT samples (pAT, AT-N135Q, and AT Pro394-N135Q) estimated by heparin binding site titration was found similar to AT concentration estimated by absorbance at 280 nm (data not shown). K_D assays were performed with 100nM AT (as estimated by heparin binding site titration) and fondaparinux concentrations ranging from 0 to 400 nM (Table 2). Fondaparinux bound to pAT with a K_D = 22.0 ± 3.4nM, which is comparable with published data,[20] whereas its binding to AT-N135Q or AT-N135Q-Pro394 was approximately 3-fold greater (K_D = 8.6 ± 1.4 nM, and 8.3 ± 1.3 nM for AT-N135Q and AT-N135Q-Pro394, respectively). As expected, Asn135Gln substitution leads to an increased affinity for fondaparinux, but the Pro394 insertion has no effect on fondaparinux binding.

Evaluation of antidote potential of AT-N135Q-Pro394 in human plasma

AT-N135Q-Pro394 was tested for its ability to restore a normal coagulability level in human plasma overdosed with UFH, LMWHs, or fondaparinux. During curative treatment of venous thromboembolic disease, optimal fondaparinux concentration ranges between 1.0 mg/L and 1.26 mg/L in plasma.[21] To mimic an overdose, fondaparinux was added to a human plasma pool at a concentration of 3 mg/L. Anticoagulant activity was then evaluated by the measurement of anti-FXa activity of fondaparinux-overdosed plasma incubated with mutated AT-N135Q-Pro394 at ratios of 0:1, 0.5:1, 1:1, 2:1, and 4:1 compared with endogenous pAT (with pAT measured at 0.15 g/L). In this ex vivo assay, anti-FXa activity was proportional to the amount of fondaparinux bound to endogenous pAT present in tested plasma (Figure 1A). AT-N135Q-Pro394, at a concentration equal to the endogenous pAT concentration, was able to significantly decrease anti-FXa activity to the level of a curative treatment (from 3 mg/L to 1.23 ± 0.10 mg/L). When AT-N135Q-Pro394 was tested at a 2- or 4-fold molar excess compared with endogenous pAT, fondaparinux concentration decreased to 0.59 ± 0.10 mg/L or 0.22 ± 0.05 mg/L, respectively.

Anticoagulant activity determined on the basis of anti-FXa activity was also evaluated in plasma containing UFH and LMWs at high doses. To mimic an overdose, UFH was added to human plasma at a concentration of 1.8 U/mL and LMWHs at 3 U/mL. These concentrations correspond to 3 times the maximal curative concentration. A dose-dependent antidote activity was observed: At a concentration equal to the endogenous pAT concentration, AT-N135Q-Pro394 decreased heparin anticoagulant activity of 76% in both LMWH- or UFH-overdosed plasma (Figure 1B,C). This result means that AT-N135Q-Pro394 acts as a potent antidote to all heparin-like anticoagulants, decreasing a 3-fold overdose within the therapeutic concentration range when added at a ratio 1:1 compared with endogenous pAT.

To confirm the antidote activity of AT-N135Q-Pro394, its ability to restore normal anti–thrombin activity was also evaluated in plasma containing UFH at 1.8 U/mL, that is, 3 times the maximal therapeutic dose. As observed previously, the addition of AT-N135Q-Pro394 reduced UFH anticoagulant activity in plasma from 1.8 to 0.48 ± 0.17 U/mL, 0.23 ± 0.07 U/mL, and 0.04 ± 0.02 U/mL when added at 1-, 2-, and 4-fold endogenous pAT concentration, respectively (Figure 2). Taken together, these data strongly suggest that AT-N135Q-Pro394 could be used as a reversal agent of all heparin derivatives.

The antidote potential of this AT variant also depends on its in vivo biodisponibility. Indeed, with a stronger affinity for heparin derivatives, AT-N135Q-Pro394 could also bind more tightly than endogenous pAT to heparan sulfate exposed on the endothelial cell surface. To evaluate the role of blood-vessel endothelium on AT variant trapping, ability of AT-N135Q-Pro394 to decrease anti-FXa activity in plasma overdosed with fondaparinux was determined after preincubation on a human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) surface. This preincubation on the cell surface minimally influenced the effect of AT variant because at a ratio of 1:1, 2:1, and 4:1 to pAT, AT-N135Q-Pro394 decreased fondaparinux from 3 mg/L to 1.69 ± 0.08 mg/L, 0.94 ± 0.1 mg/L, and 0.27 ± 0.04 mg/L, respectively (compared with 1.23 ± 0.10 mg/L, 0.59 ± 0.10 mg/L, and 0.22 ± 0.05 mg/L in the absence of HUVEC). This finding suggests that AT-N135Q-Pro394 should

Table 2. (K_D) of pAT and AT variants with fondaparinux binding

Antithrombin	K_D ± SEM, nM
pAT	22.0 ± 3.3
AT-N135Q	8.6 ± 1.4
AT-N135Q-Pro394	8.3 ± 1.3

K_D were estimated by intrinsic fluorescence enhancement of AT (100nM) upon fondaparinux (0-400nM) binding, assuming a stoechiometry of 1:1.

AT indicates antithrombin; K_D, dissociation constants; and pAT, plasma AT.

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on October 1, 2012. For personal use only.

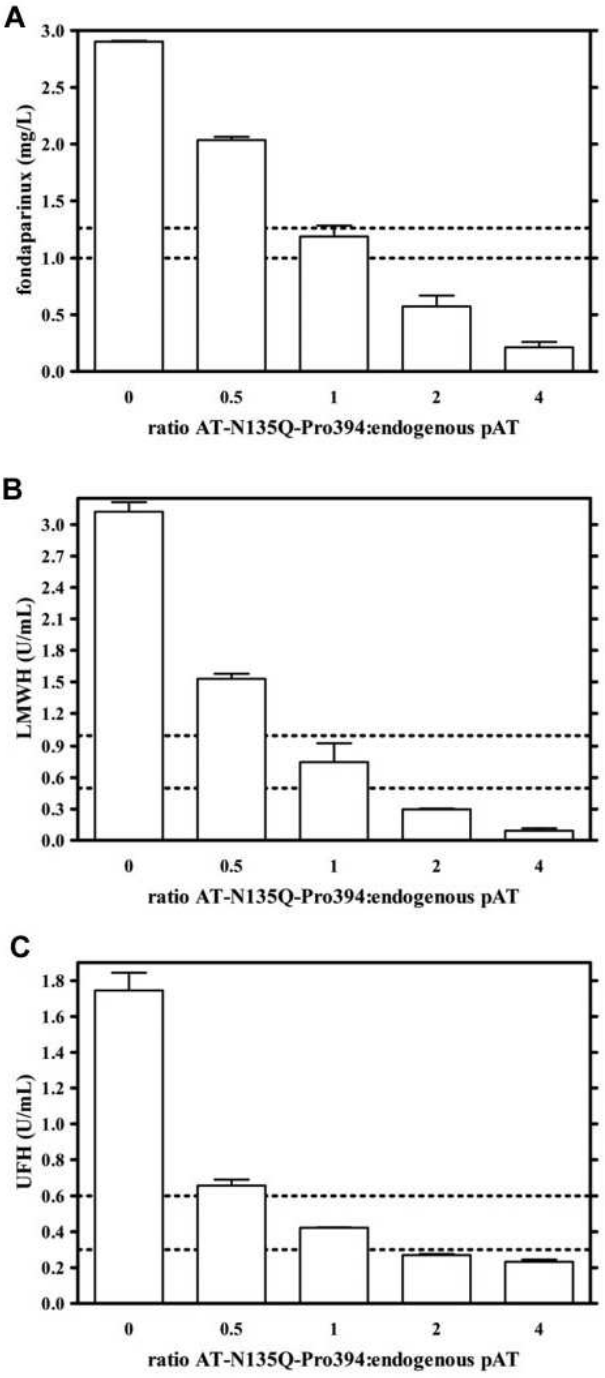


Figure 1. Evaluation of antidote effect of AT-N135Q-Pro394 in heparin derivative–overdosed plasma on the basis of anti-FXa activity measurement. Antidote potential of AT-N135Q-Pro393 was estimated according to its ability to decrease heparin-induced anti-FXa activity in plasma containing fondaparinux 3 mg/L (A), LMWH 3 U/mL (B), or UFH 1.8 U/mL (C). These heparin derivative concentrations correspond to approximately 3-fold the maximal curative dose. AT-N135Q-Pro394 was added to tested plasma at 0, 75, 150, 300, and 600 mg/L, which corresponded to ratios variant to pAT of 0, 0.5, 1, 2, and 4, respectively. Dashed lines indicate maximal and minimal curative concentration for each heparin derivative.

remain available to compete with endogenous pAT in vivo. However, in the present experimental conditions, the ratio between reaction mixture volume (50 μL) and cell surface in a 96-well plate coated with HUVECs (0.3 cm^2) mimics a rather large blood vessel. In microcirculation, the volume/surface ratio could be much lower and antidote trapping by heparan-sulfate could influence its bioavailability.

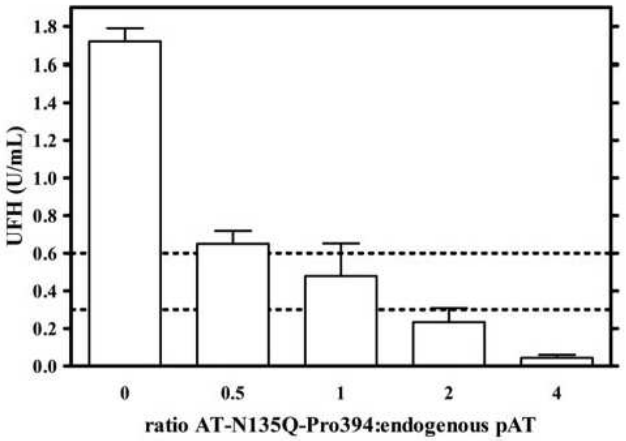


Figure 2. Evaluation of antidote effect of AT-N135Q-Pro394 in UFH-overdosed plasma on the basis of anti–thrombin activity measurement. Antidote efficacy of AT-N135Q-Pro394 was estimated in UFH (1.8 U/mL) containing plasma for its ability to decrease heparin-induced anti–thrombin activity. AT variant was added to tested plasma at 0, 75, 150, 300, and 600 mg/L, which corresponded to ratios variant to pAT of 0, 0.5, 1, 2, and 4, respectively. Dashed lines indicate maximal and minimal curative dose of UFH.

Evaluation of antidote potential of AT-N135Q-Pro394 in vivo

The antidote activity of AT-N135Q-Pro394 was finally evaluated in vivo in mice treated with fondaparinux. Because of a limited supply of the AT variant, only a small number of assays could be performed. A bolus of AT-N135Q-Pro394 (n = 4) or PBS (n = 8) was injected into the retro-orbital plexus of mice 10 minutes after a subcutaneous administration of 0.5 mg/kg fondaparinux corresponding to 5-fold the curative dose in humans. AT-N135Q-Pro394 was administered at a ratio of 2.5:1 to pAT, considering that endogenous pAT concentration in mice is 0.15 g/L (not shown). At this concentration, AT-N135Q-Pro394 treatment resulted in a significant decrease in anti-FXa activity in treated mice. Indeed, 5 minutes after the intravenous administration of the antidote, fondaparinux concentration was estimated at 0.13 ± 0.03 mg/L in antidote-treated animals versus 0.91 ± 0.16 mg/L in untreated animals. This finding corresponds to a decrease in anti-FXa activity of 86% ± 4% (Figure 3). These results clearly demonstrate that, in vivo, the AT variant could reverse the anticoagulant activity of fondaparinux and thus could also be used as an antidote in humans.

Discussion

In the present work we designed and validated the use of an AT variant as an antidote to all heparin derivatives, including fondaparinux. This variant was devoid of anticoagulant activity and bound heparin derivatives with a better affinity than pAT to capture an excess of anticoagulant in an inert complex by a competition mechanism.

Many recombinant or natural variants exhibiting a decreased activity have been described. Most of them exhibit a mutation on the AT RCL that impairs interaction of the AT RCL within the protease catalytic center, resulting in a decreased AT anticoagulant activity.[22] The design of an AT variant able to act as an antidote to heparin derivatives requires a dramatic loss of anticoagulant activity to prevent any amplification of the bleeding disorder when administered at high concentrations. The choice of a Pro residue insertion in P1′ position was determined as the result of protease catalytic groove specificity studies. Trypsin-like enzymes exhibit

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on October 1, 2012. For personal use only.

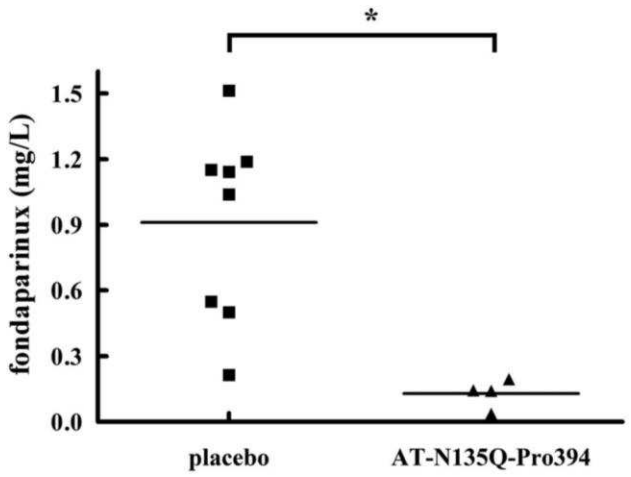


Figure 3. Evaluation of antidote effect of AT-N135Q-Pro394 in mice receiving a high dose of fondaparinux. In vivo antidote activity of AT-N135Q-Pro394 (~ 20 μg/g) versus placebo (PBS) was estimated in mice pretreated with fondaparinux (0.5 mg/kg). Five minutes after intravenous administration of the antidote, blood was withdrawn by puncture in the vena cava, and plasma was obtained by a centrifugation. Anticoagulant activity of fondaparinux was evaluated in plasma of AT-N135Q-Pro394 or placebo-treated mice by measurement of anti-FXa activity as described for heparin derivative reversal properties of AT-N135Q-Pro 394 in plasma. Means (± SD) in each group were compared by unpaired *t* test and found significantly different with $P < .05$.

an extreme selectivity of S1 and S1′ subsites with a clear preference for P1-Arg, whereas P1′-Pro is known to prohibit proteolytic cleavage.[13] AT-N135Q-Pro394 exhibits an antithrombin or anti-FXa inhibitory activity < 0.001% of pAT activity. This indicates that P1′-Pro insertion is more deleterious than the P1-Arg to His substitution as in natural variant AT Glasgow[23] and comparable with P1-Arg deletion in AT London[24] in terms of abolition of AT anticoagulant activity. Even if saturated with heparin derivatives, AT-N135Q-Pro394 is unable to neutralize half of thrombin or FXa generation in less than 12 hours/μM. This AT variant can thus be safely used as a heparin antidote with no risk to increase bleeding.

Another aim was to increase the affinity of AT variant for heparin derivatives to favor their trapping in an inert complex. AT-N135Q-Pro394 binds to fondaparinux approximately 3 times more tightly than pAT. This gain in affinity is sufficient to observe the expected antidote activity of AT-N135Q-Pro394 but is slightly lower compared with published data. Indeed β-like AT binds heparin derivatives 3.5- to approximately 36-fold stronger than α-AT, depending on whether one considers plasma or recombinant AT, and also depending on the expression system and purification procedure.[25,26] Moreover, the gain in affinity for fondaparinux of the AT variant described in this study is entirely attributable to Asn135Gln substitution, whereas Pro394 insertion does not impact fondaparinux binding. It was anticipated that insertion of a Pro residue in position P1′ would disrupt P1-Arg interaction with the AT core and therefore favor "activated" AT conformation, with the loop expelled from β-sheet A. This "activated" conformer is known to bind heparin with a stronger affinity.[23,27] This was not observed, suggesting that Pro394 insertion might induce distortions in AT-N135Q-Pro394 that counteract with the gain in affinity for heparins.

Because of a limited capacity of the recombinant AT production process described in the present work, the in vivo experiments were performed at a single dose of fondaparinux and antidote. However, the results clearly show that AT-N135Q-Pro394 can neutralize fondaparinux in vivo. This strongly supports the concept of an inactive AT variant as antidote to heparin derivatives but the quantity of AT produced is currently incompatible with the management of preclinical and clinical evaluation of the antidote. Interestingly, a large-scale production process of AT in transgenic goat milk was recently developed,[28] and the resulting wild-type transgenic AT (Atryn) was approved by the Food and Drug Administration for a therapeutic use[29] in patients with inherited AT deficiency. Notably, Atryn already has a 4-fold greater affinity for heparin than pAT,[30] a difference that could be increased even more with N135Q mutation. Pharmacokinetic characteristics of transgenic wild-type AT are already available in humans.[31] Transgenic wild-type AT has an anticoagulant activity comparable with pAT but shows a shorter half-life compared with pAT. The process for large-scale AT production can be developed for AT-N135Q-Pro394, allowing the future determination of its pharmacologic and pharmacokinetic properties.

Elevated fondaparinux concentrations in plasma may be related to impaired renal function or the treated patient having a low body weight.[32] Under those circumstances, the accumulation of fondaparinux could likely be neutralized by the administration of an AT variant at a tolerable concentration. In very rare cases, overdose may originate from a misadministration of the drug, and fondaparinux may reach a much greater plasma concentration than pAT so that neutralization of the anticoagulant activity would require very high doses of antidote. Toxicity and maximal dose of antidote that can be administered remain to be determined. It will be particularly important to determine whether the administration of such an AT variant is susceptible to inducing an immunogenic reaction. Although few changes were performed in the amino acid sequence of AT, we cannot exclude an immunization against AT-N135Q-Pro394 of patients exposed to the antidote. The lack of glycosylation induced by the N135Q mutation mimics the natural β isoform of AT and should not induce an immunogenic response. However, consequences of Pro insertion in position 394 of the RCL are hardly predictable, and the immunogenicity of the antidote remains to be determined.

In the actual context of oral anticoagulant development, the availability of an antidote to fondaparinux may be an asset. Indeed, fondaparinux would become the first direct anti-FXa anticoagulant drug having an antidote to secure its use, giving this drug an advantage compared with oral direct FXa inhibitors. The difficulty in neutralizing fondaparinux activity in the event of side effects or overdose was anticipated for the development of a long-acting pentasaccharide, idraparinux. Idraparinux was synthesized coupled to a biotin moiety, allowing neutralization by avidin.[33] However, neither idraparinux nor biotinylated idraparinux has been approved for clinical use, leaving fondaparinux as the only anticoagulant pentasaccharide available. In a previous report, authors demonstrated that recombinant factor VIIa is able to reverse the anticoagulant effect of the fondaparinux in healthy volunteers.[34] However, such an unspecific approach needs consideration before administration to patients with an increased thrombotic risk. The principal advantage of the antidote presented in this study lies in its specific activity for direct neutralization of heparin derivatives. Hemorrhagic state in case of heparin derivative overdose and antidote administration may be easily controlled by anti-FXa activity monitoring.

Finally, the antidote presented in the present work is specific and effective for all heparin derivatives. In this respect, this antidote is of particular interest to substitute the use of protamine sulfate, which is, so far, considered as the treatment of choice for the management of patients who develop bleeding complications while on UFH.[35] Clinical use of protamine is associated with significant adverse side effects, and in practice

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on October 1, 2012. For personal use only.

this drug is unwieldy. The present antidote could be an alternative to protamine sulfate for UFH neutralization in involuntary overdosing, but also in cardiopulmonary bypass during cardiac surgery. Indeed, despite many disadvantages, protamine is routinely administered postoperatively to reverse the high concentrations of UFH required for patients undergoing cardiopulmonary bypass[36] because no other antidote is available. Furthermore, the development of an antidote to reverse fondaparinux activity could open a new drug application for fondaparinux in anticoagulation of cardiopulmonary bypass during cardiac surgery. Indeed, the cardiac surgical procedure is associated with the a high incidence of the development of antiplatelet factor 4/heparin antibodies,[37] and fondaparinux already has been evaluated to ensure anticoagulation of extracorporeal circulation devices during hemodialysis sessions.[38,39]

The results of the present study indicate that the AT variant AT-N135Q-Pro394 is effective as an antidote toward heparins. Preclinical and clinical evaluation will determine how broadly useful this antidote may be in the management of patients with fondaparinux or other heparin derivative treatments, depending on overdose intensity or hemorrhage severity.

Acknowledgments

We thank Sylvain Clauser for proofreading the manuscript.

This work was supported by research grants from FRM (Fondation pour la Recherche Médicale), OSEO, Université Paris Sud, and the Leducq fondation (LINAT). J.F. received a grant from GEHT (Groupe de travail sur l'hémostase et la thrombose).

Authorship

Contribution: E.P.B., V.P., and D.B. designed and supervised research; E.P.B. and J.F. conducted most of the experiments; and E.P.B. and D.B. wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Elsa P. Bianchini, EA4531, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France; e-mail: elsa.bianchini@u-psud.fr.

References

1. Weitz DS, Weitz JI. Update on heparin: what do we need to know? *J Thromb Thrombolysis*. 2010; 29(2):199-207.
2. Blossom DB, Kallen AJ, Patel PR, et al. Outbreak of adverse reactions associated with contaminated heparin. *N Engl J Med*. 2008;359(25):2674-2684.
3. Rota E, Bazzan M, Fantino G. Fondaparinux-related thrombocytopenia in a previous low-molecular-weight heparin (LMWH)-induced heparin-induced thrombocytopenia (HIT). *Thromb Haemost*. 2008;99(4):779-781.
4. Warkentin TE, Maurer BT, Aster RH. Heparin-induced thrombocytopenia associated with fondaparinux. *N Engl J Med*. 2007;356(25):2653-2655; discussion 2653-2655.
5. Schindewolf M, Lindhoff-Last E. Fondaparinux-related thrombocytopenia in a patient with former HIT. Response to Rota et al. *Thromb Haemost*. 2008;100(1):168-169.
6. Donat F, Duret JP, Santoni A, et al. The pharmacokinetics of fondaparinux sodium in healthy volunteers. *Clin Pharmacokinet*. 2002;41(suppl 2):1-9.
7. Nybo M, Madsen JS. Serious anaphylactic reactions due to protamine sulfate: a systematic literature review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008; 103(2):192-196.
8. Ni Ainle F, Preston RJ, Jenkins PV, et al. Protamine sulfate down-regulates thrombin generation by inhibiting factor V activation. *Blood*. 2009; 114(8):1658-1665.
9. Chu AJ, Wang ZG, Raicu M, Beydoun S, Ramos N. Protamine inhibits tissue factor-initiated extrinsic coagulation. *Br J Haematol*. 2001;115(2):392-399.
10. McLaughlin KE, Dunning J. In patients post cardiac surgery do high doses of protamine cause increased bleeding? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2003;2(4):424-426.
11. Huntington JA. Shape-shifting serpins—advantages of a mobile mechanism. *Trends Biochem Sci*. 2006;31(8):427-435.
12. Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1967;27(2):157-162.
13. Schellenberger V, Turck CW, Rutter WJ. Role of the S' subsites in serine protease catalysis. Active-site mapping of rat chymotrypsin, rat trypsin, alpha-lytic protease, and cercarial protease from Schistosoma mansoni. *Biochemistry*. 1994;33(14): 4251-4257.
14. Björk I, Ylinenjarvi K, Olson ST, Hermentin P, Conradt HS, Zettlmeissl G. Decreased affinity of recombinant antithrombin for heparin due to increased glycosylation. *Biochem J*. 1992;286(Pt 3):793-800.
15. Olson ST, Frances-Chmura AM, Swanson R, Bjork I, Zettlmeissl G. Effect of individual carbohydrate chains of recombinant antithrombin on heparin affinity and on the generation of glycoforms differing in heparin affinity. *Arch Biochem Biophys*. 1997;341(2):212-221.
16. Orcutt SJ, Krishnaswamy S. Binding of substrate in two conformations to human prothrombinase drives consecutive cleavage at two sites in prothrombin. *J Biol Chem*. 2004;279(52):54927-54936.
17. Picard V, Marque PE, Paolucci F, Aiach M, Le Bonniec BF. Topology of the stable serpin-protease complexes revealed by an autoantibody that fails to react with the monomeric conformers of antithrombin. *J Biol Chem*. 1999;274(8):4586-4593.
18. Stone SR, Hofsteenge J. Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry*. 1986; 25(16):4622-4628.
19. Olson ST, Bjork I, Shore JD. Kinetic characterization of heparin-catalyzed and uncatalyzed inhibition of blood coagulation proteinases by antithrombin. *Methods Enzymol*. 1993;222:525-559.
20. Paolucci F, Clavies MC, Donat F, Necciari J. Fondaparinux sodium mechanism of action: identification of specific binding to purified and human plasma-derived proteins. *Clin Pharmacokinet*. 2002;41 Suppl 2:11-18.
21. Castellone DD, Van Cott EM. Laboratory monitoring of new anticoagulants. *Am J Hematol*. 2010; 85(3):185-187.
22. Lane DA, Bayston T, Olds RJ, et al. Antithrombin mutation database: 2nd (1997) update. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*. 1997;77(1):197-211.
23. Owen MC, Beresford CH, Carrell RW. Antithrombin Glasgow, 393 Arg to His: a P1 reactive site variant with increased heparin affinity but no thrombin inhibitory activity. *FEBS Lett*. 1988; 231(2):317-320.
24. Raja SM, Chhablani N, Swanson R, et al. Deletion of P1 arginine in a novel antithrombin variant (antithrombin London) abolishes inhibitory activity but enhances heparin affinity and is associated with early onset thrombosis. *J Biol Chem*. 2003; 278(16):13688-13695.
25. Turk B, Brieditis I, Bock SC, Olson ST, Bjork I. The oligosaccharide side chain on Asn-135 of alpha-antithrombin, absent in beta-antithrombin, decreases the heparin affinity of the inhibitor by affecting the heparin-induced conformational change. *Biochemistry*. 1997;36(22):6682-6691.
26. Ersdal-Badju E, Lu A, Peng X, et al. Elimination of glycosylation heterogeneity affecting heparin affinity of recombinant human antithrombin III by expression of a beta-like variant in baculovirus-infected insect cells. *Biochem J*. 1995;310(Pt 1): 323-330.
27. Chuang YJ, Swanson R, Raja SM, Bock SC, Olson ST. The antithrombin P1 residue is important for target proteinase specificity but not for heparin activation of the serpin. Characterization of P1 antithrombin variants with altered proteinase specificity but normal heparin activation. *Biochemistry*. 2001;40(22):6670-6679.
28. Yeung PK. Transgenic antithrombin III (Genzyme). *IDrugs*. 2000;3(6):669-673.
29. Lavine G. FDA approves first biological product derived from transgenic animal. *Am J Health Syst Pharm*. 2009;66(6):518.
30. Edmunds T, Van Patten SM, Pollock J, et al. Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood*. 1998; 91(12):4561-4571.
31. European Medicines Agency. EPAR summary for the public. ATryn (Antithrombin alfa). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000587/WC500028255.pdf. Accessed November 12, 2010.
32. Delavenne X, Zufferey P, Baylot D, et al. Population pharmacokinetics of fondaparinux administered at prophylactic doses after major orthopaedic surgery in everyday practice. *Thromb Haemost*. 2010;104(2):252-260.
33. Savi P, Herault JP, Duchaussoy P, et al. Reversible biotinylated oligosaccharides: a new approach for a better management of anticoagulant therapy. *J Thromb Haemost*. 2008;6(10):1697-1706.

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on October 1, 2012. For personal use only.

34. Bijsterveld NR, Moons AH, Boekholdt SM, et al. Ability of recombinant factor VIIa to reverse the anticoagulant effect of the pentasaccharide fondaparinux in healthy volunteers. *Circulation*. 2002;106(20):2550-2554.

35. Baglin T, Barrowcliffe TW, Cohen A, Greaves M. Guidelines on the use and monitoring of heparin. *Br J Haematol*. 2006;133(1):19-34.

36. Dunning J, Versteegh M, Fabbri A, et al. Guideline on antiplatelet and anticoagulation management in cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008;34(1):73-92.

37. Thielmann M, Bunschkowski M, Tossios P, et al. Perioperative thrombocytopenia in cardiac surgical patients—incidence of heparin-induced thrombocytopenia, morbidities and mortality. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2010;37(6):1391-1395.

38. Sombolos KI, Fragia TK, Gionanlis LC, et al. Use of fondaparinux as an anticoagulant during hemodialysis: a preliminary study. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2008;46(4):198-203.

39. Kalicki RM, Aregger F, Alberio L, Lammle B, Frey FJ, Uehlinger DE. Use of the pentasaccharide fondaparinux as an anticoagulant during haemodialysis. *Thromb Haemost*. 2007;98(6):1200-1207.

IV- L’APPROCHE CHIMIQUE (Article 2)

Depuis les années 80, l'R393 de l'AT (résidu P1) est connue pour être le site de clivage de l'AT par les protéases de la coagulation.[52] Ainsi, des variants naturels d'AT mutés au niveau de l'R393 ont une activité inhibitrice diminuée, confirmant l'importance de ce résidu dans l'activité anticoagulante de la Serpin.[81]

Nous avons donc envisagé de produire une AT d'activité anticoagulante réduite en modifiant par voie chimique cette R393. Pour cela, nous avons utilisé un réactif chimique de la famille des α-dicarbonyles connus pour leur capacité à réagir avec les chaines latérales des arginines. Les α-dicarbonyles ont été largement utilisés dans les années 70 et 80[212] pour étudier le rôle des arginines dans le cadre d'études de relation « structure-fonction » de diverses protéines, dont l'AT.[79,213]

Les α-dicarbonyles les plus couramment utilisés sont la 2,3-butanedione, la 1,2-cyclohexanedione, et le phénylglyoxal. Ces produits ont l'avantage d'être hydrosolubles et réactifs à pH avoisinant la neutralité, contrairement à la majorité des α-dicarbonyles.[212] Cependant, il faut savoir que la réactivité entre l'arginine et les α-dicarbonyles dépend beaucoup de la déprotonation de l'extrémité guanidine de l'arginine (pKa 12,5), la forme nucléophile réactive, ce qui explique l'accélération de la réaction à pH basique.[214]

Le phénylglyoxal a initialement été décrit comme un réactif permettant la caractérisation des arginines par Takahashi, en 1968 (Fig 19).[215] Ce produit a notamment été utilisé pour caractériser le rôle des arginines de l'AT dans son activité anti-IIa, en l'absence et en présence d'héparine.[216] Le phénylglyoxal est très réactif vis-à-vis des α-amines, ce qui suppose qu'il peut aussi modifier les lysines. En outre, il s'auto-condense très rapidement dans des conditions de pH proches de la neutralité. Enfin, la réaction du phénylglyoxal avec les arginines semble être réversible, particulièrement lorsqu'elle se déroule à un pH proche de la neutralité, ou lorsque le phénylglyoxal n'est pas en excès dans le milieu réactionnel.[217](Fig 19)

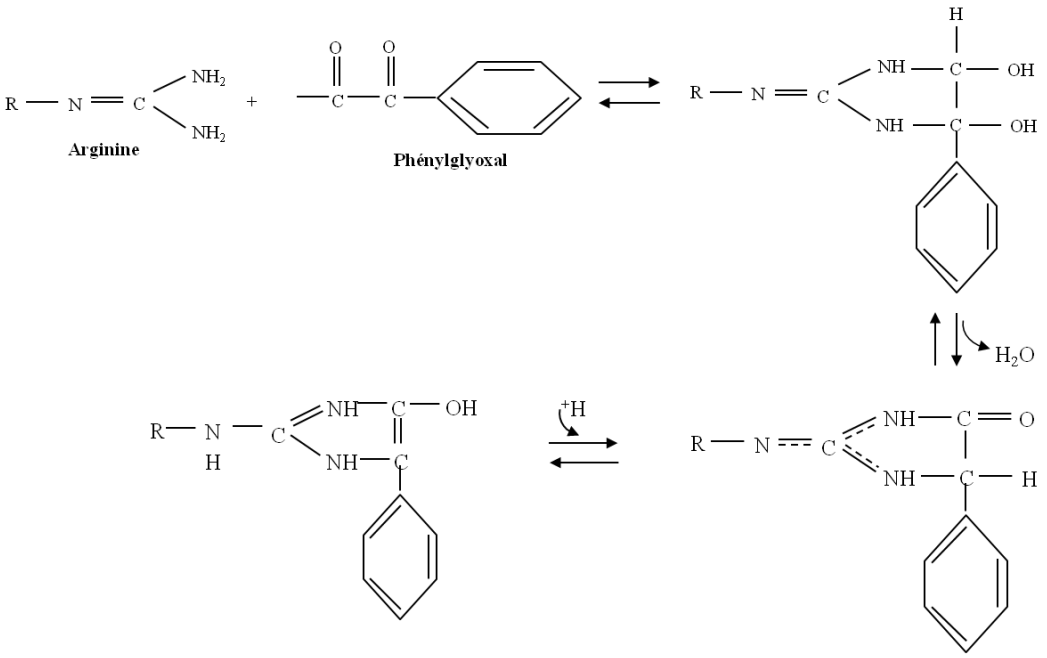


Figure 19: Schéma réactionnel entre l'arginine et le phenylglyoxal[217]

La 1,2-cyclohexanedione est lui actif à un pH légèrement plus basique (≥ 9) que les autres réactifs.[212] Ainsi, il a été montré qu'à un pH situé entre 7 et 9, le produit dérivé de la modification de l'arginine n'est stable qu'en présence de Borate.[212] Comme le phénylglyoxal, ce produit s'auto-condense à un pH proche de la neutralité. La 1,2-cyclohexanedione lui aussi a été utilisée pour caractériser la relation « structure-fonction » des arginines de l'AT.[79] (Fig 20)

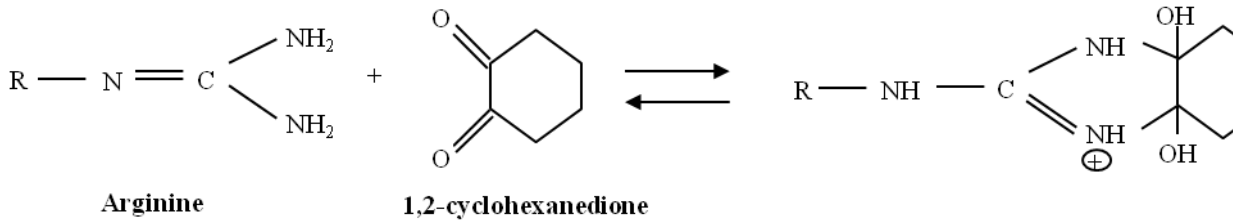


Figure 20: Schéma réactionnel entre l'arginine et la 1,2-cyclohexanedione[212]

L'utilisation de la 2,3-butanedione comme réactif de caractérisation de l'arginine a été initialement décrite par Yankeelov et al., en 1968 (Fig 21).[218] Cet α-dicarbonyle a déjà été utilisé pour caractériser la relation « structure-fonction » des arginines de l'AT.[79] Tout comme la 1,2-cyclohexanedione et le phénylglyoxal, la 2,3-butanedione peut s'auto-condenser, mais à

un pH plutôt basique, et donner naissance à plusieurs produits oligomeriques potentiellement aussi réactifs que la forme monomérique.[218,219,220] Ainsi, le schéma réactionnel entre l'arginine et la 2,3-butanedione serait celui proposé Fig 21. Des réarrangements structuraux du cycle obtenu sur l'arginine sont également suggérés avec perte d'une ou 2 molécules d'eau, ce qui donne naissance aux structures représentées.

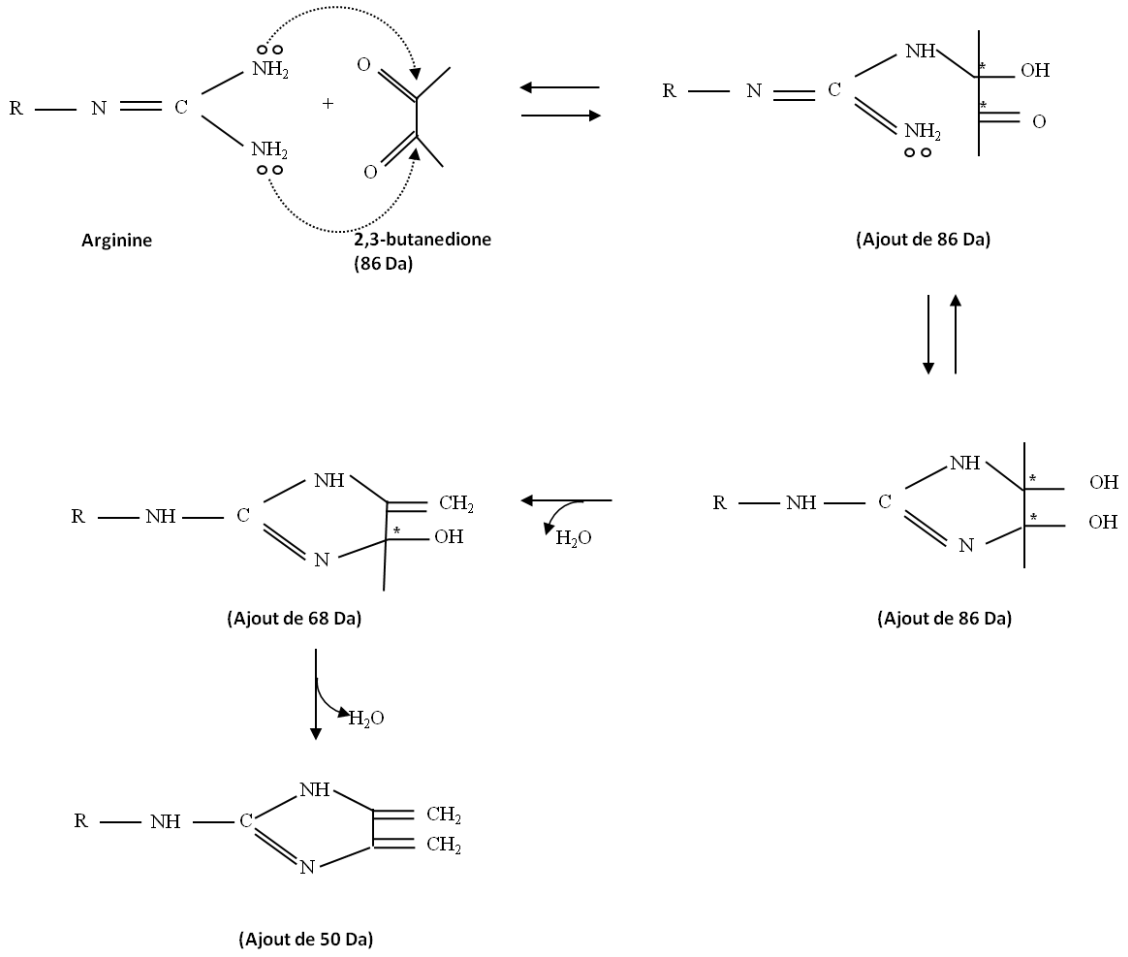


Figure 21: Schéma réactionnel entre l'arginine et la 2,3-butanedione. (*) Carbone tétraédrique[221]

Récemment, Mathews et al., ont déterminé par résonnance magnétique nucléaire en carbone 13 (RMN-C^{13}), 2 structures chimiques issues de la réaction entre l'arginine et la 2,3-butanedione, conformes aux structures proposées par Yankeelov., et al et Riordan., et al (Fig 22).[213,220] Ces composés comportent 2 carbones centres chiraux, donc ils peuvent se présenter sous plusieurs stéréo-isomères, d'où la pluralité des produits dérivés.[221]

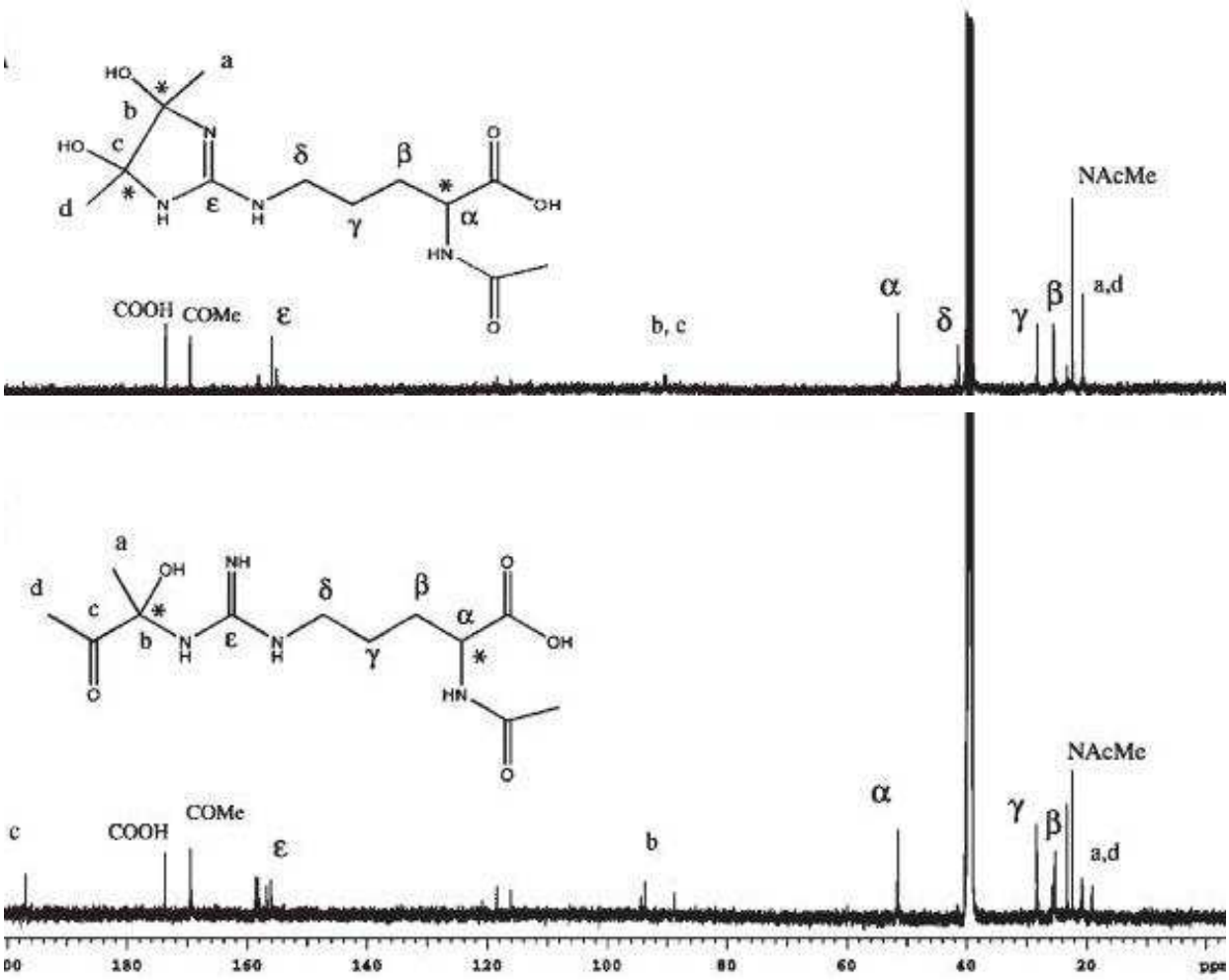


Figure 22: Structures chimiques des composés dérivés de la modification de l'arginine par la 2,3-butanedione[221]

Au cours de notre travail, plusieurs composés carbonylés ont été testés. Certains, comme la 2,3-butanedione et la 1,2-cyclohexanedione, étaient bien décrits pour leur réactivité vis à vis des arginines. D'autres, comme la naphtoquinone-4-sulfonate, l'acide croconique ou l'hydroxybenzile, ont été évalués en collaboration avec l'équipe du Pr Jean Daniel Brion (UMR8076-BioCIS, Châtenay-Malabry). Tous possèdent des fonctions cétones susceptibles de réagir avec les chaines latérales des arginines (Fig 23). La naphtoquinone-4-sulfonate sert à doser des acides aminés comme les lysines dans la nourriture animale par méthode chromatographique.[222] Elle est également utilisée pour doser des produits pharmaceutiques contenant des amines comme la fluoxetine, la sertraline, ou la paroxetine.[223] L'acide croconique est lui utilisé comme colorant dans le dosage de fonction thiol ou de cyanide anionique dans du matériel biologique.[224] Quant au benzile déjà utilisé pour caractériser des résidus arginines[225], 2 fonctions hydroxyles ont été ajoutées par l'équipe du Pr Jean Daniel Brion afin de le rendre plus hydrosoluble (Fig 23).

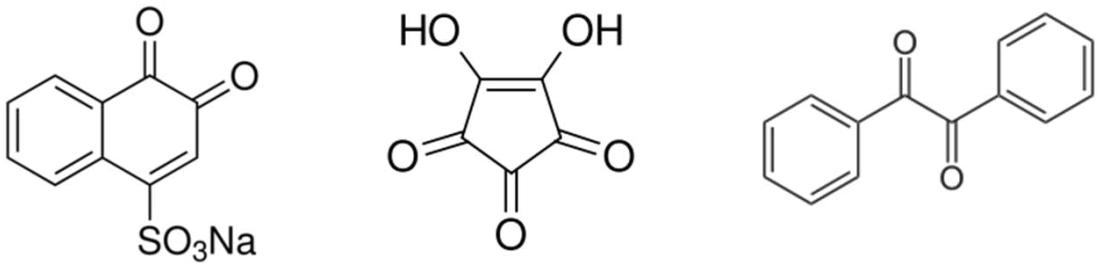


Figure 23: Structures chimiques de la naphtoquinone-4-sulfonate, de l'acide croconique, et du benzile (De gauche à droite)

L'AT humaine comprend 22 arginines dont l'R393 située dans la boucle réactive est la plus importante dans son interaction avec la protéase, et sept sont plus ou moins impliquées dans l'interaction à l'héparine : « R13 ; R24 ; R46 ; R47 ; R57 ; R129 ; R132 » (Fig 24).

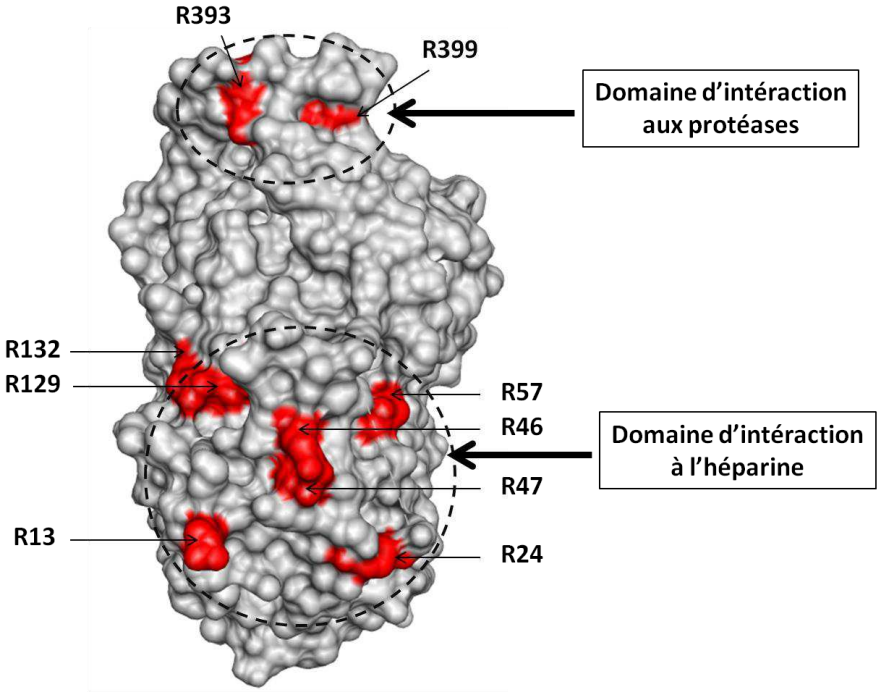


Figure 24 : Position des arginines impliquées dans l'activité anticoagulante de l'AT en présence d'héparine (Code pdb 1AZX). Image réalisée sur UCSF Chimera

Comme nous l'avons vu dans la première partie de notre travail, l'obtention d'une AT douée d'effet antidote vis à vis des dérivés héparíniques nécessite non seulement une perte significative de l'activité anticoagulante de l'AT, mais aussi qu'elle conserve une affinité vis à vis des dérivés héparíniques au moins équivalente à celle de l'AT plasmatique.

La modification chimique par un réactif carbonylé doit donc être réalisée dans des conditions qui préservent les arginines impliquées dans le site de liaison à l'héparine. Nous avons donc mis en place un protocole expérimental de modification chimique de l'AT en phase solide, après avoir immobilisé l'AT sur une colonne d'héparine greffée à la sépharose (Hi-trap Heparin). L'héparine permet de protéger les arginines ainsi que les lysines indispensables à l'affinité à l'héparine par encombrement stérique, mais aussi d'activer l'AT et d'exposer l'R393 qui doit être la cible principale de la modification. Après incubation de l'AT avec le réactif carbonylé, l'AT d'intérêt est éluée entre 0,8M et 2M de NaCl, permettant de sélectionner les formes de plus haute affinité à l'héparine.

Après avoir testé les différents α-dicarbonyles et l'acide croconique, c'est finalement l'AT modifiée par la 2,3-butanedione (AT-BD) qui a été caractérisée et dont les résultats sont rapportés dans ce travail (Article 2). En effet, c'est le réactif qui a permis d'inactiver l'AT avec le meilleur rendement.

L'article 2 rapporte la caractérisation biochimique de l'AT-BD produite et ses propriétés fonctionnelles. La mesure des constantes cinétiques d'inhibition du FXa et du FIIa (kon) en présence de dérivés héparíniques, a montré que l'AT-BD possède une activité anti-Xa 10 fois inférieure à celle de l'AT plasmatique. Cette même AT-BD a une affinité approximativement 6 fois meilleure que l'AT contrôle et 20 fois meilleure que l'AT plasmatique puisque la mesure de la constante de dissociation à l'équilibre (K_D) vis-à-vis du fondaparinux a déterminé une K_D de ≈ 3,4nM pour l'AT-BD, de ≈ 20nM pour l'AT contrôle, et de ≈ 60nM pour l'AT plasmatique.

Sur du plasma humain surchargé en anticoagulants héparíniques, l'AT-BD neutralise d'une manière dose-dépendante l'activité anti-Xa du fondaparinux, des HBPM (Enoxaparine) et des HNF (Calciparine).

Ce potentiel antidote vis à vis des dérivés héparíniques a été confirmé *in vivo* chez la souris, puisque l'AT-BD neutralise le fondaparinux sodique avec la même efficacité que le variant d'AT-N135Q-Pro394 et les HNF de façon comparable au sulfate de protamine. La préparation par modification chimique de l'AT nous a permis de préparer des quantités d'AT-

BD importantes, et donc de tester un nombre de souris plus important qu'avec l'AT-N135Q-Pro394 (Seules 4 souris avaient reçu l'AT-N135Q-Pro394).

Par ailleurs, les quantités et les concentrations d'AT-BD obtenues nous ont également permis de tester l'effet de fortes concentrations d'AT-BD sur un test global de la coagulation. Ainsi, nous avons comparé l'effet de l'AT-BD et du sulfate de protamine décrit pour avoir un effet anticoagulant propre,[175] sur un temps de Céphaline Activé (TCA). De façon intéressante, contrairement au sulfate de protamine qui allonge le TCA dès 6UAH/ml, l'AT-BD n'a aucun effet anticoagulant intrinsèque jusqu'à une concentration de 1,2g.L^{-1}, en l'absence ou en présence d'1UI.mL^{-1} d'HNF.

*** Caractérisation structurale de l'AT-BD**

Enfin, parallèlement à la caractérisation des propriétés antidotes de l'AT-BD, nous avons essayé d'identifier les arginines modifiées par la 2,3-butanedione. Pour ce faire, notre approche analytique est divisée en 2 étapes :

- élaboration d'une carte peptidique de l'AT sur une colonne en phase inversée ;
- séquençage des peptides par spectrométrie de masse.

Cette étude analytique a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr Myriam Taverna (UMR8612, Châtenay-Malabry) et a comme objectif de comparer les cartes peptidiques de l'AT contrôle à celle de l'AT-BD, après séparation des digestes d'AT sur une colonne en phase inverse C18 en chromatographie en phase liquide (HPLC).

Après optimisation du protocole, nous avons retenu les conditions suivantes : l'AT (Aclotine®, LFB) est dessalée sur une colonne de dessalage (Hi-trap Desalting 5mL, GE Healthcare) avant d'être lyophilisée. Elle est ensuite dénaturée dans du tampon bicarbonate d'ammonium contenant 8M d'urée, puis réduite par du Dithiothréitol (DTT, Sigma) à 55°C. Les cystéines de l'AT sont alors alkylées par l'iodoacétamide à l'abri de la lumière. La concentration d'urée est ramenée à 0,6M, avant digestion de l'AT par l'endoprotéase Asp-N (Roche Diagnostic) à un ratio substrat/enzyme de 1/60. Cette enzyme clive en N-terminale des résidus aspartate et glutamate. Le digeste est ensuite congelé à -80°C avant d'être séparé sur une colonne C18-HPLC 300Å Uptisphere UP5WOD-250/030 25cm X 3mm (INTERCHIM).

Approximativement 100µg d'AT sont chargées sur la colonne à l'aide d'une pompe (Waters controller 600) et d'un auto-injecteur (Waters 77 Plus) à un débit de 0,33mL.mn^{-1}. Nous avons utilisé 2 phases mobiles : phase A (Eau 0,12%TFA) et phase B (Acétonitrile

0,1%TFA). La séparation des peptides est réalisée sur un gradient de phase B dont les détails figurent dans le tableau suivant :

Tableau 6: Gradient de phase B

Temps (mn)	Phase A(%)	Phase B(%)
0-2	98	2
2-32	80	20
32-42	40	60
42-92	10	90
92-122	98	2

L'enregistrement est fait à 210nm par un détecteur UV et les pics d'élution sont collectés, puis déshydratés par Speedvac avant d'être analysés en spectrométrie de Masse.

Mathews et al., ont montré que l'arginine traitée par la 2,3-butanedione donne naissance à quatre produits dérivés. Sur une colonne C4 en phase inversée, un des produits dérivés est plus hydrophile que l'arginine non modifiée alors que les 3 autres sont plus hydrophobes. Il s'est avéré que sur ces 4 produits, il y a 2 structures chimiques se présentant en plusieurs stéréo-isomères.[221] Sur la base de ces données, un peptide contenant une arginine modifiée par la 2,3-butanedione devrait avoir un temps de rétention différent de celui du peptide initial sur une colonne en phase inversée.

Nous avons donc comparé les cartes peptidiques de l'AT contrôle non modifiée et de l'AT-BD, et observé certaines différences (Fig 25). Même si la majorité des pics sont identiques en temps de rétention et en intensité, laissant supposer que ces peptides n'ont pas été modifiés par la 2,3-butanedione, d'autres ont une intensité diminué ou sont totalement absents pour l'AT-BD, suggérant une modification partielle ou totale d'un résidu.

Les fractions de la HPLC ont été solubilisées dans une solution aqueuse avec 0,1% de TFA. Puis, 1µl de chaque échantillon est déposé avec 1µl d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (10mg.mL^{-1}) dilué dans 0,1% d'acétonitrile (1/1, v/v) sur une plaque cible (Applied Biosystems target 4700). Par la suite, le mélange est laissé à sécher à température ambiante. Les spectres MALDI-TOF ont été obtenus en mode réflexion positive sur un intervalle de ratio masse/charge (m/z) de 700 à 5000. L'ionisation des échantillons a été faite par laser (Nd: YAG Y AG) Ultraviolet à 355 nm, à une fréquence de 200 Hz. En moyenne, 5000 et 10000 tirs ont permis l'acquisition des spectres MS et MS/MS

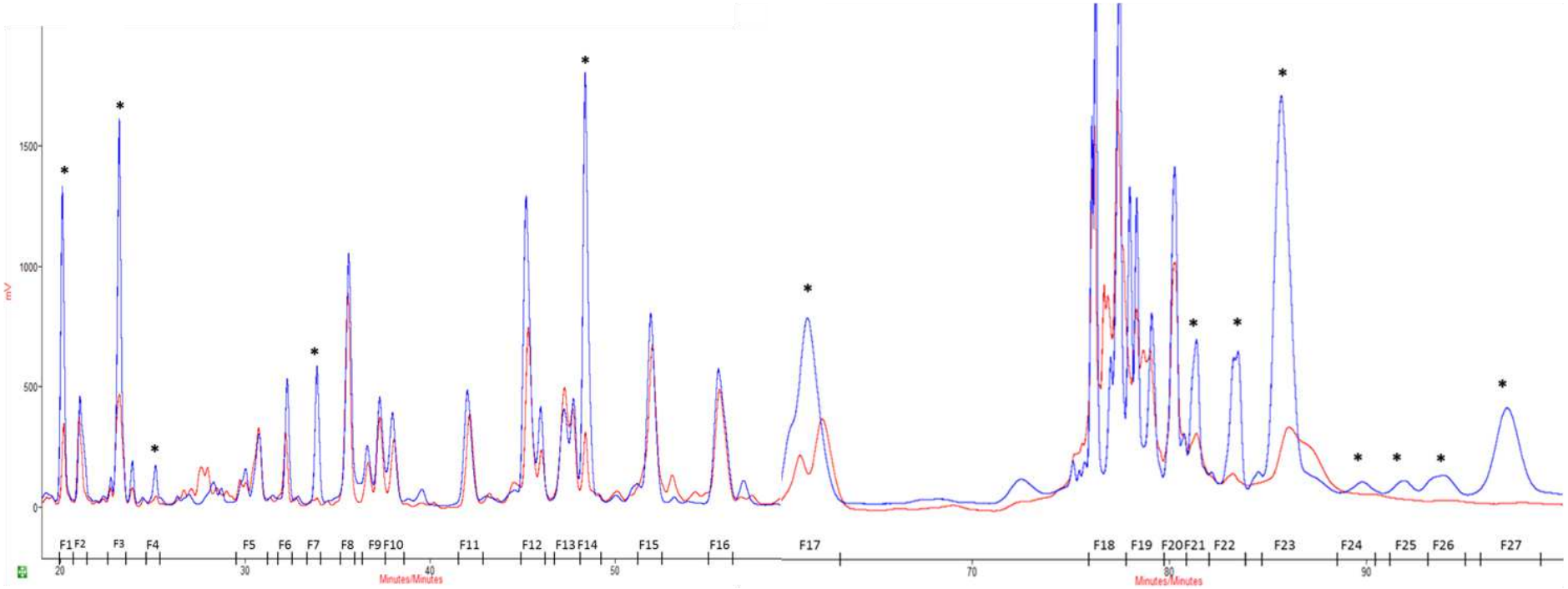


Figure 25: Superposition des cartes peptidiques de l'AT contrôle et de l'AT-BD. En bleu : l'AT contrôle, et en rouge : AT-BD. Etoile : différence entre les 2 cartes peptidiques.

respectivement. Les échantillons ont été analysés avec une tension d'accélération de la source de 20kV et l'énergie de collision a été fixée à 1 kV. Les spectres MS ont été calibrés par un mélange de peptides (des-Arg-1-bradykinine, l'angiotensine I, Glu-1-B fibrinopeptide, hormone adrénocorticotropique ou ACTH). Pour les spectres MS/MS, les pics ont été calibrés par les fragments d'angiotensine I protonée. Les masses qui ont correspondu à des valeurs théoriques de peptide contenant de l'arginine ont été étudiées par MALDI-TOF-TOF.

Les masses générées en MALDI-MS ont été soumises à la base de données de spectres de masse « MascotMatrix Science », alors que les séquences de l'analyse MS/MS ont été soumises à la base de données NCBI BLAST SEARCH. Les résultats du séquençage des peptides identifiés sont résumés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Les arginines identifiées dans les peptides séquencés. En noir, gras : Arginine non modifiée ; en Bleu : Modification arginine non connue, donc à confirmer ; en Rouge : arginine probablement modifiée.

Arginine	Peptide identifié	Résidus (N°)	Fractions (N°)	Commentaire
R13	DICTAKP**R**	6-13	2	**Non modifiée**
R24	DIPMNPMCIY**R**SPEKKATE	14-32	17	**Probablement modifiée**
R46 **R47**	EQKIPEATN**RR**VW EQKIPEATN**RR**VW	37-49 33-49	12 13	**Non modifiée**
R57	ELSKANS**R**FATTFYQHLA	50-67	18	**A confirmer**
R129 **R132** **R145**	DQIHFFFAKLNCRLY**R**KANKSSKLVSANRLFG	117-148	20	**A confirmer**
R183	**Non identifiée**			
R197	**Non identifiée**			
R235	**Non identifiée**			
R259 **R261** **R262**	EGKF**R**Y**RR**VA EGKF**R**Y**RR**VAEGTQVL	255-264 255-270	8 13	**Non modifiée**
R322 **R324**	EMMLVVHMP**R**F**R**IE	313-326	19	**A confirmer**
R359	**Non identifiée**			
R393	**Non identifiée**			
R399	**Non identifiée**			
R406	**Non identifiée**			
R413	**Non identifiée**			
R425	EVPLNTIIFMG**R**VANPCVK	414-432	19	**A confirmer**

Alors, au stade actuel de cette caractérisation analytique, les conditions expérimentales de l'identification des peptides de chaque fraction HPLC sont encore à optimiser. Cela dit, nous avons pu identifier 13 arginines sur les 22 existantes de l'AT (≈ 60%), avec une couverture de séquence d'environ 45%.

En se basant sur les cartes peptidiques, les R13, R46, R47, R259, R261, et R262 sont probablement non modifiées. En effet, ces résidus sont identifiés dans des peptides élués dans les pics identiques entre le profil de l'AT contrôle non modifiée et l'AT-BD (Fractions 2 ; 8 ; 12 ; et 13). A noter que les R13, R46, et R47 se trouvent au cœur du domaine d'interaction à l'héparine. (Fig 26).

En outre, nous avons également identifié l'R24 dans la fraction 17, impliquée dans l'interaction à l'héparine. Sur les cartes peptidiques, cette arginine est éluée dans un pic de profil différent entre l'AT contrôle et l'AT-BD, ce qui laisse supposer sa modification. Mais, comme nous avons aussi identifié plusieurs peptides, sans arginine dans la même fraction, nous pensons qu'il est possible que cette différence de profil pourrait être due à la modification d'un résidu basique autre que l'arginine. Donc, nous pensons revérifier cette modification sur une autre approche ultérieurement.

Enfin, nous avons aussi identifié les R57, R129, R132, R322, R324, et R425 dans les mêmes fractions de l'AT contrôle et de l'AT-BD (Fractions 18, 19, et 20). Malheureusement, la pauvre résolution de séparation des pics concernés sur les cartes peptidiques ne permet pas du tout de savoir s'il y a une différence de profils ou non.

Ce premier essai de séquençage par Maldi-TOF-TOF-MSn nous a permis de savoir que 6 arginines dont 3 dans l'HBS ne sont pas modifiées par la 2,3-butanedione. Par contre, nous ne savons rien sur les 16 arginines restantes, dont l'R393, site actif, la première cible de cette modification. Pour expliquer cela, nous avons quelques hypothèses, soit ces arginines se trouvent dans des peptides qui ne s'ionisent pas dans nos conditions expérimentales actuelles ; soit ces peptides ne sont pas retenus du tout sur notre colonne C18 ; soit ils ont des masses moléculaires importantes, ce qui cause une mauvaise ionisation.

Par ailleurs, afin de travailler sur des peptides de petite taille, nous avons réalisé une double digestion. Pour cela, les digestes d'AT par l'endoprotéase Asp-N ont été incubés avec de la trypsine pendant une nuit à 37°C (Ratio 1/50), et les 2 AT ont été analysées en Maldi-TOF-TOF-MSn dans les conditions précédentes.

Dans l'AT contrôle, nous avons pu identifier et séquencer un peptide de 2291,50Da (Position 371-393) contenant l'R393.

En revanche, ce peptide n'a pas été trouvé dans l'AT-BD, ce qui laisse supposer qu'il a été modifié. En outre, nous avons trouvé une masse de 3602,84Da, qui correspond au peptide de 3448,84Da (Position 371-403) contenant l'R393 et l'R399, avec une masse supplémentaire de 154Da. En se basant sur la réaction entre l'arginine et la 2,3-butanedione (Fig 21), nous pensons avoir modifié les R393 et R399 de la boucle réactive, avec un ajout de masse de 86Da sur une arginine et un ajout de 68Da sur la 2ème arginine. Ainsi, l'ensemble de ces résultats sont résumés dans la figure 26.

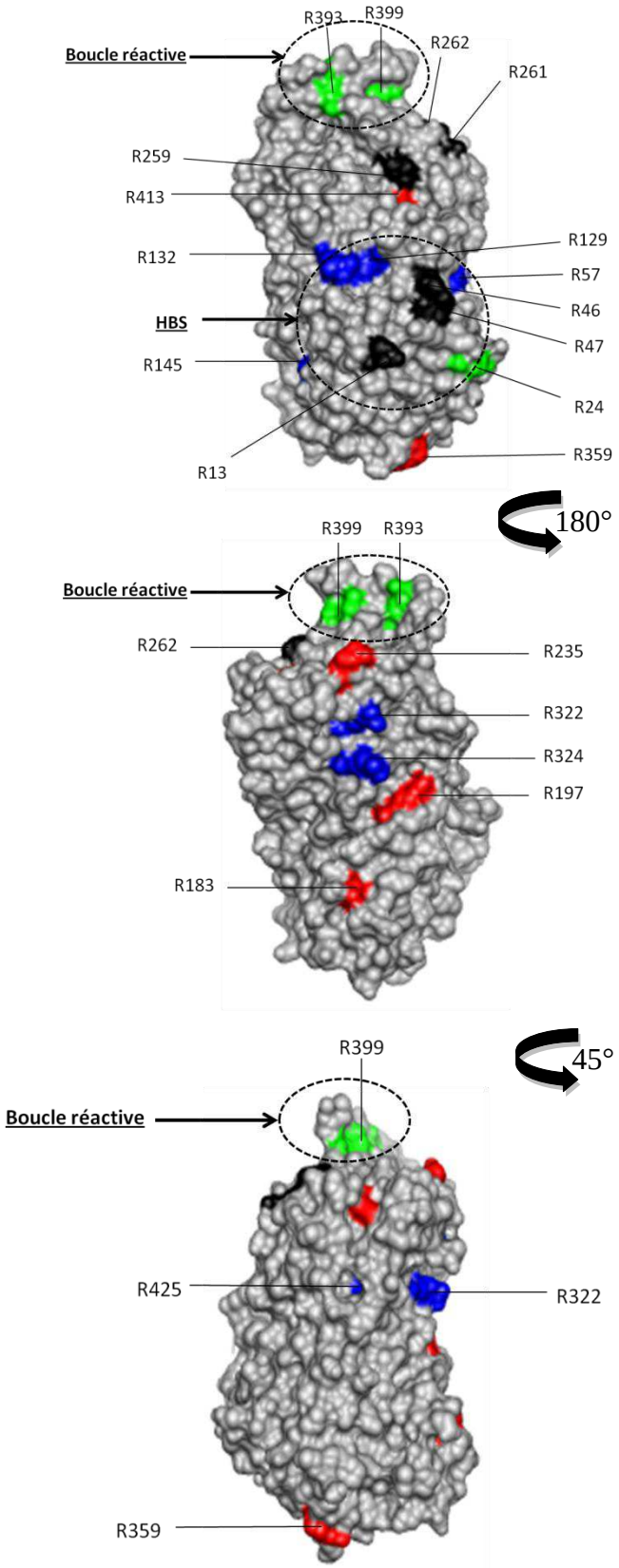


Figure 26 : Localisation des arginines modifiées par la 2,3-butanedione sur l'AT (Code pdb 1AZX). En vert : arginine modifiée. En noir : arginine non modifiée. En bleu : identifiée par MSn mais impossible de déduire si modifiée ou non. En rouge : Non identifiée sur spectrométrie de masse. Image réalisée sur UCSF Chimera

A chemically-modified inactive antithrombin as a potent antagonist of fondaparinux and heparins anticoagulant activity

Running Head: Modified antithrombin reverses heparin anticoagulants

J Fazavana *, EB Bianchini *, F Saller *, C Smadja †, V Picard *, M Taverna †, and D Borgel *,§

* Univ Paris-Sud, Laboratoire d'hématologie, EA 4531, F-92296 Châtenay-Malabry Cedex, France;

† Univ Paris-Sud, LPNSS-UMR 8612 F-92296 Châtenay-Malabry Cedex, France;

§ AP-HP, Hôpital Ambroise Paré, Service d'Hématologie et d'Immunologie, 92104 Boulogne-Billancourt, France;

Corresponding author: E. Bianchini, EA4531, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France. Phone: +33-1-46-83-53-70; Fax: +33-1-46-83-56-18; E-mail: elsabianchini@gmail.com

Total word count: 5596

Abstract word count: 266 Max

Number of tables and figures: 4

Key Words (6): antidote, antithrombin, fondaparinux, heparin, reversal, 2,3-butanedione

ABSTRACT

Background: heparin and its analogs mediating their anticoagulant activity through antithrombin (AT) activation remain largely use for preventive and curative treatment of thrombosis. The major adverse reaction of these drugs is the bleeding risk associated with overdose. Unfractionnated heparin (UFH) can be efficiently and rapidly neutralize by protamine sulfate, but this reversal neutralizes partially low molecular weight heparin (LMWH) and is inefficient to reverse fondaparinux. To secure administration of heparins analogs and counteract bleeding disorders, we previously designed a chemically modified-inactive AT as antidote to heparin derivatives.

Objectives: To get around the limited production level of recombinant AT, we propose in this study, an alternative strategy to produce a chemically modified inactive AT exhibiting increased heparin affinity as antagonist of AT mediated anticoagulant.

Methods: Plasma derived AT was chemically modified with 2,3 butanedione, a diketone known to specifically react with arginine side chain. The chemical modification was conducted in the presence of heparin to protect basic residues within heparin binding site.

Results: AT modified by butanedione and selected for its high heparin affinity (AT-BD) exhibited a 10-fold decreased anticoagulant activity and a 20-fold increased heparin affinity. AT-BD was able to neutralise anticoagulant activity of heparin derivatives in vitro and in vivo and was devoid of intrinsic anticoagulant activity as assessed by activated partial thromboplastin time assay.

Conclusions: AT-BD appears as efficient as protamine to neutralize UFH in vivo but could be more largely used since it also reverses fondaparinux and LMWH. Further

comparison between the present plasma-derived antidote and the recombinant form will have to be conducted, in particular in terms of immunogenicity, half-life or safety.

INTRODUCTION

Despite emerging of new anticoagulants such as direct factor Xa or thrombin inhibitors, heparin or its derivatives remain widely use for venous thromboembolism treatment and prophylaxis. Heparin derivatives act as antithrombin-dependant inhibitor of coagulation and include unfractionated heparins (UFH) and low molecular weight heparins (LMWH). Anticoagulant activity of fondaparinux, a synthetic analog of pentasaccharide found in UFH and LMWH, is also mediated through AT activation[1], and thus it can be considered as a heparin analog.

UFH has been the antithrombotic drug of reference until LMMW and more recently fondaparinux has become an excellent alternative to UFH. Because of its short polysaccharidic chain, fondaparinux exhibits its anticoagulant activity through FXa inhibition only. It has excellent bioavailability after subcutaneous injection, a plasma half-life of 17 hours that permits once-daily administration[1], and only three controversial cases of heparin-induced thrombocytopenia (HIT) have been reported to date[2-4]. Moreover its synthetic origin avoids “allergic-type” adverse effect due to contamination by oversulfated chondroitin sulfate as reported recently for heparin[5].

So far UFH is the drug of choice to ensure anticoagulation of blood in extracorporeal circulation device during cardiac surgery or haemodialysis since it can be rapidly and totally neutralize by protamine sulfate. The main limitation for an extensive use of fondaparinux, in particular in cardiovascular surgery, is the lack of a specific reversal agent of its anticoagulant activity. In case of severe bleeding or if patient needs to undergo an invasive procedure, the short half-life and the possibility to revert anticoagulant activity by using protamine sulfate represent an asset for the use of UFH. Protamine sulfate is the antidote of choice of UFH but neutralizes only partially

anticoagulant activity of LMWH and has no effect on fondaparinux[6]. Even if both UFH and protamine were reported to induce frequent adverse reactions such as immune response or bleeding complication[7-9], this couple of drug remains the current standard of care for anticoagulation and further neutralization during cardiopulmonary bypass since no safer and more efficacious alternative has been approved by controlled trials in patients.

Recently a recombinant variant of AT has been reported as a reversal agent of all heparin derivatives[10]. This variant is devoid of anticoagulant activity but retains a high heparin affinity and thus traps heparin analog anticoagulants in an inactive complex by competition with endogenous plasma antithrombin. The main limitation for the use of this antidote is the weak level of production of recombinant protein in eukaryotic cells compared to the high quantities required to counteract the high concentration of endogenous plasma AT. In the present work, we propose an alternative strategy allowing larger scale production of inactive AT by chemical modification of plasma-derived AT with 2,3 butanedione. This diketone, known to specifically react with arginine side chain, is naturally present in various foods including butter and alcoholic brewage, and widely used by the agro alimentary industry to mimic butter flavour in a variety of food products, in particular in microwave popcorns[11, 12].

The resulting butanedione AT (AT-BD) exhibits a decreased anticoagulant activity, tightly binds heparin analogs and thus reverses efficiently anti-FXa activity of heparin analog, including fondaparinux, in vitro and in vivo. In vivo AT-BD is as efficient as protamine sulfate to neutralize UFH but in contrast to protamine sulfate, AT-BD presents no intrinsic anticoagulant properties since when added at high concentration in a plasma pool, the activated partial thromboplastine time remains barely unchanged.

METHODS

Preparation process of AT-BD

AT-BD resulted from the modification of plasma-derived AT (Aclotine®, LFB, France) by 2,3-butanedione (Sigma Aldrich, France) in the presence of heparin on solid phase. Plasma AT, 20 ml at 3 g/L in reaction buffer (100 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7.5), was loaded on 4 serial-linked heparin-sepharose columns (Hi-trap HP 5 mL, GE Healthcare, France) equilibrated in the same buffer. Free AT was washed out with the same buffer before injection of 2,3-butanedione onto the columns (20 ml at 6.5 g/L in reaction buffer). The columns were then sealed and incubated at 37°C for 20 hours in the dark. After incubation, the columns were extensively washed with reaction buffer containing 0.8 M NaCl to remove unreacted 2,3-butanedione and low heparin affinity AT forms. The fraction containing high heparin affinity AT was finally step eluted in the same buffer containing 2M NaCl and further called AT-BD. AT-BD was concentrated by ultrafiltration on a 30kDa membrane and taken up in phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS, invitrogen). Because butanedione modify AT absorption coefficient at 280 nm, AT-BD concentration was estimated by bicinchoninic acid protein assay.

As a control, the same procedure was conducted in the absence of butanedione to prepare a control AT (cAT) incubated over night at 37°C once load onto heparin affinity columns and selected from plasma AT in the same conditions as AT-BD.

Kinetics of proteases inhibition by ATs

The second order rate constants (kon) for inhibition of FXa and thrombin (Enzyme research laboratories, Kordia) were measured in PBS containing 0.1% polyethylene glycol 8000 (PEG-8000, Fisher BioReagents, Fisher Scientific) and 0.1 % bovine serum

albumin (Calbiochem, Merck chemicals). The kon constants were estimated in the presence of a saturating concentration of fondaparinux (Arixtra®, GSK), LMWH (Enoxaparin, Lovenox®, Sanofi-Aventis) or UFH (heparin sodium, Panpharma) under pseudo first order conditions in a continuous or discontinuous assay as previously described[10]. Supplementary information is available online.

Affinity of ATs for fondaparinux

Dissociation equilibrium constants (K_D) were estimated by monitoring AT intrinsic fluorescence enhancement upon fondaparinux binding using a LS50B spectrofluorimeter (PerkinElmer Life Sciences) with excitation and emission wavelengths of 280 (slit 3) and 340 (slit 5) nm respectively, as previously described[10]. The reactions were performed in PBS containing 0.1% PEG-8000, in the presence of 100 nM AT and fondaparinux (0 to 400 nM).

Evaluation of heparin derivatives reversal properties of AT-BD in plasma

Antidote potential of AT-BD to heparin derivatives was evaluated by its ability to decrease heparin-induced anti-FXa or anti-FIIa activity using respectively Sta-Rotachrom® Heparin assay or Sta-stachrom® ATIII assay (Diagnostica-Stago) in a pool of citrated normal human plasma. Plasma was supplemented with UFH, LMWH or fondaparinux and incubated with AT-BD in PBS in a volume ration 1:1. After 5 min, anti-FXa or anti-FIIa activity was measured following manufacturer's recommendations.

AT-BD antidote activity in mice

The antidote activity of AT-BD was evaluated in Swiss female albino mice (Janvier). Animal experiments were approved by the local ethical committee and performed in accordance with the European guidelines for animal experimentation. Each mouse was first anesthetized with sodium pentobarbital administered intraperitoneally and then received fondaparinux, (0.5 mg/kg) or UFH (1200 IU/kg) by subcutaneous administration. AT-BD diluted in PBS, protamine sulphate, or placebo (PBS) was injected in the retro-orbital plexus 10 minutes (fondaparinux model) or 60 minutes (UFH model) after anticoagulant administration. Five minutes later, blood was withdrawn by *vena cava* puncture using syringes containing trisodium citrate. Plasma was obtained by immediate centrifugation for 15 minutes at 2300g, and stored at -40 °C until analysis.

Fondaparinux or UFH anticoagulant activity in mouse plasma was evaluated by measuring anti-FXa activity using the Sta-Rotachrom® heparin assay.

Activated Partial Thromboplastin time (APTT) assay

The aPTT was chosen as a global test to compare the impact of AT-BD and protamine sulfate on coagulation. A pool of normal plasma was supplemented with UFH and AT-BD or protamine sulfate, and the APTT assays were performed using Pathromtin SL (Siemens Healthcare,Germany) on a ST4 instrument (Diagnostica-Stago), according to the manufacturer's instructions. In the absence of UFH, the mean of APTTs obtained for the pool of plasma was 31.7 ± 0.7 sec. APTTs in seconds were then divided by the mean value determined on the pool of plasma to derive APTT ratios.

RESULTS

Preparation and characterization of AT-BD

Plasma purified antithrombin (pAT) was chemically modified with 2,3 butanedione, a diketone known to specifically react with arginine side chain[13], in the purpose to target reactive arginine 393 and produce an AT form with decreased anticoagulant activity. Antithrombin-butanedione (AT-BD) was prepared under conditions permitting selection of an AT conformation with high heparin affinity. On this purpose the reaction between plasma-derived AT (pAT) and 2,3 butanedione was conducted on solid phase with pAT associated with heparin sepharose beads. Once chemical modification was achieved, the fraction containing low and medium heparin affinity AT was washed out from the resin with buffer containing 0.8 M NaCl, whereas the fraction containing high heparin affinity AT was further eluted with buffer containing 2M NaCl. This later fraction was named AT-BD when pAT was treated with butanedione or control AT (cAT) when pAT was selected on heparin affinity column but not treated with butanedione. The recovery yield of AT-BD was 17 +/- 2 % of total pAT on at least three distinct experiments, whereas cAT yielded an average recovery of 4.9 +/- 0.1 %. This difference indicated that at least a fraction of initial pAT indeed reacted with the diacetyl in such a way that arginine diacetylation increased AT heparin affinity. This strongly suggested that the basic residues belonging to the heparin binding site, protected by heparin during the chemical reaction, remained unaffected by the chemical agent whereas the reactive arginine 393 may be modified. Indeed, it was largely documented that modification of P1 arginine disrupt interactions between reactive center loop and AT core and therefore favor “activated” AT state with high heparin affinity [14, 15].

To confirm the chemical modification of reactive arginine 393 by the diacetyl, anticoagulant activity of both AT-BD, cAT and pAT were estimated by measuring the second-order rate constants (k_{on}) for inhibition of FXa or thrombin in the presence of saturating concentration of fondaparinux, LMWH or UFH (figure 1). As expected, the rate constant for FXa or FIIa inhibition by AT-BD in the presence of heparinic cofactor, was significantly decreased of approximately one order of magnitude compared to inhibition by pAT. However, contrary to expectation, this loss of inhibitory activity appeared moderate in comparison to already described P1-modified AT[16, 17]. This could originate either from homogeneous Arg393 modification with mild effect, or from heterogeneous Arg393 modification with greater impact on AT anticoagulant activity. It was also found that cAT was slightly more efficient than pAT for FXa and FIIa inhibition. This surprising result may be explained by the fact that cAT was selected for its high heparin affinity from heat inactivated pAT. The cAT may thus be depleted in structurally altered conformation of AT that bound heparin loosely and were devoid of inhibitory activity[18].

To further verify that AT-BD fraction conserves its heparin binding site integrity, AT-BD and cAT were titrated by measuring intrinsic fluorescence enhancement upon fondaparinux binding. Assuming a stoechiometry AT/fondaparinux of one, the heparin binding site concentration in AT-BD preparation was 0.95 +/- 0.06 mole per mole of total protein which was comparable to the cAT sample titration (0.79 +/- 0.03 moles per mole of total protein). Moreover the internal fluorescence emission spectra (between 300 and 400 nm) of cAT and AT-BD were comparable (data not shown) indicating that chemical modification unaffected tryptophan exposition and thus the global folding of AT[19].

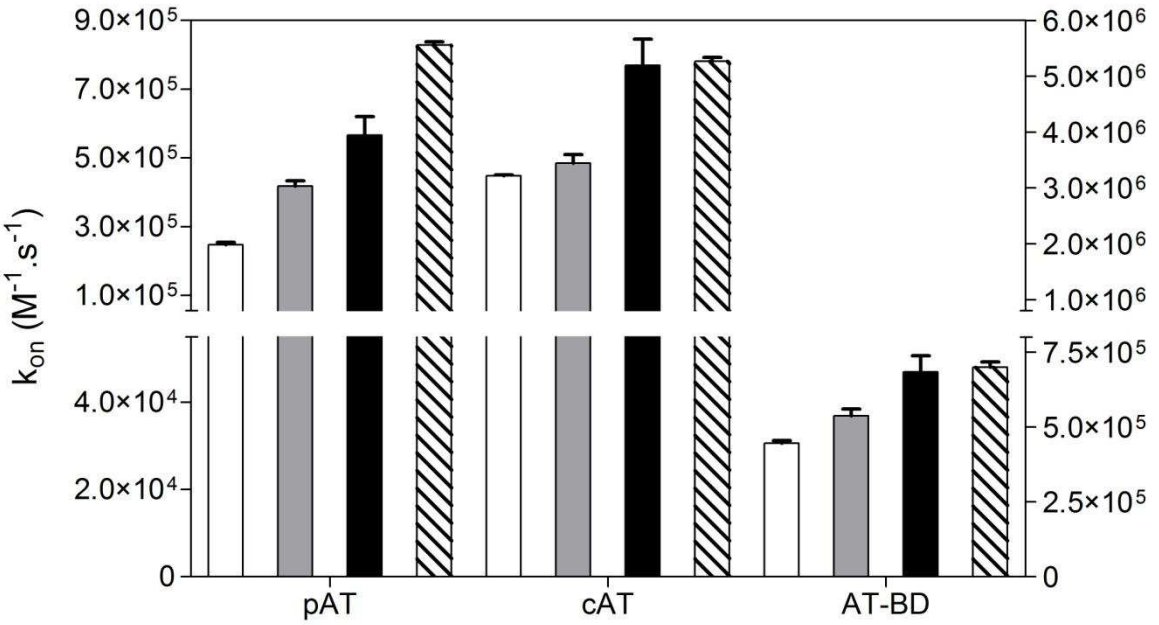


Figure 1: Second order rate constants (k_{on}) of FXa or thrombin inhibition by cAT, pAT and AT-BD in the presence of fondaparinux, LMWH or UFH. Rate constant for inhibition of FXa by AT-BD: White Bar (fondaparinux), gray (LMWH) and black (UFH). Kon values are plotted on the left axis. kon for inhibition of FIIa by AT-BD: hatched bar (UFH). Kon values are plotted on the right axis. Errors represented the SD from three or more experiments

Fluorescence titration also allowed determination of dissociation equilibrium constant (K_D) for fondaparinux binding of different AT species: K_D values of 62.6 +/- 4.3, 23.5 +/- 4.7, and 3.3 +/- 0.5 nM were obtained for pAT, cAT, and AT-BD, respectively. Both AT-BD and cAT were selected under similar conditions from pAT for their high heparin affinity, thus as expected they bound fondaparinux tighter than pAT. More surprisingly AT-BD bound fondaparinux with a K_D much lower than cAT certainly due to the modification of Arg393 by the diacetyl that relaxes constraints in reactive center loop to maintain AT-BD in a high heparin derivatives affinity conformation, whereas cAT was in equilibrium between loop partially buried native and loop exposed active form[15].

Evaluation of antidote potential of AT-BD in human plasma

At this stage AT-BD fulfilled all the conditions required for a reversal agent to fondaparinux and other heparin derivatives since it exhibited a greatly decreased anticoagulant activity associated to a major gain in heparin affinity compared to plasma AT. AT-BD was then tested for its ability to neutralize fondaparinux, LMWH, or UFH in human plasma by measuring heparin derivatives anti-FXa activity.

To mimic an overdose, fondaparinux was added to a human plasma pool at a concentration of 3 mg/L (approximately 3-fold higher than the curative concentration that ranges between 1.0 and 1.26 mg/L during treatment of venous thromboembolic disease[20]. Fondaparinux reversal efficiency of AT-BD was then evaluated by adding AT-BD at concentrations ranging between 0 and 1.5 g/L, that corresponded to 0 to 10 times the endogenous pAT concentration (assuming pAT = 0.15 g/L in human plasma pool[21]. Anti-FXa activity decreased dose-dependently with increasing concentration of AT-BD (figure 2A). At a concentration of 0.15 g/L AT-BD was able to decreased 2.2-fold anti-FXa

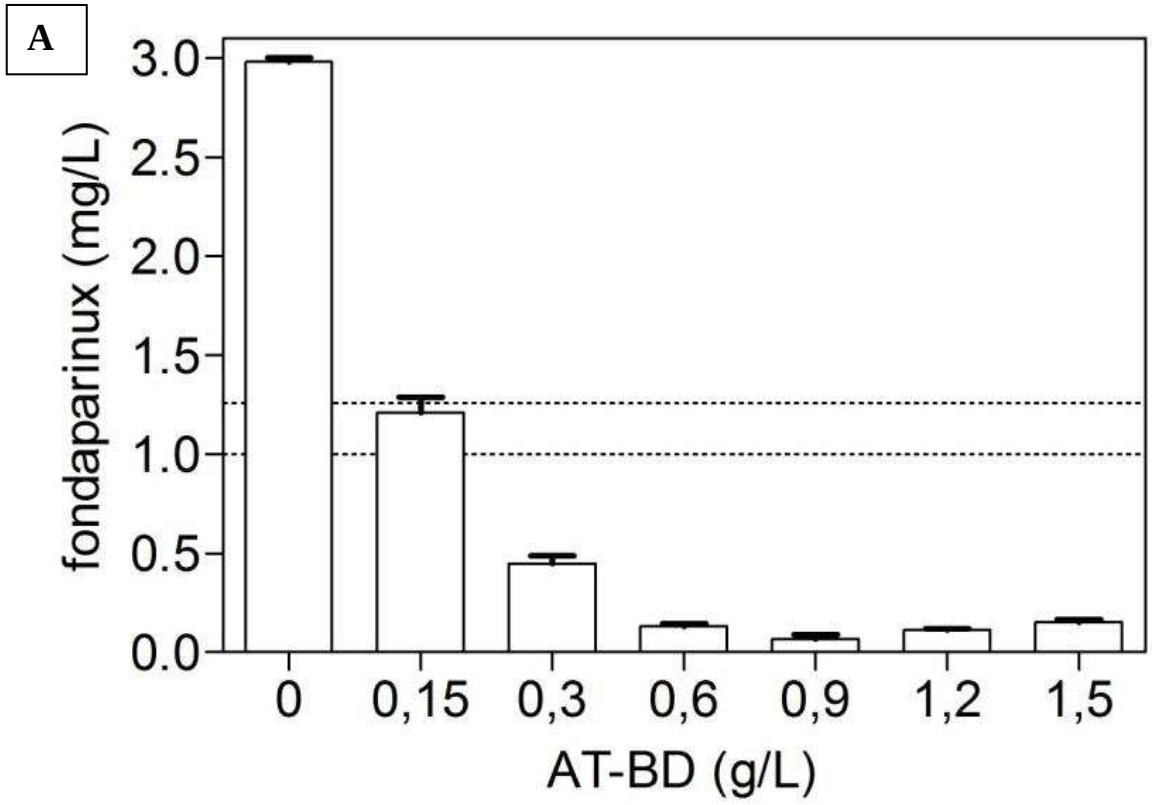


Figure 2A: Evaluation of antidote effect of AT-BD in fondaparinux overdosed plasma based on anti-FXa activity measurement. Antidote potential of AT-BD was estimated according to its ability to decrease fondaparinux -induced anti-FXa activity in plasma containing fondaparinux 3 mg/L. AT-BD was added to tested plasma at 0, 0.15, 0.30, 0.60, 1.20 and 1.50 g/L. Dashed lines indicate maximal and minimal curative concentration in humans. Errors represented the SD from three or more experiments

activity in fondaparinux overdosed plasma, which allowed to bring back the fondaparinux anticoagulant activity within the therapeutic margin. By increasing AT-BD concentrations over 0.6 g/L, anti-FXa activity in human plasma level off at approximately 5% of initial anti-FXa measured in fondaparinux overdosed plasma in the absence of modified AT. This indicated that excess of reversal up to 1.5 g/L was devoid of anticoagulant effect as assessed by anti-FXa assay.

Anticoagulant activity based on anti-FXa activity was also evaluated in plasma containing UFH and LMWs at high doses. To mimic an overdose, UFH was added to human plasma at a concentration of 1.8 U/mL and LMWHs at 3 U/mL. These concentrations correspond approximately to 3 times the maximal curative concentrations. A dose-dependent antidote activity was observed: at a concentration of 0.15 g/l AT-BD decreased heparin anticoagulant activity of 63 and 60 % in LMWH and UFH-overdosed plasma respectively (Figure 2B and 2C). Even at high concentrations, AT-DB maintained anti-FXa activity below 15% or 25% of initial anti-FXa measured in the absence of modified AT in LMWH or UFH-overdosed plasma, respectively. Thus AT-BD can efficiently reverse all heparins, decreasing a 3-fold overdose below the therapeutic concentration range, at a concentration of 0.3 g/L.

Evaluation of antidote potential of AT-BD in vivo

The efficiency of AT-BD for neutralization of heparin-like anticoagulants was evaluated *in vivo* in mice treated with fondaparinux or UFH. Ten min after subcutaneous injection of fondaparinux at 0.5 mg/kg, a bolus of AT-BD at 28 mg/kg (n=10) or PBS (n=13) was injected into the retro-orbital plexus. The dose of AT-BD was calculated to reach a concentration of 0.375 mg/ml in mice plasma assuming a total biodisponibility. The

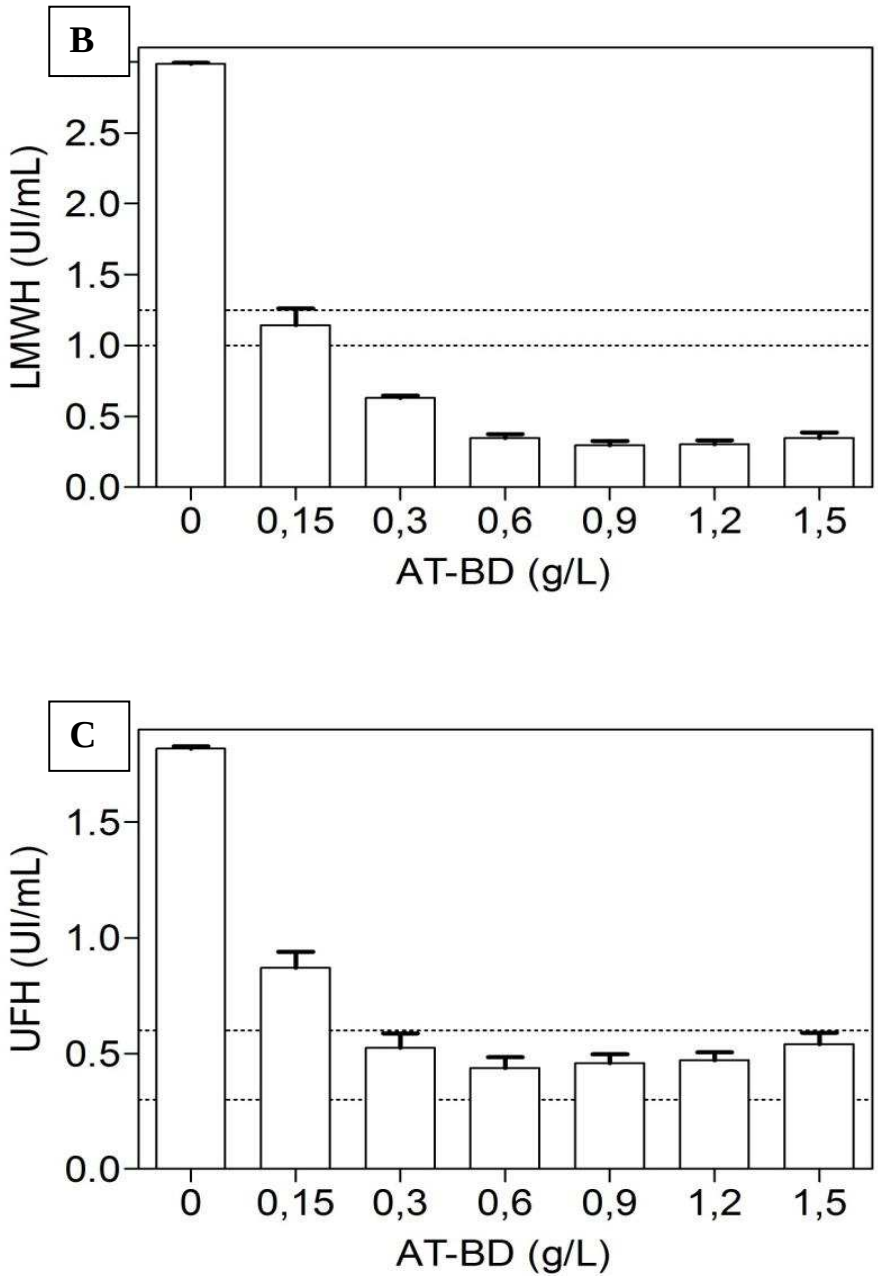


Figure 2B-C: Evaluation of antidote effect of AT-BD in heparin derivatives overdosed plasma based on anti-FXa activity measurement. Antidote potential of AT-BD was estimated according to its ability to decrease heparin-induced anti-FXa activity in plasma containing LMWH 3 U/mL (panel B) or UFH 1.8 U/mL (panel C). AT-BD was added to tested plasma at 0, 0.15, 0.30, 0.60, 1.20 and 1.50 g/L. Dashed lines indicate maximal and minimal curative concentration for each heparin derivative. Errors represented the SD from three or more experiments.

concentration of fondaparinux in mice plasma was then evaluated by measuring its anti-FXa activity and found significantly decreased from 0.77 +/-0.16 mg/L in placebo group to 0.11+/- 0.01 mg/L in AT-BD treated group (figure 3, Panel A).

To achieve the evaluation of AT-BD as antidote to heparin derivatives, its potency was compared to protamine sulfate *in vivo* in mice treated with UFH. A high dose (1200 IU/kg) of UFH was subcutaneously administered to mice. Maximal UFH concentration (C_{max}), evaluated by measuring anti-FXa activity, and time to reach maximal concentration (t_{max}) were 1.33±0.40 IU/ml and 50 min, respectively (not shown). After t_{max}, UFH concentration in mice plasma decreased slowly, and it was thus decided to inject UFH reversal 60 min after UFH administration. In the absence of antidote (placebo n = 8), the UFH concentration in mice plasma was 1.36 +/- 0.41 IU/ml. Protamine sulfate was administered at 105 AHU/kg and AT-BD at 28 mg/kg to reach a plasma concentration of protamine 1.4 UAH/ml and AT-BD 0.375 mg/ml. At these doses AT-BD and protamine resulted in comparable decrease in anti-FXa activity of 75.7 % and 76.5 %, respectively (figure 3, panel B). Finally, these results clearly demonstrate that, *in vivo*, AT-BD reversed the fondaparinux and UFH anticoagulant activity and was, as efficient as protamine sulfate to neutralize UFH

Evaluation of AT-BD in an aPTT assay

A paradoxical anticoagulant activity was reported when protamine sulfate is used in large amount upon UFH[22], this effect being detected by global tests evaluating coagulation as aPTT. We thus tested the effect of high concentrations AT-BD in human plasma in comparison to protamine sulfate in an aPTT assay in the absence of heparin. As

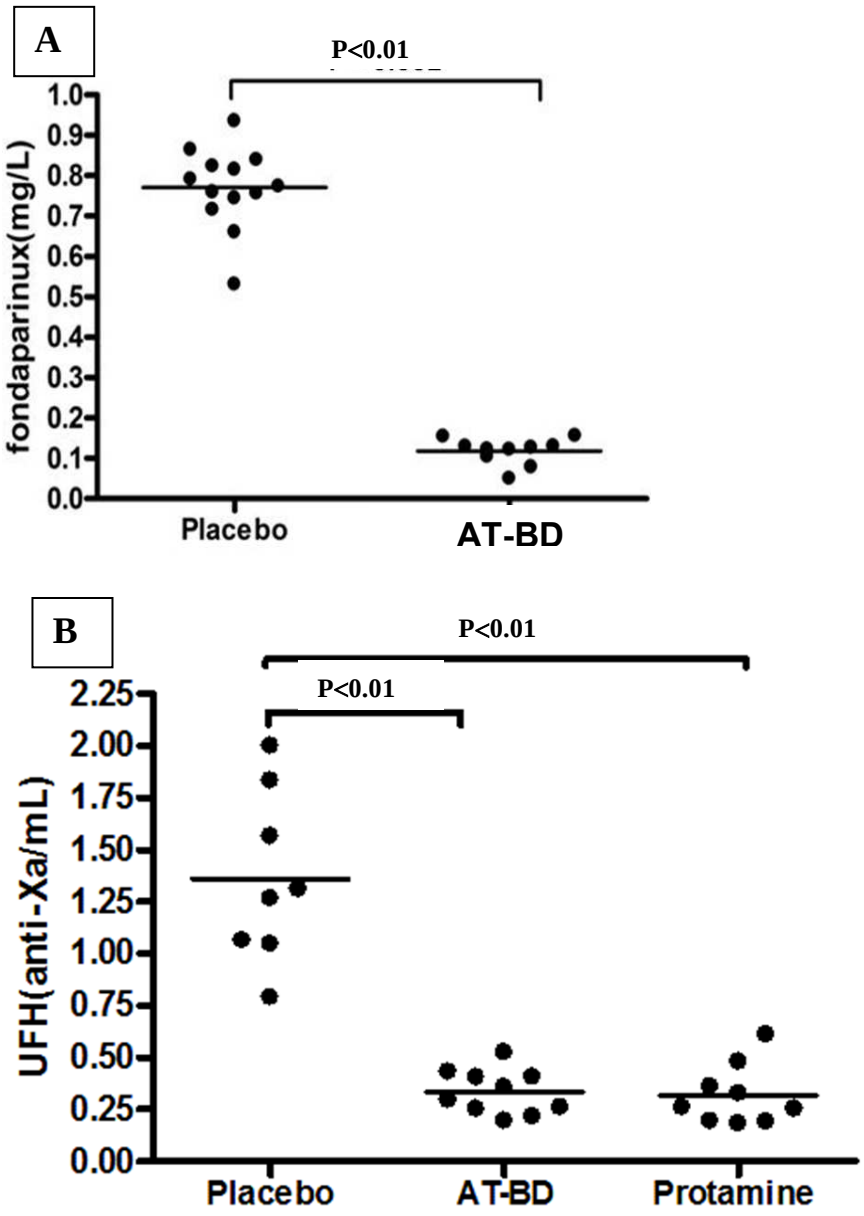


Figure 3: Evaluation of antidote effect of AT-BD in mice receiving fondaparinux or UFH. Anticoagulant activity in mice treated with fondaparinux (0.5 mg/kg) associated with AT-BD (28 mg/kg) or placebo (panel A) or in mice treated with UFH (1200 IU/kg) associated with AT-BD (28 mg/kg), protamine sulfate (105 AHU/kg) or placebo (panel B) was evaluated by measurement of anti-FXa activity as described under experimental part. Means ± SD in each group were compared by unpaired t-test and found significantly different with $p < 0.05$

previously described, addition of high doses of protamine resulted in a dose dependent increase of the aPTT ratio (figure 4A). Addition of protamine sulfate at 6 or 8 AHU/mL in heparin free plasma induced a significant elongation of clotting time, with an aPTT ratio of 1.9 ± 0.1 and 6.3 ± 0.5 respectively. Interestingly, addition of AT-BD, even at high concentrations (up to 1.2 g/L) remained devoid of anticoagulant effect in global clotting assay (figure 4B). Similar results were obtained in UFH containing plasma (1 IU/mL). At high UFH concentration aPTT ratio was obviously largely increased (10.1 ± 0.5, not shown) and normalized by addition of protamine sulfate (1.1 ± 0.01 at 4 AHU/mL, Figure 4C). However intrinsic anticoagulant properties of protamine sulfate induced a great increased of aPTT ratio when added at high concentration (aPTT ratio = 4,6 ± 0,4 at 8 AHU/mL). AT-BD was tested under the same conditions, at concentrations ranging between 0.15 and 1.2 g/L in UFH-containing plasma. None of the concentrations tested allowed total normalization of aPTT that remained slightly higher (1.6 ± 0.02 at 0.6 g/L AT-BD) than UFH-free plasma aPTT ratio (1.0 ± 0.01). However, even at high AT-BD concentrations, no rebound effect was observed (figure 4D). Taken together these results suggest that AT-BD was efficient to reverse heparins and its use may limit the risk of hemorrhage induced by the reversal itself as it was observed with protamine sulfate.

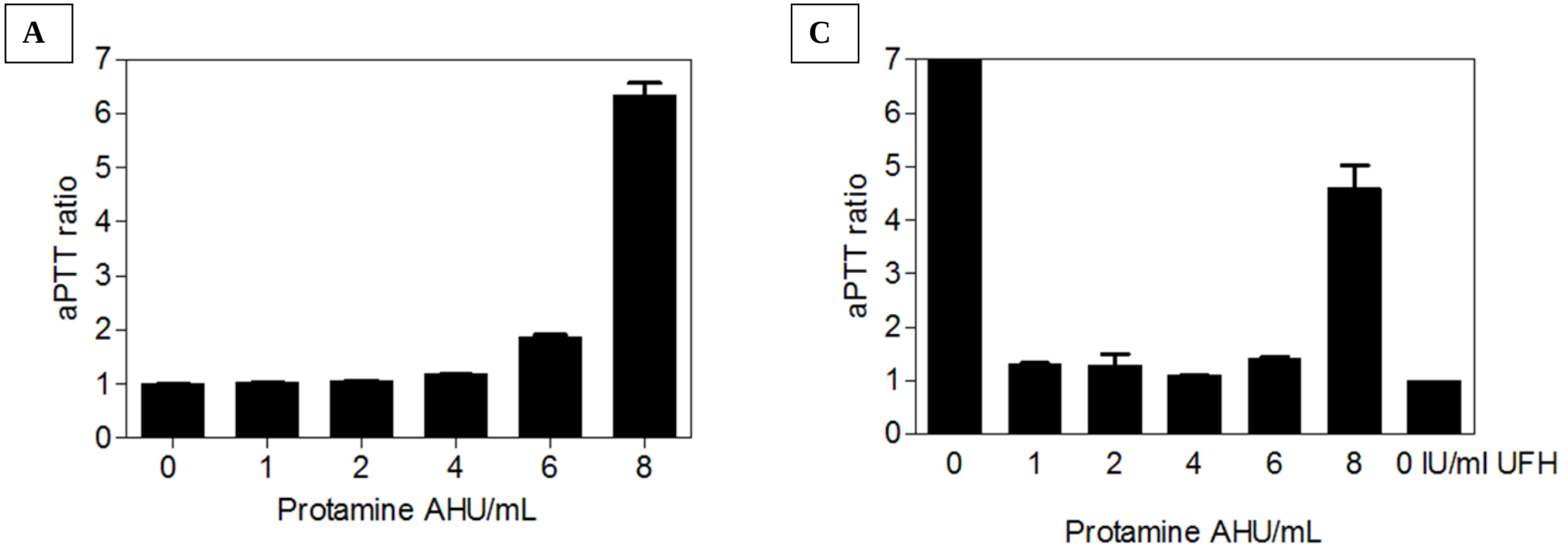


Figure 4. Evaluation of protamine sulfate in an APTT assay. The effect on coagulation of protamine sulfate (panel A and C) was compared in an APTT assay, in the absence (panel A) or in the presence of 1 IU/mL of UFH (panel C). In the absence of UFH, the mean of APTTs obtained for the pool of plasma was 31.7 ± 0.7 sec. APTT in ratio were obtained by dividing APTTs in sec by the mean value determined on the pool of plasma.

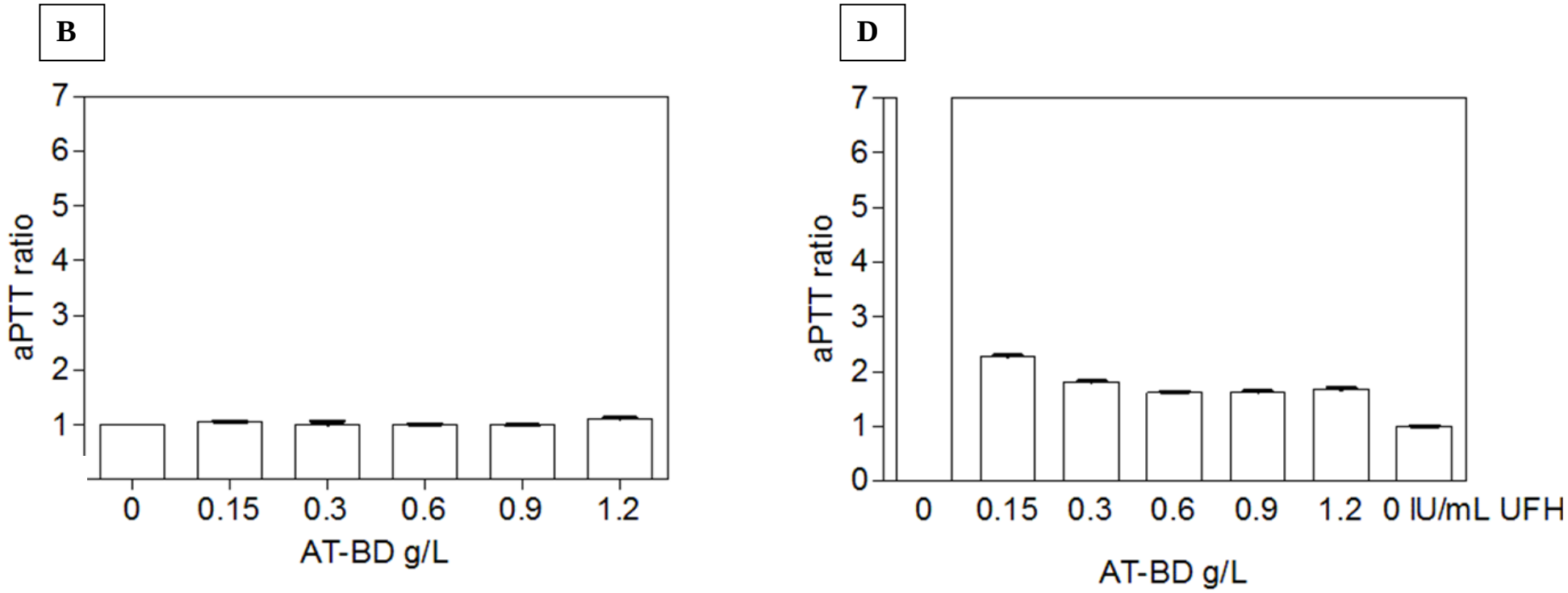


Figure 4. Evaluation of AT-BD in an APTT assay. The effect on coagulation of AT-BD (panel B and D) was compared in an APTT assay, in the absence (panel B) or in the presence of 1 IU/mL of UFH (panel D). In the absence of UFH, the mean of APTTs obtained for the pool of plasma was 31.7 ± 0.7 sec. APTT in ratio were obtained by dividing APTTs in sec by the mean value determined on the pool of plasma.

DISCUSSION

The major complication of treatment with all anticoagulants is hemorrhage[23], justifying the clinical interest for the development of efficient and specific antidotes. For heparin analogues, despite a lack of specificity and a partial efficacy, protamine sulfate is used to reverse UFH and LMWH, and no antidote active towards fondaparinux is available for clinical use. So far, in the absence of a specific antidote, recombinant FVIIa seems the most efficient strategy to reverse fondaparinux overdosing[24], although, in a recent series of 8 patients, rFVIIa was considered efficient in only 50%. Moreover, rFVIIa is a prothrombotic drug with an unspecific mechanism toward fondaparinux and, even if data from hemophilia patients suggest that it is well tolerated[25], the safety of rFVIIa use in patients receiving an anticoagulant for a prothrombotic state therapy is unknown.

We recently described the first and only antidote for fondaparinux reversal, an AT variant (AT-N135Q-Pro394)[10], and the present study report a novel strategy to produce a specific and efficient antidote to AT-dependant anticoagulants based on chemical modification of plasma-derived AT. The principle of this antidote lies on the loss of AT anticoagulant activity combined with a gain in heparin affinity to trap heparin analogs in an inactive complex by competition with plasma endogenous AT. Alteration of anticoagulant activity is achieved by selective modification of Arg residues by 2,3-butanedione, whereas enhancement of heparin affinity originate from protection of heparin binding site during chemical modification process and selection of high heparin affinity conformation during purification process. The resulting AT-BD molecule exhibits a moderate ~10-fold decrease of anticoagulant activity but a major ~20-fold increase of heparin affinity compared to endogenous plasma AT and reverses effectively fondaparinux anticoagulant activity in vitro and in vivo. Surprisingly this AT-BD reverses

fondaparinux anticoagulant activity in vitro as efficiently as the recombinant AT-N135Q-Pro394[10], that combined two point mutations resulting in a moderate 3-fold increased heparin affinity, and an almost abolished anticoagulant activity. In spite of these quite different properties in terms inhibitory activity and heparin affinity, both chemically modified and recombinant inactive AT reverse fondaparinux anticoagulant activity in vitro and in vivo with the same efficiency. Exponential decay of anti-FXa activity in fondaparinux overloaded plasma upon addition of modified AT follows very superimposable curves that level off at 3.8 % or 3.5 % of its maximal value with a half maximal effective concentration of 0.114 mg/L or 0.117 mg/L for AT-BD or AT-N135Q-Pro394, respectively. Furthermore, when administered at the same dose (28 mg/kg) in mice previously treated with fondaparinux (0.5 mg/kg), both antidotes decrease anti-FXa activity in mice plasma of 85.7 % and 85.7 % respectively. The reversal properties of AT-BD and AT-N135Q-Pro394 are also comparable toward UFH and LMWH in vitro.

This original chemical process allows to significantly increased the amount of modified AT produced, providing sufficient AT-BD for comparison to protamine sulfate in vivo but also in vitro at high doses on a plasma global coagulation test. In addition to efficacy reverses fondaparinux, our results shown that AT-BD is an efficient antidote towards UFH. Nevertheless, while protamine normalized (ratio<1.2) APTT ratio when used between 1 to 6 AHU/ml, AT-BD significantly decrease APTT ratio over 1.6 but, in vitro, never strictly normalized this coagulation test. However, in vivo in mice treated with UFH (1200 IU/kg), UFH reversal was identical for protamine and AT-BD. Given these results, in addition to secure fondaparinux use, AT-BD may be an attractive alternative to protamine sulfate for several reasons. Although catastrophic reactions to protamine remain rare, adverse effects including systemic hypotension and pulmonary hypertension

occur in 2.6% in cardiac surgery[26]. Moreover, a relation between mortality after coronary artery bypass surgery and hemodynamic protamine reaction was reported[27]. These adverse effects are related to the lack of specificity of this polycationic protein for heparin binding[28], and should not be observed with AT-BD whose mechanism of action is highly specific. However, we cannot exclude that Arg residues modified by 2,3 butanedione are immunogenic or toxic, and the potential toxicity and immunogenicity of AT-BD will have to be evaluated. A second limitation of protamine is related to a paradoxical anticoagulant effect mediated by inhibitory activities on platelets[29, 30] and on several serine proteases involved in coagulation, observed when used in excess[22, 31, 32]. This intrinsic anticoagulant effect of protamine was evidenced by different coagulation assays including APTT. Accordingly to previous reports[22], we found that addition of protamine to normal plasma results in a significant increase of the APTT ratio, in the presence or in the absence of UFH. In comparison, supplementation of normal plasma with AT-BD, even at high doses, did not induce prolongation of coagulation time as judged by APTT measurement. Thus, the therapeutic range for AT-BD use may be enlarged when compared to protamine.

In cardiovascular surgery, patients undergoing cardiopulmonary bypass receive high doses of UFH, and to ensure normal haemostasis at the end of the process, UFH must be rapidly neutralized by protamine sulfate. So far, UFH is the unique anticoagulant available for perioperative anticoagulation in cardiovascular surgery, because it is rapidly reversible with protamine. However, besides bleeding, one of the major complications associated with UFH use is HIT, an immune thrombocytopenia associated with a high risk of thrombosis frequently suspected in patients undergoing cardiopulmonary bypass. Indeed, cardiac surgery induces a strong platelet activation favoring the release of large

amount of PF4 in plasma and the formation of immune complexes with UFH, and 5% to 22% of these patients develop antibodies against the complex[33]. Even if only a few numbers will develop thromboembolic disorders, the presence of these antibodies considerably complicated the management of the anticoagulation of these patients. In this context, fondaparinux that exhibits little or no cross-reactivity with HIT antibodies, and was recently proposed to treat patients with past history of HIT[34], may be a good alternative to UFH use in cardiopulmonary bypass. The last requirement for a possible use of fondaparinux in this indication is the existence of a rapid and effective antidote able to neutralize a large excess of the drug. The development of AT-BD provides this antidote, and may open the possibility of fondaparinux use in this context favorable for the development of HIT. While several other alternative approaches such as hexadimethrine[35], PF4[36, 37], heparinase I[38], polycationic peptides[39-41], have been evaluated, they are all active towards UFH, some can partially reverse LMWH[39, 40], but none can neutralize fondaparinux allowing the evaluation of fondaparinux in cardiopulmonary bypass procedure.

Finally, besides its anticoagulant activity, antithrombin has a well-documented cytoprotective effects evaluated in particular in ischemia-reperfusion situations[42, 43]. These effects are mediated by AT binding to heparin while anticoagulant activity is not implicated[44-46]. Thereby, in addition to be an potent reversal agent for UFH at the end of cardiopulmonary bypass process, AT-BD could be beneficial as a cytoprotective agent in a situation where heart is submitted to ischemia-reperfusion deleterious effects[47]. Experiments must be conducted to confirm that AT-BD retains full cytoprotective functions.

The present study described a new molecular form of AT suitable for fondaparinux, UFH and LMW reversal. Like for other coagulation factors such as FVIII or FIX, the plasma origin of the present AT-BD may have some advantages and disadvantages, in particular in terms of immunogenicity, half life or safety, in comparison to the recombinant AT form of this antidote. In both cases, preclinical and clinical studies must be conducted to achieve development of an AT-derived antidote suitable for clinical use.

SOURCES OF FUNDING

This work was supported by research grants from FRM (Fondation pour la Recherche Médicale), OSEO and University Paris Sud. J.Fazavana received a grant from GEHT (Groupe de travail sur l'hémostase et la thrombose) and SFH (Société Française d'hématologie).

DISCLOSURES

The authors declare that they have no competing financial interests.

REFERENCES

1 Toschi V, Lettino M. Fondaparinux: pharmacology and clinical experience in cardiovascular medicine. *Mini Rev Med Chem*. 2007; **7**: 383-7.

2 Warkentin TE, Maurer BT, Aster RH. Heparin-induced thrombocytopenia associated with fondaparinux. *N Engl J Med*. 2007; **356**: 2653-5.

3 Rota E, Bazzan M, Fantino G. Fondaparinux-related thrombocytopenia in a previous low-molecular-weight heparin (LMWH)-induced heparin-induced thrombocytopenia (HIT). *Thromb Haemost*. 2008; **99**: 779-81.

4 Salem M, Elrefai S, Shrit MA, Warkentin TE. Fondaparinux thromboprophylaxis-associated heparin-induced thrombocytopenia syndrome complicated by arterial thrombotic stroke. *Thromb Haemost*. 2010; **104**: 1071-2.

5 Blossom DB, Kallen AJ, Patel PR, Elward A, Robinson L, Gao G, Langer R, Perkins KM, Jaeger JL, Kurkjian KM, Jones M, Schillie SF, Shehab N, Ketterer D, Venkataraman G, Kishimoto TK, Shriver Z, McMahon AW, Austen KF, Kozlowski S, Srinivasan A, Turabelidze G, Gould CV, Arduino MJ, Sasisekharan R. Outbreak of adverse reactions associated with contaminated heparin. *N Engl J Med*. 2008; **359**: 2674-84.

6 Warkentin TE, Crowther MA. Reversing anticoagulants both old and new. *Can J Anaesth*. 2002; **49**: S11-25.

7 Prechel M, Walenga JM. Heparin-induced thrombocytopenia: an update. *Semin Thromb Hemost*. 2012; **38**: 483-96.

8 Nybo M, Madsen JS. Serious anaphylactic reactions due to protamine sulfate: a systematic literature review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008; **103**: 192-6.

9 McLaughlin KE, Dunning J. In patients post cardiac surgery do high doses of protamine cause increased bleeding? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2003; **2**: 424-6.

10 Bianchini EP, Fazavana J, Picard V, Borgel D. Development of a recombinant antithrombin variant as a potent antidote to fondaparinux and other heparin derivatives. *Blood*. 2011; **117**: 2054-60.

11 Rigler MW, Longo WE. Emission of diacetyl (2,3 butanedione) from natural butter, microwave popcorn butter flavor powder, paste, and liquid products. *Int J Occup Environ Health*. 2010; **16**: 291-302.

12 Vanderhaegen B, Neven H, Coghe S, Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H. Bioflavoring and beer refermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003; **62**: 140-50.

13 Patthy L, Thesz J. Origin of the selectivity of alpha-dicarbonyl reagents for arginyl residues of anion-binding sites. *Eur J Biochem*. 1980; **105**: 387-93.

14 Owen MC, Beresford CH, Carrell RW. Antithrombin Glasgow, 393 Arg to His: a P1 reactive site variant with increased heparin affinity but no thrombin inhibitory activity. *FEBS Lett*. 1988; **231**: 317-20.

15 Chuang YJ, Swanson R, Raja SM, Bock SC, Olson ST. The antithrombin P1 residue is important for target proteinase specificity but not for heparin activation of the serpin. Characterization of P1 antithrombin variants with altered proteinase specificity but normal heparin activation. *Biochemistry*. 2001; **40**: 6670-9.

16 Raja SM, Chhablani N, Swanson R, Thompson E, Laffan M, Lane DA, Olson ST. Deletion of P1 arginine in a novel antithrombin variant (antithrombin London) abolishes inhibitory activity but enhances heparin affinity and is associated with early onset thrombosis. *J Biol Chem*. 2003; **278**: 13688-95.

17 Pike RN, Potempa J, Skinner R, Fitton HL, McGraw WT, Travis J, Owen M, Jin L, Carrell RW. Heparin-dependent modification of the reactive center arginine of antithrombin and consequent increase in heparin binding affinity. *J Biol Chem*. 1997; **272**: 19652-5.

18 Heger A, Grunert T, Schulz P, Josic D, Buchacher A. Separation of active and inactive forms of human antithrombin by heparin affinity chromatography. *Thromb Res*. 2002; **106**: 157-64.

19 Meagher JL, Beechem JM, Olson ST, Gettins PG. Deconvolution of the fluorescence emission spectrum of human antithrombin and identification of the tryptophan residues that are responsive to heparin binding. *J Biol Chem*. 1998; **273**: 23283-9.

20 Castellone DD, Van Cott EM. Laboratory monitoring of new anticoagulants. *Am J Hematol*. 2010; **85**: 185-7.

21 Conard J, Brosstad F, Lie Larsen M, Samama M, Abildgaard U. Molar antithrombin concentration in normal human plasma. *Haemostasis*. 1983; **13**: 363-8.

22 Ni Ainle F, Preston RJ, Jenkins PV, Nel HJ, Johnson JA, Smith OP, White B, Fallon PG, O'Donnell JS. Protamine sulfate down-regulates thrombin generation by inhibiting factor V activation. *Blood*. 2009; **114**: 1658-65.

23 Bauer KA. Reversal of antithrombotic agents. *Am J Hematol*. 2012; **87 Suppl 1**: S119-26.

24 Elmer J, Wittels KA. Emergency reversal of pentasaccharide anticoagulants: a systematic review of the literature. *Transfus Med*. 2012; **22**: 108-15. .

25 Abshire T, Kenet G. Safety update on the use of recombinant factor VIIa and the treatment of congenital and acquired deficiency of factor VIII or IX with inhibitors. *Haemophilia*. 2008; **14**: 898-902.

26 Kimmel SE, Sekeres MA, Berlin JA, Ellison N, DiSesa VJ, Strom BL. Risk factors for clinically important adverse events after protamine administration following cardiopulmonary bypass. *J Am Coll Cardiol*. 1998; **32**: 1916-22.

27 Welsby IJ, Newman MF, Phillips-Bute B, Messier RH, Kakkis ED, Stafford-Smith M. Hemodynamic changes after protamine administration: association with mortality after coronary artery bypass surgery. *Anesthesiology*. 2005; **102**: 308-14.

28 Viaro F, Dalio MB, Evora PR. Catastrophic cardiovascular adverse reactions to protamine are nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate dependent and endothelium mediated: should methylene blue be the treatment of choice? *Chest*. 2002; **122**: 1061-6.

29 Lindblad B, Wakefield TW, Whitehouse WM, Jr., Stanley JC. The effect of protamine sulfate on platelet function. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg*. 1988; **22**: 55-9.

30 Barstad RM, Stephens RW, Hamers MJ, Sakariassen KS. Protamine sulphate inhibits platelet membrane glycoprotein Ib-von Willebrand factor activity. *Thromb Haemost*. 2000; **83**: 334-7.

31 Brecher AS, Roland AR. Protamine inhibits formation of the covalent factor IXa-anti-thrombin complex. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2008; **19**: 591-6.

32 Coggin MH, Ahl R, Roland A, Beck D, Brecher AS. Protamine sulfate stimulates degradation of factor Xa and the factor Xa-antithrombin complex. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2011; **22**: 247-53.

33 Yusuf AM, Warkentin TE, Arsenault KA, Whitlock R, Eikelboom JW. Prognostic importance of preoperative anti-PF4/heparin antibodies in patients undergoing cardiac surgery. A systematic review. *Thromb Haemost*. 2012; **107**: 8-14.

34 Linkins LA, Dans AL, Moores LK, Bona R, Davidson BL, Schulman S, Crowther M. Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012; **141**: e495S-530S.

35 Cooney A, Mann TJ. Recent experiences with hexadimethrine for neutralizing heparin after cardiopulmonary bypass. *Anaesth Intensive Care*. 1999; **27**: 298-300.

36 Levy JH, Cormack JG, Morales A. Heparin neutralization by recombinant platelet factor 4 and protamine. *Anesth Analg*. 1995; **81**: 35-7.

37 Demma L, Levy JH. A Case Series of Recombinant Platelet Factor 4 for Heparin Reversal After Cardiopulmonary Bypass. *Anesth Analg*. 2012.

38 Stafford-Smith M, Lefrak EA, Qazi AG, Welsby IJ, Barber L, Hoeft A, Dorenbaum A, Mathias J, Rochon JJ, Newman MF. Efficacy and safety of heparinase I versus protamine in patients undergoing coronary artery bypass grafting with and without cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology*. 2005; **103**: 229-40.

39 DeLucia A, 3rd, Wakefield TW, Andrews PC, Nichol BJ, Kadell AM, Wrobleski SK, Downing LJ, Stanley JC. Efficacy and toxicity of differently charged polycationic protamine-like peptides for heparin anticoagulation reversal. *J Vasc Surg*. 1993; **18**: 49-58.

40 Schick BP, Maslow D, Moshinski A, San Antonio JD. Novel concatameric heparin-binding peptides reverse heparin and low-molecular-weight heparin anticoagulant activities in patient plasma in vitro and in rats in vivo. *Blood*. 2004; **103**: 1356-63.

41 Cushing DJ, Cooper WD, Cohen ML, McVoy JR, Sobel M, Harris RB. Reversal of heparin-induced increases in aPTT in the rat by PM102, a novel heparin antagonist. *Eur J Pharmacol*. 2010; **635**: 165-70.

42 Harada N, Okajima K, Uchiba M, Kushimoto S, Isobe H. Antithrombin reduces ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats by activation of cyclooxygenase-1. *Thromb Haemost*. 2004; **92**: 550-8.

43 Cuomo O, Pignataro G, Gala R, Scorziello A, Gravino E, Piazza O, Tufano R, Di Renzo G, Annunziato L. Antithrombin reduces ischemic volume, ameliorates neurologic deficits, and prolongs animal survival in both transient and permanent focal ischemia. *Stroke*. 2007; **38**: 3272-9.

44 Oelschlager C, Romisch J, Staubitz A, Stauss H, Leithauser B, Tillmanns H, Holschermann H. Antithrombin III inhibits nuclear factor kappaB activation in human monocytes and vascular endothelial cells. *Blood*. 2002; **99**: 4015-20.

45 Harada N, Okajima K, Kushimoto S, Isobe H, Tanaka K. Antithrombin reduces ischemia/reperfusion injury of rat liver by increasing the hepatic level of prostacyclin. *Blood*. 1999; **93**: 157-64.

46 Isobe H, Okajima K, Uchiba M, Harada N, Okabe H. Antithrombin prevents endotoxin-induced hypotension by inhibiting the induction of nitric oxide synthase in rats. *Blood*. 2002; **99**: 1638-45.

47 Murphy GJ, Angelini GD. Side effects of cardiopulmonary bypass: what is the reality? *J Card Surg*. 2004; **19**: 481-8.

48 Stone SR, Hofsteenge J. Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry*. 1986; **25**: 4622-8.

SUPPLEMENTARY METHODS (FOR ONLINE PUBLICATION)

Kinetics of proteases inhibition by ATs

AT-BD and cAT inhibition kinetics were initiated by addition of enzyme (2 nM) to a pre-warmed mix containing AT (20-200 nM), fondaparinux (200 nM) or UFH (1 U/ml) and chromogenic substrate (200 µM, S2238 for thrombin or S2765 for FXa, Instrumentation laboratory). Substrate hydrolysis was measured at 405 nm, and the kon values were obtained by fitting the data to the equation for slow-binding inhibition and corrected for the competition introduced by the substrate[48]. For AT-BD, kon values were estimated in a discontinuous assay in which FXa or thrombin (100 nM) were incubated with AT (5 µM) in the presence of fondaparinux (10 µM) or UFH (10 IU/ml), for a period of time ranging from 10 minutes to 24 hours. Residual FXa or thrombin activity was then measured by 20-fold dilution of the previous mixture in S2765 or S2238 (200 µM). Absorbance at 405 nm was recorded and the kon values were estimated by fitting the substrate hydrolysis initial rate curve as a function of incubation time to one phase exponential decay equation.

V- DISCUSSION ET PERSPECTIVE

La connaissance de la relation structure fonction de l'AT et du mécanisme anticoagulant des dérivés héparíniques, a permis de proposer et de développer une AT inactive comme antidote du fondaparinux sodique et plus largement de l'ensemble des anticoagulants héparíniques. En effet, ces anticoagulants possèdent un même mécanisme d'action dépendant de l'AT. Les antidotes que nous avons caractérisés sont des AT modifiées qui peuvent entrer en compétition avec l'AT plasmatique pour la liaison aux dérivés héparíniques (fondaparinux, HNF, HBPM), tout en étant dénuées d'activité anticoagulante. De telles AT pourront déplacer le dérivé héparinique lié à l'AT plasmatique d'un malade en cas de surdosage, par mécanisme de compétition.

L'objectif de ce projet était avant tout de développer un antidote pour le fondaparinux sodique. Il est le dernier agent antithrombotique de la classe des anticoagulants héparíniques mis sur le marché en 2002, et pour lequel aucun antidote n'est disponible jusqu'à ce jour.[187] Compte tenu du mécanisme d'action commun de l'ensemble des anticoagulants héparíniques, nos antidotes doivent être en outre capables de neutraliser les HBPM dont le seul antidote connu actuellement est le sulfate de protamine, qui n'est que partiellement efficace (≈ 60%).[164] Enfin, les antidotes que nous avons développés, ont aussi été testés vis à vis des HNF. En effet, même si le sulfate de protamine neutralise totalement les HNF,[185] l'existence d'un nouvel antidote pourrait constituer une alternative intéressante à ce produit peu maniable. L'utilisation du sulfate de protamine est associée à de nombreux effets secondaires comme un risque hémorragique lié à son activité anticoagulante intrinsèque,[173] des réactions allergiques[180] ou encore des complications hypotensives.[226]

Pour préparer une AT inactive, mais qui a conservé sa capacité de liaison à l'héparine, nous avons procédé à deux approches, une approche recombinante et une approche chimique.

Le premier objectif était d'obtenir une AT dépourvue d'activité anticoagulante. On sait depuis les années 80 que l'R393 de l'AT est le site d'interaction de l'AT aux protéases de la coagulation.[52] Ainsi, des variants naturels d'AT mutés au niveau de l'R393 (P1 variant) ont une activité inhibitrice diminuée.[81] On sait par ailleurs qu'il existe une sélectivité entre le site catalytique des sérine-protéases (Position S1-S1') et le site de clivage (Position P1-P1') au niveau de leur substrat. Ces enzymes clivent préférentiellement en extrémité C-terminale d'une arginine en P1.[72,227] En revanche, cette sélectivité est compromise quand le résidu en P1' est une Proline.[210]

En se basant sur ces connaissances, nous avons eu un large choix pour concevoir une AT inactive recombinante. En première intention, trois variants ont été envisagés et préparés. Il s'agit de variants portant :

- la substitution de l'arginine 393 en histidine, équivalent à un variant naturel avec une perte d'activité anticoagulante modérée (R393H);[67]

- la délétion du site de clivage P1-P1' (delR393-S394). Malheureusement, ce variant recombinant s'est avéré présenter une mauvaise affinité à l'héparine, et il n'a donc pas été étudié de façon plus approfondie ;

- et l'insertion d'une proline entre les résidus P1 et P1' du site de clivage (Pro394) : c'est ce variant qui a été caractérisé pour ses propriétés antidotes, et est décrit dans le 1er article de ce mémoire.

C'est cette même région, et en particulier l'arginine 393 qui a été ciblée, et que nous avons tenté de modifier préférentiellement dans le cadre de l'approche chimique. En effet, dans les années 70 et 80, les α-dicarbonyles ont permis d'étudier le rôle des arginines dans le cadre d'études relation structure-fonction de diverses protéines, dont l'AT.[79,212,213] Après avoir testé différents α-dicarbonyles, nous avons choisi de travailler avec la 2,3-butanedione qui a donné les meilleurs résultats quantitatifs et qualitatifs en termes d'AT modifiée.

L'idéal est de pouvoir modifier l'R393, site actif de l'AT, sans toucher les 21 autres arginines de l'AT, et en particulier les arginines essentielles à l'interaction à l'héparine (R13 ; R24 ; R46 ; R47 ; R129). C'est pour cette raison que nous avons mis en place un protocole expérimental de modification chimique ménagée de l'AT en phase semi-solide. L'immobilisation de l'AT sur une colonne d'héparine permet de protéger les arginines indispensables à l'interaction à l'héparine par encombrement stérique, mais aussi d'activer l'AT, et donc d'exposer l'R393, augmentant ainsi son accessibilité au réactif chimique. Ce même procédé a été utilisé par une équipe, qui a procédé à la citrullination des arginines de l'AT par l'enzyme Peptidyl-arginyl-deiminase (PAD), en présence d'héparine. Dans cette étude, l'R393 de l'AT ainsi liée à l'héparine, a été la première à être modifiée par le PAD.[228]

En se basant sur la littérature, nous nous attendions donc à une diminution considérable de la propriété inhibitrice du variant AT-N135Q-Pro394, et une diminution plus modeste de l'activité anticoagulante de l'AT-BD. C'est ce qui a été observé lors de la caractérisation des deux formes d'AT modifiées.

Ainsi, le variant AT-N135Q-Pro394 a une capacité inhibitrice négligeable, comme nous l'espérions, de moins de 0,02% des propriétés anti-Xa et anti-IIa de l'AT plasmatique en présence de dérivé héparinique. Ces résultats sont en accord avec la description d'un variant d'AT exprimé chez les COS-1, sur lequel la sérine 394 est substituée par une proline (AT-Pro394). Effectivement, ce variant possède une propriété anti-IIa en présence d'héparine moins de 0,05%.[69]

La diminution des propriétés inhibitrices de l'AT-BD est, elle, beaucoup plus modeste. En effet, elle inhibe 8 à 11 fois plus lente le FXa et la thrombine en présence de dérivé héparinique, ce qui représente environ 8,8% à 12,4% d'activité anti-Xa et anti-IIa, comparée à l'AT plasmatique. Rosenberg et Damus en 1973 ont montré que l'AT traitée par la 2,3-butanedione, en présence d'héparine pendant 16 heures, conserve 12% de l'activité anti-IIa en présence d'héparine,[79] c'est-à-dire un ralentissement de l'inhibition du FIIa approximativement d'un facteur 8, similaire à ce que nous avons observé avec l'AT-BD. Cette perte d'activité anticoagulante modérée est donc cohérente avec la littérature et peut s'expliquer de différentes façons :

- l'R393 pourrait n'être que partiellement modifiée par le réactif chimique. Ainsi notre AT-BD serait hétérogène et contiendrait une partie d'AT non modifiée au niveau du résidu P1 et donc toujours active. Pour essayer d'étayer cette hypothèse, nous avons traité la préparation d'AT-BD par de la thrombine greffée sur une résine afin de capturer l'AT qui serait non modifiée en P1. Les premiers essais réalisés montrent que l'AT-BD traitée (AT-BD*) inhibe le FXa en présence de dérivé héparinique, 3 à 4 fois plus lent, comparée à l'AT-BD initiale, suggérant effectivement la présence d'une petite fraction d'AT non modifiée ;

- une seconde hypothèse serait que la modification de l'R393 par la 2,3-butanedione est totale, mais que la nature structurale de l'R393 modifiée n'affecte pas d'une manière dramatique l'activité inhibitrice de l'AT. En spectrométrie de masse, nous avons trouvé et pu séquencer le peptide contenant l'R393 après double digestion (Endoprotéase Asp-N et trypsine) de l'AT non modifiée. Par contre, ce peptide n'a pas été trouvé dans l'AT-BD, ce qui laisse penser que l'R393 est peut-être totalement modifiée, et que la trypsine ne peut plus cliver en C-terminal de l'R393, ce qui expliquerait pourquoi nous ne trouvons pas le peptide avec R393 ;

- puis, il est probable que ces deux hypothèses expliquent à elles, la perte d'activité de l'AT-BD modeste observée.

Pour améliorer l'efficacité d'inactivation de l'AT, nous pourrions soit travailler les conditions d'incubation avec la BD pour que la modification soit moins ménagée, notamment en utilisant du borate, qui est connu accélérer la modification,[213] avec le risque cependant d'augmenter le nombre d'arginines modifiées (autres que R393) sur l'AT, soit inclure une étape de déplétion de la forme résiduelle active par passage sur une résine de thrombine en fin de

purification. Une dernière possibilité serait de modifier l'R393 par voie enzymatique et non chimique comme l'ont fait l'équipe de Javier Corral, sachant que la citrullination de l'R393 par le PAD en présence d'HBPM permet de réduire l'activité anti-Xa en présence d'héparine à ≈ 1%,[228] c'est-à-dire une diminution de la constante cinétique d'inhibition d'un facteur 100, comparée à l'AT plasmatique.

Le second objectif était de conserver, voire d'augmenter l'affinité à l'héparine des deux formes d'AT modifiées.

L'absence de chaîne glycane sur l'N135 de l'AT, site consensus de glycosylation, produit la β-glycoforme d'AT plasmatique, qui possède une affinité meilleure, comparée à la forme d'AT totalement glycosylée.[45] Sur la base de cette observation Turko et collaborateurs ont substitué l'N135 par une glutamine (N135Q), et ainsi produit une AT recombinante analogue de la β-glycoforme de haute affinité à l'héparine (25 fois meilleure, comparée à l'AT plasmatique).[229] Le second avantage de la suppression de ce site de glycosylation était de limiter l'hétérogénéité de la glycosylation des AT recombinantes, exprimées dans les systèmes eucaryotes (Système baculovirus ; CHO ; BHK).[211,229,230] Ainsi, la mutation Pro394 a été associée à une suppression d'un site de glycosylation (AT-N135Q-Pro394).

La présence d'une mutation en position P1 de l'AT (R393) peut, en outre, avoir un impact sur liaison à l'héparine. Ainsi, de nombreux variants naturels touchants le résidu P1 de l'AT ont une affinité à l'héparine augmentée.[67,68,87] C'est le cas de variants comme l'AT Glasgow (R393H) ; AT Pescara (R393P), ou AT London (DelR393) qui ont une affinité à l'héparine améliorée au moins d'un facteur 2 à 3, comparés à l'ATwt. De façon comparable, la citrunillation de l'R393 par l'enzyme PAD permet d'obtenir une AT modifiée avec une affinité au pentasaccharide quatre fois meilleure.[87] En fait, cette augmentation de l'affinité à l'héparine est due à la rupture de la liaison ionique entre l'R393 et l'E255, exposant partiellement la boucle réactive, et met l'AT dans une conformation partiellement activée, qui a une affinité meilleure à l'héparine.[78]. Il était donc légitime d'espérer une augmentation de l'affinité à l'héparine du même ordre après modification de l'R393 de l'AT par la 2,3-butanedione.

Le gain d'affinité (d'un facteur 3 environ) obtenu avec le variant AT-N135Q-Pro394 en comparaison à l'AT plasmatique, s'est finalement avéré assez modeste par rapport à ce que nous attendions (Au moins facteur 10 environ).[211,229] En revanche, de façon étonnante, l'AT modifiée chimiquement possède une affinité à l'héparine 18 fois meilleure que l'AT plasmatique.

Dans l'approche chimique, ce gain important d'affinité à l'héparine peut s'expliquer. En fait, dans les conditions de préparation de l'AT-BD, nous avons certainement modifié l'R393 P1 des formes beta d'AT, ce qui a augmenté leur affinité à l'héparine, qui est déjà au départ, supérieure à celle des formes alpha. D'un autre côté, des formes alpha d'AT ont été également touchées au niveau du résidu P1, dont la conséquence est l'amélioration de leur affinité vis à vis de l'héparine. Ainsi, l'ensemble de ces formes d'AT, non seulement enrichies en forme beta de haute affinité à l'héparine à cause du process de purification, mais aussi modifiées en P1 donc améliorées en affinité, expliquent ce gain d'affinité.

Concernant l'AT-N135Q-Pro393, plusieurs hypothèses permettent d'expliquer le gain modeste d'affinité pour le pentasaccharide observé. Ainsi, dans la littérature, la β-glycoforme plasmatique ou recombinante de l'AT est sélectionnée sur une colonne d'héparine, à une concentration en NaCl supérieure à 1,2M.[229,231] Dans notre étude, les faibles rendements de production et de purification obtenus pour le variant AT-N135Q-Pro394 nous ont contraints à éluer à 0,8M de NaCl afin d'obtenir une AT recombinante dont l'affinité pour l'héparine serait au moins égale à celle de l'AT plasmatique,. Nous avons donc certainement, sélectionné un mélange hétérogène d'AT, enrichi en forme de moyenne affinité à l'héparine, ce qui peut expliquer le modeste gain d'affinité à l'héparine des variants AT-N135Q, et AT-N135Q-Pro394, comparé à ce qui avait été décrit dans la littérature.

Le système d'expression utilisé peut aussi avoir contribué à ce faible gain d'affinité. En effet, la β-glycoforme recombinante de l'AT (AT-N135Q) exprimée chez les BHK possède des chaînes glycanes riches en résidu fucose. Or, la fucosylation de la chaîne glycane de l'N155 réduit considérablement l'affinité de l'AT à l'héparine.[230,232] Plusieurs protéines exprimées chez les HEK293 (Erythropoïétine ; Protéine C ; L-sélectine) sont fortement fucosylées.[233-235] Donc, il est possible que nos variants AT-N135Q et AT-N135Q-Pro394 possèdent des chaînes glycanes fortement fucosylées, notamment sur l'N155, ce qui diminuerait globalement leur affinité à l'héparine.

Enfin, on ne peut pas exclure non plus que l'insertion d'une Proline en position 394 peut altérer la conformation de la RCL avec un résultat global délétère en termes d'affinité à l'héparine. Cependant dans l'étude de Stephens et al., le variant recombinant d'AT avec une insertion de Proline en position 394 a conservé la même affinité à l'héparine que l'ATwt.[69]

Même si les deux formes d'AT avaient finalement des caractéristiques assez différentes en termes d'activité anticoagulante et d'affinité à l'héparine, elles se sont finalement avérées très comparables quant à leur activité antidote *in vitro*.

Nous avons choisi de doser l'activité anti-Xa afin d'évaluer la capacité des AT modifiées inactives à diminuer, voire à neutraliser la concentration en dérivés héparíniques dans le plasma. Ce test a été choisi puisque c'est le test utilisé en biologie médicale pour la surveillance biologique du traitement par l'ensemble des anticoagulants héparíniques (fondaparinux, HBPM, et HNF). Nous avons montré que sur du plasma humain contenant trois fois la concentration thérapeutique en dérivés héparíniques chez l'homme, les deux AT modifiées (AT-N135Q-Pro394 et AT-BD) sont capables de neutraliser aussi bien le fondaparinux que les HBPM, et les HNF, de façon dose-dépendante.

La neutralisation des anticoagulants héparíniques est très comparable avec les deux AT, et ce, malgré des activités anti-Xa et anti-IIa résiduelles très différentes entre l'AT-BD (perte d'un facteur ≈ 10) et le variant AT-N135Q-Pro394 (perte supérieure à un facteur 5000).

En fait, dans notre test d'activité anti-Xa ou anti-IIa, nous mesurons la vitesse d'inhibition du FXa ou du FIIa par l'AT. Cette vitesse d'inhibition est proportionnelle à la concentration en AT, et à la constante cinétique d'inhibition de l'enzyme.

Dans le cas de l'AT-N135Q-Pro394, ses kon vis-à-vis du FXa ou FIIa sont très basses que même si on se met largement en excès en concentration d'AT-N135Q-Pro394, sa vitesse d'inhibition (activité anti-Xa ou anti-IIa) sera trop lente, ce qui fait que dans le plasma, ce variant d'AT capture les molécules de dérivé héparinique liées à l'AT plasmatique, sans pour autant montrer une activité inhibitrice mesurable, même à des fortes concentrations. Ainsi, les molécules de dérivé héparinique liées au variant d'AT vont être inactivées.

Dans le cas de l'AT-BD, même si elle n'a qu'une diminution modérée (facteur 10) des constantes cinétiques d'inhibition en présence d'héparines, jusqu'à une concentration équivalente à dix fois celle de l'AT plasmatique (1,5 $g.L^{-1}$), sa vitesse d'inhibition des enzymes reste négligeable, ce qui fait qu'en capturant les molécules de fondaparinux et HBPM dans du plasma, elle neutralise, comme pour le variant AT-N135Q-Pro394, leur activité anticoagulante. Cela dit en présence d'HNF, nous avons observé que la constante cinétique d'inhibition de l'AT-BD est légèrement plus élevée, comparée à celle en présence de fondaparinux. Donc, nous pensons qu'en augmentant la concentration en AT-BD, sa vitesse d'inhibition des enzymes va de plus en plus s'accélerer, ce qui fait qu'à des fortes concentrations, elle gardera une activité anti-Xa ou anti-IIa résiduelle qui va s'ajouter à celle de l'AT plasmatique. En conséquence, cela va limiter son efficacité comme antidote des HNF, et ce qui explique d'ailleurs pourquoi nous n'arrivons pas à neutraliser entièrement l'HNF, même à une concentration de 1,5 $g.L^{-1}$ d'AT-BD. Dans tous les cas, pour les concentrations en anticoagulants héparíniques testées, l'AT-BD permet de diminuer

ces concentrations dans la zone thérapeutique chez l'homme (HNF), voire en dessous (fondaparinux et HBPM).

Alors, particulièrement avec l'AT-BD, peut-être moins avec l'AT-N135Q-Pro394, on peut imaginer que l'efficacité de ces AT comme antidote dépendra aussi du niveau du surdosage en anticoagulants héparíniques. Jusque-là, les essais ont été réalisés dans des conditions de surdosage en dérivés héparíniques de l'ordre de trois fois la concentration thérapeutique, sachant que ces taux sont rarement atteints lors d'une utilisation normale de ces médicaments, même si de très rares cas de surdosages accidentels sévères ont été rapportés avec les HBPM (jusqu'à 15UI anti-Xa.mL^{-1})[236,237]. A côté de ces surdosages accidentels un surdosage volontaire en HNF est réalisé en pratique courante en chirurgie vasculaire ou en chirurgie cardiaque au cours des processus de circulation extracorporelle (CEC) où les taux atteints sont compris entre 4-5UI.mL^{-1}[238]. Donc, il serait intéressant de tester l'efficacité de ces 2 AT modifiées dans ces conditions de concentration.

Depuis la mise sur le marché du fondaparinux, de nombreux cas de surdosage ont été décrits dans la littérature.[239,240] En France, des études de pharmacovigilance réalisées par l'Afssaps (Actuellement ANSM), ont rapporté également plusieurs cas de surdosage au fondaparinux pendant la période 2005-2007.[209] Ainsi, en 2007, l'Afssaps a envoyé une lettre aux prescripteurs pour leur recommander la bonne utilisation du fondaparinux, en particulier pour les patients présentant un risque hémorragique important (patients âgés, insuffisants rénaux, patients de faible poids corporel <50kg).

Actuellement, il n'y a pas d'antidote actif vis à vis du fondaparinux. La possibilité de reverser le fondaparinux par du FVIIa recombinant a été étudiée *in vitro* et même quelques cas ont été rapportés chez l'homme.[186,190,191] L'utilisation de concentré de complexe prothrombinique (PCC) a aussi permis de reverser l'effet anticoagulant du fondaparinux chez un modèle de lapin.[192] Mais, reverser un surdosage en fondaparinux par des facteurs procoagulants non spécifiques chez des patients, qui souffrent de troubles thrombotiques, est une stratégie à risque.[190] Il serait d'ailleurs intéressant de comparer l'impact de ces différentes approches, FVIIa, PCC, AT-BD ou l'AT-N135Q-Pro394 de façon plus approfondie, en utilisant des tests qui explorent la coagulation de façon globale, comme dans un test de génération de thrombine.

Contrairement à l'AT-BD et l'AT-N135Q-Pro394, le sulfate de protamine s'est avéré inefficace vis à vis du fondaparinux, et seulement partiellement actif vis à vis des HBPM comme cela avait déjà été décrit.[169] Ainsi, 1UAH.mL^{-1} de sulfate de protamine permet de neutraliser ≈ 0,65UI anti-Xa.mL^{-1}. Concernant les HNF, nous n'avons pas pu tester des concentrations élevées en variant AT-N135Q-Pro394, mais l'AT-BD est aussi efficace que le sulfate de protamine.

Outre des réactions allergiques et hémodynamiques potentiellement sévères,[180,226] l'un des effets secondaires majeurs lié à l'utilisation du sulfate de protamine est lié à son activité anticoagulante intrinsèque, expliquant en partie les effets anticoagulants rebonds observés après neutralisation de l'HNF en clinique.[241] Ainsi, sur un test de temps de céphaline activée (TCA), le sulfate de protamine montre une activité anticoagulante intrinsèque attendue à 8 UAH.mL^{-1}, alors que l'AT-BD n'a aucun effet anticoagulant significatif à des doses allant jusqu'à 1,2 g.L^{-1}, soit huit fois la concentration plasmatique de l'AT. Le même résultat a été observé en présence d'1UI.mL^{-1} d'HNF, montrant une absence d'effet rebond lié à l'utilisation de l'AT-BD contrairement au sulfate de protamine. Malheureusement, les concentrations obtenues en AT-N135Q-Pro394 ne nous ont pas permis de la tester à de fortes concentrations en TCA. Mais, étant donné l'absence d'activité résiduelle de ce variant d'AT, et son mode d'action hautement spécifique, il est tout à fait probable qu'elle soit totalement dénuée d'effet sur un test TCA.

Enfin, les propriétés antidotes de ces deux AT modifiées ont enfin été évaluées *in vivo*, dans un modèle murin. Nous avons choisi de travailler sur des souris de très petite taille (20 g environ) car nous ne disposions pas de quantité suffisante d'AT, surtout pour l'AT-N-135Q-Pro394, pour faire des essais chez un animal de plus grande taille. L'AT murine qui circule dans le plasma à environ 140µg.mL^{-1},[242] a une homologie de séquence de 89% avec l'AT humaine, et elle inhibe les FXa et IIa humains aussi bien que l'AT humaine.[243-245] Par ailleurs, l'AT murine lie bien l'héparine, et que les héparan-sulfates sont aussi présents à la surface vasculaire des souris.[246]

Etant donné la forte affinité pour l'héparine de l'AT-BD, et dans une moindre mesure de l'AT-N135Q-Pro394, il était envisageable qu'*in vivo*, ces AT modifiées soient capturées par les héparan-sulfates à la surface vasculaire, ce qui aurait pu affecter leur efficacité.

En outre, vu l'absence de données pharmacocinétiques sur le fondaparinux chez la souris, nous avons réalisé quelques essais préliminaires afin de déterminer les conditions optimales d'administration du fondaparinux et des antidotes. Dix minutes après administration sous-cutanée d'une dose équivalente à cinq fois la dose thérapeutique chez l'homme,[247] nous détectons une Cmax d'environ 0,9mg.L^{-1}. Après administration des AT inactives (variant AT-N135Q-Pro394 et AT-BD) par voie retro-orbitale, une concentration plasmatique de 375µg.mL^{-1} ou l'équivalent de 2,5 fois la concentration de l'AT plasmatique murine neutralise d'une manière similaire la concentration plasmatique en fondaparinux (≈ 85%). Ces résultats sont cohérents avec l'effet antidote du variant AT-N135Q-Pro394 et de l'AT-BD observé *in vitro* où 300µg.mL^{-1} d'AT inactives neutralisent environ 80% de la concentration de fondaparinux. Encore une fois, la grande

différence de propriété inhibitrice des deux AT modifiées n'affecte pas leur efficacité en tant qu'antidote.

Concernant les HNF, nous avons administré par voie sous cutanée de la Calciparine à des doses de 800 et 1200UI/kg. A ces doses, les Cmax obtenues étaient respectivement de 0,35UI.mL^{-1} et 1,4UI.mL^{-1}, après 1 heure, ce qui est comparable à ce qu'a obtenu l'équipe de Renyu Ding. En effet, en administrant par voie IV une dose de 800UI/kg d'HNF chez la souris, 0,5UI.mL^{-1} d'HNF sont retrouvées dans le plasma après 30 minutes.[248] La dose de 1200UI/kg de Calciparine a été retenue dans la suite de l'étude. Nous avons comparé l'efficacité de l'AT-BD et du sulfate de protamine à neutraliser la Calciparine. De façon similaire, une concentration plasmatique de 1,4UAH.mL^{-1} de sulfate de protamine, et de 375µg.mL^{-1} (soit 2,5 fois la concentration d'AT plasmatique) d'AT-BD neutralise ≈ 79% de la concentration en Calciparine dans le plasma, ce qui est cohérent avec ce qui est observé *in vitro*.

Ainsi, en plus d'être les premiers antidotes décrits pour neutraliser le fondaparinux, nos AT modifiées pourront constituer une alternative séduisante au sulfate de protamine peu maniable utilisé jusqu'à présent dans les surdosages accidentels ou volontaires en HNF. L'existence d'un antidote spécifique au fondaparinux permettrait non seulement de sécuriser son utilisation thérapeutique, mais aussi de développer davantage l'utilisation de cet agent antithrombotique pour mieux étudier ses éventuels avantages, notamment une éventuelle utilisation dans les procédures de circulation extracorporelle.

Le principe de compétition sur lequel est basé l'effet antidote des deux AT modifiées développées dans le cadre de ce travail, nécessite l'administration de quantité importante de protéine pour atteindre des concentrations au moins deux fois plus supérieures aux taux d'AT plasmatique : C'est ce que nous avons observé lors des essais chez la souris. Le choix du mode de production de ces deux formes d'AT est donc essentiel pour le développement d'un produit utilisable en thérapeutique.

L'AT modifiée génétiquement a été exprimée chez une lignée cellulaire humaine : « HEK293 », en espérant une meilleure glycosylation de l'AT, comparée aux AT exprimées dans les autres systèmes décrits (COS1, CHO, BHK).[232,249,250] Le niveau d'expression obtenu pour l'AT recombinante est de l'ordre de 1mg.L^{-1}, et c'est assez comparable à ce qui est décrit pour l'AT recombinante.[251,252] Cela dit, une optimisation du niveau d'expression de notre système en HEK293 est certes envisageable, mais ne permettra en aucun cas d'atteindre des niveaux de production compatible avec une utilisation en thérapeutique. Un système de production alternatif comme des animaux transgéniques devra être envisagé. De façon très intéressante, l'AT est la

première protéine transgénique à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché et utilisée en thérapeutique. Il s'agit de l'Atryn® qui est produite chez des chèvres transgéniques avec un niveau d'expression plus de $1 g.L^{-1}$.[253] La quantité d'AT produite a été un point critique pour la caractérisation de l'AT inactive comme antidote. L'AT recombinante produite a été purifiée par trois étapes de méthodes chromatographiques, et le rendement global de purification était de seulement ≈ 10-13%. Nous avons donc dû partir d'environ 10L de milieu conditionné pour obtenir 1mg de protéine purifiée, et pour cette approche, la quantité d'AT recombinante produite a été un réel facteur limitant pour la caractérisation de ces propriétés antidotes, notamment dans le modèle murin que nous avons mis en place.

Dans le cas de l'approche chimique, nous récupérons ≈ 15% de l'AT chargée initialement. Toutefois, l'avantage de cette approche est la facilité du processus expérimental, qui demande moins de temps de réalisation (Deux jours de préparation au lieu de deux semaines pour l'approche recombinante). A l'échelle d'une étude académique, comme la nôtre, le facteur limitant de cette approche est la disponibilité de l'AT plasmatique, point de départ de la préparation. Si nous partons d'un flacon de concentré d'AT plasmatique (Aclotine®, LFB) contenant ≈ 150mg d'AT, nous pouvons obtenir facilement 22,5mg d'AT inactivée, une quantité que l'on peut laborieusement obtenir avec l'approche recombinante.

Comme pour d'autres facteurs de la coagulation, l'origine plasmatique ou recombinante des AT antidotes peut présenter des avantages ou des inconvénients. La forme recombinante sera dépourvue du risque infectieux lié à l'administration de produits dérivés du sang et elle aura une demi-vie beaucoup plus courte que celle dérivée de l'AT plasmatique.[254] En termes d'immunogénicité dans les 2 cas, les choses sont difficilement prédictibles. En effet, nous ne pouvons pas exclure que la présence de 2 mutations, sur la forme recombinante soit à l'origine d'une réaction immunitaire. De même, les arginines modifiées par la butanedione pourraient constituer des motifs antigéniques responsables d'une immunisation. L'immunogénicité de deux formes d'AT devra être étudiée.

Pour conclure, ce travail de thèse a donc permis de valider l'utilisation d'une AT modifiée inactive, soit obtenue par génie génétique, soit obtenue par voie chimique, comme antidote spécifique de tous les anticoagulants héparíniques (fondaparinux, HBPM, HNF). Mais comme toutes les molécules candidates pour devenir médicament, une caractérisation pharmacologique,

immunologique, et toxicologique sera indispensable pour aller plus loin dans le développement de ces antidotes.

VI- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Dahlback B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. J Intern Med. 2005;257:209-223.
2. Ruf W, Rehemtulla A, Morrissey JH, Edgington TS. Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function. J Biol Chem. 1991;266:16256.
3. Eigenbrot C, Kirchhofer D. New insight into how tissue factor allosterically regulates factor VIIa. Trends Cardiovasc Med. 2002;12:19-26.
4. Yamamoto M, Nakagaki T, Kisiel W. Tissue factor-dependent autoactivation of human blood coagulation factor VII. J Biol Chem. 1992;267:19089-19094.
5. Mann KG, Brummel-Ziedins K, Orfeo T, Butenas S. Models of blood coagulation. Blood Cells Mol Dis. 2006;36:108-117.
6. Gailani D, Broze GJ, Jr. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. Science. 1991;253:909-912.
7. Monroe DM, Key NS. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. J Thromb Haemost. 2007;5:1097-1105.
8. Maroney SA, Ellery PE, Mast AE. Alternatively spliced isoforms of tissue factor pathway inhibitor. Thromb Res. 2010;125 Suppl 1:S52-56.
9. Lindahl AK, Jacobsen PB, Sandset PM, Abildgaard U. Tissue factor pathway inhibitor with high anticoagulant activity is increased in post-heparin plasma and in plasma from cancer patients. Blood Coagul Fibrinolysis. 1991;2:713-721.
10. Dahlback B, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25:1311-1320.
11. Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R, et al. Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. Nature. 2000;404:518-525.
12. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:10212-10216.
13. Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. Blood. 2004;103:1192-1201.
14. Jalbert LR, Rosen ED, Moons L, et al. Inactivation of the gene for anticoagulant protein C causes lethal perinatal consumptive coagulopathy in mice. J Clin Invest. 1998;102:1481-1488.
15. Rosenberg RD. Thrombomodulin gene disruption and mutation in mice. Thromb Haemost. 1997;78:705-709.
16. Weiler H, Isermann BH. Thrombomodulin. J Thromb Haemost. 2003;1:1515-1524.
17. Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. J Thromb Haemost. 2007;5 Suppl 1:102-115.
18. Weitz JI. Heparan sulfate: antithrombotic or not? J Clin Invest. 2003;111:952-954.
19. Marcum JA, Fritze L, Galli SJ, Karp G, Rosenberg RD. Microvascular heparin-like species with anticoagulant activity. Am J Physiol. 1983;245:H725-733.
20. Shworak NW, Kobayashi T, de Agostini A, Smits NC. Anticoagulant heparan sulfate to not clot--or not? Prog Mol Biol Transl Sci. 2010;93:153-178.
21. Shworak NW, HajMohammadi S, de Agostini AI, Rosenberg RD. Mice deficient in heparan sulfate 3-O-sulfotransferase-1: normal hemostasis with unexpected perinatal phenotypes. Glycoconj J. 2002;19:355-361.
22. O'Reilly MS, Pirie-Shepherd S, Lane WS, Folkman J. Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. Science. 1999;285:1926-1928.
23. Wiedermann Ch J, Romisch J. The anti-inflammatory actions of antithrombin--a review. Acta Med Austriaca. 2002;29:89-92.
24. Conard J, Brosstad F, Lie Larsen M, Samama M, Abildgaard U. Molar antithrombin concentration in normal human plasma. Haemostasis. 1983;13:363-368.
25. Wada H, Usui M, Sakuragawa N. Hemostatic abnormalities and liver diseases. Semin Thromb Hemost. 2008;34:772-778.

26. Fair DS, Bahnak BR. Human hepatoma cells secrete single chain factor X, prothrombin, and antithrombin III. Blood. 1984;64:194-204.
27. Kasuda S, Tatsumi K, Sakurai Y, et al. Expression of coagulation factors from murine induced pluripotent stem cell-derived liver cells. Blood Coagul Fibrinolysis;22:271-279.
28. Leon M, Aiach M, Guennec JY, et al. Antithrombin III in rat hepatocytes. Thromb Res. 1982;28:115-123.
29. Deschepper CF, Bigornia V, Berens ME, Lapointe MC. Production of thrombin and antithrombin III by brain and astroglial cell cultures. Brain Res Mol Brain Res. 1991;11:355-358.
30. Lee AK, Chan V, Chan TK. The identification and localization of antithrombin III in human tissues. Thromb Res. 1979;14:209-217.
31. Alhenc-Gelas ML, Aiach M, Gorenflot A, Andreaux JP. Antithrombin III antigen in human platelets. Thromb Haemost. 1985;54:599-602.
32. Johnson JV, Lowell J, Badger GJ, Rosing J, Tchaikovski S, Cushman M. Effects of oral and transdermal hormonal contraception on vascular risk markers: a randomized controlled trial. Obstet Gynecol. 2008;111:278-284.
33. Niessen RW, Pfaffendorf BA, Sturk A, et al. The influence of insulin, beta-estradiol, dexamethasone and thyroid hormone on the secretion of coagulant and anticoagulant proteins by HepG2 cells. Thromb Haemost. 1995;74:686-692.
34. Niessen RW, Rezaee F, Reitsma PH, Peters M, de Vijlder JJ, Sturk A. Ligand-dependent enhancement of human antithrombin gene expression by retinoid X receptor alpha and thyroid hormone receptor beta. Biochem J. 1996;318 (Pt 1):263-270.
35. Thompson EA, Bishop DT. Alternative explanations for normal variability in antithrombin-III levels. Ann Hum Biol. 1985;12:339-344.
36. Zhu T, Ding Q, Bai X, et al. Normal ranges and genetic variants of antithrombin, protein C and protein S in the general Chinese population. Results of the Chinese Hemostasis Investigation on Natural Anticoagulants Study I Group. Haematologica. 2011;96:1033-1040.
37. Carlson TH, Simon TL, Atencio AC. In vivo behavior of human radioiodinated antithrombin III: distribution among three physiologic pools. Blood. 1985;66:13-19.
38. Knot EA, de Jong E, ten Cate JW, et al. Purified radiolabeled antithrombin III metabolism in three families with hereditary AT III deficiency: application of a three-compartment model. Blood. 1986;67:93-98.
39. Marciniak E, Romond EH. Catabolism and distribution of functionally heterogeneous human antithrombin III. J Lab Clin Med. 1987;109:89-96.
40. Wells MJ, Sheffield WP, Blajchman MA. The clearance of thrombin-antithrombin and related serpin-enzyme complexes from the circulation: role of various hepatocyte receptors. Thromb Haemost. 1999;81:325-337.
41. Kounnas MZ, Church FC, Argraves WS, Strickland DK. Cellular internalization and degradation of antithrombin III-thrombin, heparin cofactor II-thrombin, and alpha 1-antitrypsin-trypsin complexes is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein. J Biol Chem. 1996;271:6523-6529.
42. de Boer HC, Preissner KT, Bouma BN, de Groot PG. Internalization of vitronectin-thrombin-antithrombin complex by endothelial cells leads to deposition of the complex into the subendothelial matrix. J Biol Chem. 1995;270:30733-30740.
43. Law RH, Zhang Q, McGowan S, et al. An overview of the serpin superfamily. Genome Biol. 2006;7:216.
44. van Gent D, Sharp P, Morgan K, Kalsheker N. Serpins: structure, function and molecular evolution. Int J Biochem Cell Biol. 2003;35:1536-1547.
45. Peterson CB, Blackburn MN. Isolation and characterization of an antithrombin III variant with reduced carbohydrate content and enhanced heparin binding. J Biol Chem. 1985;260:610-615.
46. Franzen LE, Svensson S, Larm O. Structural studies on the carbohydrate portion of human antithrombin III. J Biol Chem. 1980;255:5090-5093.
47. Picard V, Ersdal-Badju E, Bock SC. Partial glycosylation of antithrombin III asparagine-135 is caused by the serine in the third position of its N-glycosylation consensus sequence and is responsible for

production of the beta-antithrombin III isoform with enhanced heparin affinity. Biochemistry. 1995;34:8433-8440.
48. Plematl A, Demelbauer UM, Josic D, Rizzi A. Determination of the site-specific and isoform-specific glycosylation in human plasma-derived antithrombin by IEF and capillary HPLC-ESI-MS/MS. Proteomics. 2005;5:4025-4033.
49. Leone G, Valori VM, Cotumaccio R, Massi G. Human antithrombin III heterogeneity: a study by isoelectrofocusing and crossed immunoelectrofocusing. Haemostasis. 1983;13:369-373.
50. Zhou W, Ross MM, Tessitore A, et al. An initial characterization of the serum phosphoproteome. J Proteome Res. 2009;8:5523-5531.
51. Carrell RW, Stein PE, Fermi G, Wardell MR. Biological implications of a 3 A structure of dimeric antithrombin. Structure. 1994;2:257-270.
52. Bjork I, Jackson CM, Jornvall H, Lavine KK, Nordling K, Salsgiver WJ. The active site of antithrombin. Release of the same proteolytically cleaved form of the inhibitor from complexes with factor IXa, factor Xa, and thrombin. J Biol Chem. 1982;257:2406-2411.
53. Wardell MR, Chang WS, Bruce D, Skinner R, Lesk AM, Carrell RW. Preparative induction and characterization of L-antithrombin: a structural homologue of latent plasminogen activator inhibitor-1. Biochemistry. 1997;36:13133-13142.
54. Chang WS, Harper PL. Commercial antithrombin concentrate contains inactive L-forms of antithrombin. Thromb Haemost. 1997;77:323-328.
55. Karlsson G, Winge S. Separation of latent, prelatent, and native forms of human antithrombin by heparin affinity high-performance liquid chromatography. Protein Expr Purif. 2004;33:339-345.
56. Beauchamp NJ, Pike RN, Daly M, et al. Antithrombins Wibble and Wobble (T85M/K): archetypal conformational diseases with in vivo latent-transition, thrombosis, and heparin activation. Blood. 1998;92:2696-2706.
57. O'Reilly MS. Antiangiogenic antithrombin. Semin Thromb Hemost. 2007;33:660-666.
58. Bruce D, Perry DJ, Borg JY, Carrell RW, Wardell MR. Thromboembolic disease due to thermolabile conformational changes of antithrombin Rouen-VI (187 Asn-->Asp). J Clin Invest. 1994;94:2265-2274.
59. Gooptu B, Lomas DA. Conformational pathology of the serpins: themes, variations, and therapeutic strategies. Annu Rev Biochem. 2009;78:147-176.
60. Huntington JA, Yamasaki M. Serpin polymerization in vitro. Methods Enzymol. 2011;501:379-420.
61. Whisstock JC, Silverman GA, Bird PI, et al. Serpins flex their muscle: II. Structural insights into target peptidase recognition, polymerization, and transport functions. J Biol Chem. 2010;285:24307-24312.
62. Yamasaki M, Li W, Johnson DJ, Huntington JA. Crystal structure of a stable dimer reveals the molecular basis of serpin polymerization. Nature. 2008;455:1255-1258.
63. Patston PA, Gettins PG, Schapira M. Serpins are suicide substrates: implications for the regulation of proteolytic pathways. Semin Thromb Hemost. 1994;20:410-416.
64. Hedstrom L. An overview of serine proteases. Curr Protoc Protein Sci. 2002;Chapter 21:Unit 21 10.
65. Stratikos E, Gettins PG. Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 A and full insertion of the reactive center loop into beta-sheet A. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:4808-4813.
66. Olson ST. Heparin and ionic strength-dependent conversion of antithrombin III from an inhibitor to a substrate of alpha-thrombin. J Biol Chem. 1985;260:10153-10160.
67. Owen MC, George PM, Lane DA, Boswell DR. P1 variant antithrombins Glasgow (393 Arg to His) and Pescara (393 Arg to Pro) have increased heparin affinity and are resistant to catalytic cleavage by elastase. Implications for the heparin activation mechanism. FEBS Lett. 1991;280:216-220.
68. Raja SM, Chhablani N, Swanson R, et al. Deletion of P1 arginine in a novel antithrombin variant (antithrombin London) abolishes inhibitory activity but enhances heparin affinity and is associated with early onset thrombosis. J Biol Chem. 2003;278:13688-13695.
69. Stephens AW, Siddiqui A, Hirs CH. Site-directed mutagenesis of the reactive center (serine 394) of antithrombin III. J Biol Chem. 1988;263:15849-15852.

70. Olson ST, Stephens AW, Hirs CH, Bock PE, Bjork I. Kinetic characterization of the proteinase binding defect in a reactive site variant of the serpin, antithrombin. Role of the P1' residue in transition-state stabilization of antithrombin-proteinase complex formation. J Biol Chem. 1995;270:9717-9724.
71. Theunissen HJ, Dijkema R, Grootenhuis PD, et al. Dissociation of heparin-dependent thrombin and factor Xa inhibitory activities of antithrombin-III by mutations in the reactive site. J Biol Chem. 1993;268:9035-9040.
72. Bianchini EP, Louvain VB, Marque PE, Juliano MA, Juliano L, Le Bonniec BF. Mapping of the catalytic groove preferences of factor Xa reveals an inadequate selectivity for its macromolecule substrates. J Biol Chem. 2002;277:20527-20534.
73. Sheffield WP, Blajchman MA. Site-directed mutagenesis of the P2 residue of human antithrombin. FEBS Lett. 1994;339:147-150.
74. Yang L, Qureshi SH, Manithody C, Rezaie AR. Role of P2 glycine in determining the specificity of antithrombin reaction with coagulation proteases. Biochem Biophys Res Commun. 2009;389:162-167.
75. Futamura A, Gettins PG. Serine 380 (P14) --> glutamate mutation activates antithrombin as an inhibitor of factor Xa. J Biol Chem. 2000;275:4092-4098.
76. Huntington JA, McCoy A, Belzar KJ, Pei XY, Gettins PG, Carrell RW. The conformational activation of antithrombin. A 2.85-A structure of a fluorescein derivative reveals an electrostatic link between the hinge and heparin binding regions. J Biol Chem. 2000;275:15377-15383.
77. Langdown J, Belzar KJ, Savory WJ, Baglin TP, Huntington JA. The critical role of hinge-region expulsion in the induced-fit heparin binding mechanism of antithrombin. J Mol Biol. 2009;386:1278-1289.
78. Jairajpuri MA, Lu A, Bock SC. Elimination of P1 arginine 393 interaction with underlying glutamic acid 255 partially activates antithrombin III for thrombin inhibition but not factor Xa inhibition. J Biol Chem. 2002;277:24460-24465.
79. Rosenberg RD, Damus PS. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. J Biol Chem. 1973;248:6490-6505.
80. Liu CS, Chang JY. The heparin binding site of human antithrombin III. Selective chemical modification at Lys114, Lys125, and Lys287 impairs its heparin cofactor activity. J Biol Chem. 1987;262:17356-17361.
81. Lane DA, Bayston T, Olds RJ, et al. Antithrombin mutation database: 2nd (1997) update. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Thromb Haemost. 1997;77:197-211.
82. Ersdal-Badju E, Lu A, Zuo Y, Picard V, Bock SC. Identification of the antithrombin III heparin binding site. J Biol Chem. 1997;272:19393-19400.
83. Desai UR, Petitou M, Bjork I, Olson ST. Mechanism of heparin activation of antithrombin. Role of individual residues of the pentasaccharide activating sequence in the recognition of native and activated states of antithrombin. J Biol Chem. 1998;273:7478-7487.
84. Jin L, Abrahams JP, Skinner R, Petitou M, Pike RN, Carrell RW. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:14683-14688.
85. Meagher JL, Beechem JM, Olson ST, Gettins PG. Deconvolution of the fluorescence emission spectrum of human antithrombin and identification of the tryptophan residues that are responsive to heparin binding. J Biol Chem. 1998;273:23283-23289.
86. Olson ST, Richard B, Izaguirre G, Schedin-Weiss S, Gettins PG. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. Biochimie. 2010;92:1587-1596.
87. Pike RN, Potempa J, Skinner R, et al. Heparin-dependent modification of the reactive center arginine of antithrombin and consequent increase in heparin binding affinity. J Biol Chem. 1997;272:19652-19655.
88. Izaguirre G, Olson ST. Residues Tyr253 and Glu255 in strand 3 of beta-sheet C of antithrombin are key determinants of an exosite made accessible by heparin activation to promote rapid inhibition of factors Xa and IXa. J Biol Chem. 2006;281:13424-13432.
89. Chuang YJ, Swanson R, Raja SM, Olson ST. Heparin enhances the specificity of antithrombin for thrombin and factor Xa independent of the reactive center loop sequence. Evidence for an exosite

determinant of factor Xa specificity in heparin-activated antithrombin. J Biol Chem. 2001;276:14961-14971.
90. Izaguirre G, Zhang W, Swanson R, Bedsted T, Olson ST. Localization of an antithrombin exosite that promotes rapid inhibition of factors Xa and IXa dependent on heparin activation of the serpin. J Biol Chem. 2003;278:51433-51440.
91. Izaguirre G, Swanson R, Raja SM, Rezaie AR, Olson ST. Mechanism by which exosites promote the inhibition of blood coagulation proteases by heparin-activated antithrombin. J Biol Chem. 2007;282:33609-33622.
92. Izaguirre G, Rezaie AR, Olson ST. Engineering functional antithrombin exosites in alpha1-proteinase inhibitor that specifically promote the inhibition of factor Xa and factor IXa. J Biol Chem. 2009;284:1550-1558.
93. Gettins PG, Olson ST. Activation of antithrombin as a factor IXa and Xa inhibitor involves mitigation of repression rather than positive enhancement. FEBS Lett. 2009;583:3397-3400.
94. Johnson DJ, Li W, Adams TE, Huntington JA. Antithrombin-S195A factor Xa-heparin structure reveals the allosteric mechanism of antithrombin activation. Embo J. 2006;25:2029-2037.
95. Johnson DJ, Langdown J, Huntington JA. Molecular basis of factor IXa recognition by heparin-activated antithrombin revealed by a 1.7-A structure of the ternary complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:645-650.
96. Olson ST, Swanson R, Raub-Segall E, et al. Accelerating ability of synthetic oligosaccharides on antithrombin inhibition of proteinases of the clotting and fibrinolytic systems. Comparison with heparin and low-molecular-weight heparin. Thromb Haemost. 2004;92:929-939.
97. Li W, Johnson DJ, Esmon CT, Huntington JA. Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. Nat Struct Mol Biol. 2004;11:857-862.
98. Rezaie AR. Heparin-binding exosite of factor Xa. Trends Cardiovasc Med. 2000;10:333-338.
99. Egeberg O. Thrombophilia Caused by Inheritable Deficiency of Blood Antithrombin. Scand J Clin Lab Invest. 1965;17:92.
100. Trayvor Bayston DL. Antithrombin Mutation Database: Department of haematology, Imperial college london.
101. Okajima K, Ueyama H, Hashimoto Y, et al. Homozygous variant of antithrombin III that lacks affinity for heparin, AT III Kumamoto. Thromb Haemost. 1989;61:20-24.
102. Bauters A, Zawadzki C, Bura A, et al. Homozygous variant of antithrombin with lack of affinity for heparin: management of severe thrombotic complications associated with intrauterine fetal demise. Blood Coagul Fibrinolysis. 1996;7:705-710.
103. Corral J, Hernandez-Espinosa D, Soria JM, et al. Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. Blood. 2007;109:4258-4263.
104. Hirsh J, Anand SS, Halperin JL, Fuster V. Guide to anticoagulant therapy: Heparin : a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Circulation. 2001;103:2994-3018.
105. Jorgensen L, Rowsell HC, Hovig T, Mustard JF. Resolution and organization of platelet-rich mural thrombi in carotid arteries of swine. Am J Pathol. 1967;51:681-719.
106. Richardson PD, Davies MJ, Born GV. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. Lancet. 1989;2:941-944.
107. Bagot CN, Arya R. Virchow and his triad: a question of attribution. Br J Haematol. 2008;143:180-190.
108. Bovill EG, van der Vliet A. Venous valvular stasis-associated hypoxia and thrombosis: what is the link? Annu Rev Physiol. 2011;73:527-545.
109. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. Circulation;125:e2-e220.
110. Heit JA. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008;28:370-372.
111. Benard E, Lafuma A, Ravaud P. [Epidemiology of venous thromboembolic disease]. Presse Med. 2005;34:415-419.

112. Gustafsson D, Bylund R, Antonsson T, et al. A new oral anticoagulant: the 50-year challenge. Nat Rev Drug Discov. 2004;3:649-659.
113. Kearon C, Kahn SR, Agnelli G, Goldhaber S, Raskob GE, Comerota AJ. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). Chest. 2008;133:454S-545S.
114. Marcum JA. The origin of the dispute over the discovery of heparin. J Hist Med Allied Sci. 2000;55:37-66.
115. Rabenstein DL. Heparin and heparan sulfate: structure and function. Nat Prod Rep. 2002;19:312-331.
116. Choay J. Une nouvelle approche de la chimie de l'héparine et de ses fragments: structure et synthèse Angéiologie. 1986;38:132-132.
117. Casu B. Heparin structure. Haemostasis. 1990;20 Suppl 1:62-73.
118. Samama M, Babinet-Berthier A. [The new heparins]. J Mal Vasc. 1992;17:91-106.
119. Petitou M, Casu B, Lindahl U. 1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site. Biochimie. 2003;85:83-89.
120. Mousa SA. Heparin and low-molecular weight heparins in thrombosis and beyond. Methods Mol Biol. 2010;663:109-132.
121. Hirsh J, Raschke R. Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. Chest. 2004;126:188S-203S.
122. O'Keeffe D, Olson ST, Gasiunas N, Gallagher J, Baglin TP, Huntington JA. The heparin binding properties of heparin cofactor II suggest an antithrombin-like activation mechanism. J Biol Chem. 2004;279:50267-50273.
123. Streusand VJ, Bjork I, Gettins PG, Petitou M, Olson ST. Mechanism of acceleration of antithrombin-proteinase reactions by low affinity heparin. Role of the antithrombin binding pentasaccharide in heparin rate enhancement. J Biol Chem. 1995;270:9043-9051.
124. Maimone MM, Tollefsen DM. Activation of heparin cofactor II by heparin oligosaccharides. Biochem Biophys Res Commun. 1988;152:1056-1061.
125. Arbit E, Goldberg M, Gomez-Orellana I, Majuru S. Oral heparin: status review. Thromb J. 2006;4:6.
126. Hull RD, Raskob GE, Hirsh J, et al. Continuous intravenous heparin compared with intermittent subcutaneous heparin in the initial treatment of proximal-vein thrombosis. N Engl J Med. 1986;315:1109-1114.
127. Dawes J, Papper DS. Catabolism of low-dose heparin in man. Thromb Res. 1979;14:845-860.
128. Wakabayashi S, Koide T. Histidine-rich glycoprotein: a possible modulator of coagulation and fibrinolysis. Semin Thromb Hemost;37:389-394.
129. Chillakuri CR, Jones C, Mardon HJ. Heparin binding domain in vitronectin is required for oligomerization and thus enhances integrin mediated cell adhesion and spreading. FEBS Lett. 2010;584:3287-3291.
130. Lipponen K, Liu Y, Stege PW, Oorni K, Kovanen PT, Riekkola ML. Capillary electrochromatography and quartz crystal microbalance, valuable techniques in the study of heparin-lipoprotein interactions. Anal Biochem;424:71-78.
131. Kumar V, Yadav VK, Hassan I, et al. Kinetic and Structural Studies on the Interactions of Heparin and Proteins of Human Seminal Plasma using Surface Plasmon Resonance. Protein Pept Lett.
132. Schulman S, Beyth RJ, Kearon C, Levine MN. Hemorrhagic complications of anticoagulant and thrombolytic treatment: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). Chest. 2008;133:257S-298S.
133. Cines DB, Rauova L, Arepally G, et al. Heparin-induced thrombocytopenia: an autoimmune disorder regulated through dynamic autoantigen assembly/disassembly. J Clin Apher. 2007;22:31-36.
134. Martel N, Lee J, Wells PS. Risk for heparin-induced thrombocytopenia with unfractionated and low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis: a meta-analysis. Blood. 2005;106:2710-2715.
135. DiGiovanni CW. Current concepts review: heparin-induced thrombocytopenia. Foot Ankle Int. 2008;29:1158-1167.

136. Shantsila E, Lip GY, Chong BH. Heparin-induced thrombocytopenia. A contemporary clinical approach to diagnosis and management. Chest. 2009;135:1651-1664.
137. Hourigan LA, Walters DL, Keck SA, Dec GW. Heparin-induced thrombocytopenia: a common complication in cardiac transplant recipients. J Heart Lung Transplant. 2002;21:1283-1289.
138. Horsewood P, Warkentin TE, Hayward CP, Kelton JG. The epitope specificity of heparin-induced thrombocytopenia. Br J Haematol. 1996;95:161-167.
139. Mathelier-Fusade P, Deschamps A, Abuaf N, Leynadier F. [Cutaneous reactions to heparin: immunological and clinical aspects]. Presse Med. 1995;24:323-325.
140. Gennari C, Martini G, Nuti R. Secondary osteoporosis. Aging (Milano). 1998;10:214-224.
141. Arora N, Goldhaber SZ. Anticoagulants and transaminase elevation. Circulation. 2006;113:e698-702.
142. Gray E, Mulloy B, Barrowcliffe TW. Heparin and low-molecular-weight heparin. Thromb Haemost. 2008;99:807-818.
143. Monographie 01/2008:0828 Heparins, Low-Molecular-mass (ed 6.0); 2008.
144. Johnson EA, Kirkwood TB, Stirling Y, et al. Four heparin preparations: anti-Xa potentiating effect of heparin after subcutaneous injection. Thromb Haemost. 1976;35:586-591.
145. Linhardt RJ, Gunay NS. Production and chemical processing of low molecular weight heparins. Semin Thromb Hemost. 1999;25 Suppl 3:5-16.
146. Bisio A, Vecchietti D, Citterio L, et al. Structural features of low-molecular-weight heparins affecting their affinity to antithrombin. Thromb Haemost. 2009;102:865-873.
147. van Dongen CJ vdBA, Prins MH, Lensing AW. Fixed dose subcutaneous low molecular weight heparins versus adjusted dose unfractionated heparin for venous thromboembolism. Cochrane Database Syst Rev. 2004.
148. Crowther MA, Warkentin TE. Bleeding risk and the management of bleeding complications in patients undergoing anticoagulant therapy: focus on new anticoagulant agents. Blood. 2008;111:4871-4879.
149. Baroletti S, Piovella C, Fanikos J, Labreche M, Lin J, Goldhaber SZ. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT): clinical and economic outcomes. Thromb Haemost. 2008;100:1130-1135.
150. Matzsch T, Bergqvist D, Hedner U, Nilsson B, Ostergaard P. Effects of low molecular weight heparin and unfragmented heparin on induction of osteoporosis in rats. Thromb Haemost. 1990;63:505-509.
151. Petitou M, Duchaussoy P, Lederman I, et al. Synthesis of heparin fragments. A chemical synthesis of the pentasaccharide O-(2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo-alpha-D-glucopyranosyl)-(1-4)-O-(beta-D-glucopyranosyluronic acid)-(1-4)-O-(2-deoxy-2-sulfamido-3,6-di-O-sulfo-alpha-D-glu copyranosyl)-(1-4)-O-(2-O-sulfo-alpha-L-idopyranosyluronic acid)-(1-4)-2-deoxy-2-sulfamido-6-O-sulfo-D-glucopyranose decasodium salt, a heparin fragment having high affinity for antithrombin III. Carbohydr Res. 1986;147:221-236.
152. Chen C, Yu B. Efficient synthesis of Idraparinux, the anticoagulant pentasaccharide. Bioorg Med Chem Lett. 2009;19:3875-3879.
153. Olson ST, Bjork I, Sheffer R, Craig PA, Shore JD, Choay J. Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement. J Biol Chem. 1992;267:12528-12538.
154. Cheng JW. Fondaparinux: a new antithrombotic agent. Clin Ther. 2002;24:1757-1769; discussion 1719.
155. Paolucci F, Clavies MC, Donat F, Necciari J. Fondaparinux sodium mechanism of action: identification of specific binding to purified and human plasma-derived proteins. Clin Pharmacokinet. 2002;41 Suppl 2:11-18.
156. Boneu B, Necciari J, Cariou R, et al. Pharmacokinetics and tolerance of the natural pentasaccharide (SR90107/Org31540) with high affinity to antithrombin III in man. Thromb Haemost. 1995;74:1468-1473.

157. Warkentin TE, Maurer BT, Aster RH. Heparin-induced thrombocytopenia associated with fondaparinux. N Engl J Med. 2007;356:2653-2655; discussion 2653-2655.
158. Rota E, Bazzan M, Fantino G. Fondaparinux-related thrombocytopenia in a previous low-molecular-weight heparin (LMWH)-induced heparin-induced thrombocytopenia (HIT). Thromb Haemost. 2008;99:779-781.
159. Burch M, Cooper B. Fondaparinux-associated heparin-induced thrombocytopenia. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2012;25:13-15.
160. Warkentin TE, Greinacher A, Koster A, Lincoff AM. Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). Chest. 2008;133:340S-380S.
161. Mismetti P, Quenet S, Levine M, et al. Enoxaparin in the treatment of deep vein thrombosis with or without pulmonary embolism: an individual patient data meta-analysis. Chest. 2005;128:2203-2210.
162. Donath L, Lutzner J, Werth S, et al. Efficacy and safety of venous thromboembolism prophylaxis with fondaparinux or low-molecular weight heparin in a large cohort of consecutive patients undergoing major orthopaedic surgery - findings from the ORTHO-TEP registry. Br J Clin Pharmacol. 2012.
163. Schulman S, Bijsterveld NR. Anticoagulants and their reversal. Transfus Med Rev. 2007;21:37-48.
164. van Veen JJ, Maclean RM, Hampton KK, et al. Protamine reversal of low molecular weight heparin: clinically effective? Blood Coagul Fibrinolysis. 2011;22:565-570.
165. Sakai M, Fujii-Kuriyama Y, Saito T, Muramatsu M. Closely related mRNA sequences of protamines in rainbow trout testis. J Biochem. 1981;89:1863-1868.
166. Roque A, Ponte I, Suau P. Secondary structure of protamine in sperm nuclei: an infrared spectroscopy study. BMC Struct Biol. 2011;11:14.
167. Jones GR, Hashim R, Power DM. A comparison of the strength of binding of antithrombin III, protamine and poly(L-lysine) to heparin samples of different anticoagulant activities. Biochim Biophys Acta. 1986;883:69-76.
168. Carr JA, Silverman N. The heparin-protamine interaction. A review. J Cardiovasc Surg (Torino). 1999;40:659-666.
169. Crowther MA, Berry LR, Monagle PT, Chan AK. Mechanisms responsible for the failure of protamine to inactivate low-molecular-weight heparin. Br J Haematol. 2002;116:178-186.
170. Dawes J, Pepper DS. A sensitive competitive binding assay for exogenous and endogenous heparins. Thromb Res. 1982;27:387-396.
171. Mochizuki T, Olson PJ, Szlam F, Ramsay JG, Levy JH. Protamine reversal of heparin affects platelet aggregation and activated clotting time after cardiopulmonary bypass. Anesth Analg. 1998;87:781-785.
172. Khan NU, Wayne CK, Barker J, Strang T. The effects of protamine overdose on coagulation parameters as measured by the thrombelastograph. Eur J Anaesthesiol. 2010;27:624-627.
173. McLaughlin KE, Dunning J. In patients post cardiac surgery do high doses of protamine cause increased bleeding? Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2003;2:424-426.
174. Coggin MH, Ahl R, Roland A, Beck D, Brecher AS. Protamine sulfate stimulates degradation of factor Xa and the factor Xa-antithrombin complex. Blood Coagul Fibrinolysis. 2011;22:247-253.
175. Ni Ainle F, Preston RJ, Jenkins PV, et al. Protamine sulfate down-regulates thrombin generation by inhibiting factor V activation. Blood. 2009;114:1658-1665.
176. Chu AJ, Wang ZG, Raicu M, Beydoun S, Ramos N. Protamine inhibits tissue factor-initiated extrinsic coagulation. Br J Haematol. 2001;115:392-399.
177. Cobel-Geard RJ, Hassouna HI. Interaction of protamine sulfate with thrombin. Am J Hematol. 1983;14:227-233.
178. Nielsen VG. Protamine enhances fibrinolysis by decreasing clot strength: role of tissue factor-initiated thrombin generation. Ann Thorac Surg. 2006;81:1720-1727.
179. Barstad RM, Stephens RW, Hamers MJ, Sakariassen KS. Protamine sulphate inhibits platelet membrane glycoprotein Ib-von Willebrand factor activity. Thromb Haemost. 2000;83:334-337.
180. Nybo M, Madsen JS. Serious anaphylactic reactions due to protamine sulfate: a systematic literature review. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008;103:192-196.

181. Hamada Y, Kameyama Y, Narita H, Benson KT, Goto H. Protamine after heparin produces hypotension resulting from decreased sympathetic outflow secondary to increased nitric oxide in the central nervous system. Anesth Analg. 2005;100:33-37.
182. Goto H, Kushihashi T, Benson KT, Kato H, Fox DK, Arakawa K. Heparin, protamine, and ionized calcium in vitro and in vivo. Anesth Analg. 1985;64:1081-1084.
183. Pugsley MK, Kalra V, Froebel-Wilson S. Protamine is a low molecular weight polycationic amine that produces actions on cardiac muscle. Life Sci. 2002;72:293-305.
184. Benz K, Nauck MA, Bohler J, Fischer KG. Hemofiltration of recombinant hirudin by different hemodialyzer membranes: implications for clinical use. Clin J Am Soc Nephrol. 2007;2:470-476.
185. Warkentin TE, Crowther MA. Reversing anticoagulants both old and new. Can J Anaesth. 2002;49:S11-25.
186. Nagler M, Haslauer M, Wuillemin WA. Fondaparinux - data on efficacy and safety in special situations. Thromb Res. 2012;129:407-417.
187. Bhagirath VC, O'Malley L, Crowther MA. Management of bleeding complications in the anticoagulated patient. Semin Hematol. 2011;48:285-294.
188. Logan AC, Goodnough LT. Recombinant factor VIIa: an assessment of evidence regarding its efficacy and safety in the off-label setting. Hematology Am Soc Hematol Educ Program;2010:153-159.
189. Young G, Yonekawa KE, Nakagawa PA, Blain RC, Lovejoy AE, Nugent DJ. Recombinant activated factor VII effectively reverses the anticoagulant effects of heparin, enoxaparin, fondaparinux, argatroban, and bivalirudin ex vivo as measured using thromboelastography. Blood Coagul Fibrinolysis. 2007;18:547-553.
190. Bijsterveld NR, Moons AH, Boekholdt SM, et al. Ability of recombinant factor VIIa to reverse the anticoagulant effect of the pentasaccharide fondaparinux in healthy volunteers. Circulation. 2002;106:2550-2554.
191. Elmer J, Wittels KA. Emergency reversal of pentasaccharide anticoagulants: a systematic review of the literature. Transfus Med. 2012;22:108-115.
192. Godier A, Durand M, Emmerich J, Dizier B, Lecompte T, Samama CM. Efficacy of prothrombin complex concentrate to reverse the anticoagulant effect of the pentasaccharide fondaparinux in a rabbit model. Thromb Haemost. 2011;105:161-168.
193. Montalescot G, Zapol WM, Carvalho A, Robinson DR, Torres A, Lowenstein E. Neutralization of low molecular weight heparin by polybrene prevents thromboxane release and severe pulmonary hypertension in awake sheep. Circulation. 1990;82:1754-1764.
194. Kikura M, Lee MK, Levy JH. Heparin neutralization with methylene blue, hexadimethrine, or vancomycin after cardiopulmonary bypass. Anesth Analg. 1996;83:223-227.
195. Godal HC. A comparison of two heparin-neutralizing agents: protamine and polybrene. Scand J Clin Lab Invest. 1960;12:446-457.
196. Bridges CR, Jr., Rennke HG, Deen WM, Troy JL, Brenner BM. Reversible hexadimethrine-induced alterations in glomerular structure and permeability. J Am Soc Nephrol. 1991;1:1095-1108.
197. Cook JJ, Niewiarowski S, Yan Z, et al. Platelet factor 4 efficiently reverses heparin anticoagulation in the rat without adverse effects of heparin-protamine complexes. Circulation. 1992;85:1102-1109.
198. Levy JH, Cormack JG, Morales A. Heparin neutralization by recombinant platelet factor 4 and protamine. Anesth Analg. 1995;81:35-37.
199. Demma L, Levy JH. A Case Series of Recombinant Platelet Factor 4 for Heparin Reversal After Cardiopulmonary Bypass. Anesth Analg. 2012.
200. Kurrek MM, Winkler M, Robinson DR, Zapol WM. Platelet factor 4 injection produces acute pulmonary hypertension in the awake lamb. Anesthesiology. 1995;82:183-187; discussion 131A.
201. Cardin AD, Weintraub HJ. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. Arteriosclerosis. 1989;9:21-32.
202. Schick BP, Maslow D, Moshinski A, San Antonio JD. Novel concatameric heparin-binding peptides reverse heparin and low-molecular-weight heparin anticoagulant activities in patient plasma in vitro and in rats in vivo. Blood. 2004;103:1356-1363.

203. Shenoy S, Harris RB, Sobel M. Development of heparin antagonists with focused biological activity. Curr Pharm Des. 1999;5:965-986.
204. Wakefield TW, Andrews PC, Wrobleski SK, et al. A [+18RGD] protamine variant for nontoxic and effective reversal of conventional heparin and low-molecular-weight heparin anticoagulation. J Surg Res. 1996;63:280-286.
205. Liang JF, Zhen L, Chang LC, Yang VC. A less toxic heparin antagonist--low molecular weight protamine. Biochemistry (Mosc). 2003;68:116-120.
206. Cushing DJ, Cooper WD, Cohen ML, McVoy JR, Sobel M, Harris RB. Reversal of heparin-induced increases in aPTT in the rat by PM102, a novel heparin antagonist. Eur J Pharmacol. 2010;635:165-170.
207. Kuziej J, Litinas E, Hoppensteadt DA, et al. In vivo neutralization of unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin by a novel salicylamide derivative. Clin Appl Thromb Hemost. 2010;16:377-386.
208. Chess EK, Bairstow S, Donovan S, et al. Case study: contamination of heparin with oversulfated chondroitin sulfate. Handb Exp Pharmacol. 2012:99-125.
209. Afssaps. Lettre destinée aux professionnels de santé sur les informations concernant la sécurité de l'emploi du fondaparinux: Afssaps; 2007.
210. Schellenberger V, Turck CW, Rutter WJ. Role of the S' subsites in serine protease catalysis. Active-site mapping of rat chymotrypsin, rat trypsin, alpha-lytic protease, and cercarial protease from Schistosoma mansoni. Biochemistry. 1994;33:4251-4257.
211. Ersdal-Badju E, Lu A, Peng X, et al. Elimination of glycosylation heterogeneity affecting heparin affinity of recombinant human antithrombin III by expression of a beta-like variant in baculovirus-infected insect cells. Biochem J. 1995;310 (Pt 1):323-330.
212. Lundblad RL. techniques in protein modification Florida, USA: CRC Press
1995.
213. Riordan JF. Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione. Biochemistry. 1973;12:3915-3923.
214. Patthy L, Thesz J. Origin of the selectivity of alpha-dicarbonyl reagents for arginyl residues of anion-binding sites. Eur J Biochem. 1980;105:387-393.
215. Takahashi K. The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. J Biol Chem. 1968;243:6171-6179.
216. Jorgensen AM, Borders CL, Jr., Fish WW. Arginine residues are critical for the heparin-cofactor activity of antithrombin III. Biochem J. 1985;231:59-63.
217. Patthy L, Smith EL. Reversible modification of arginine residues. Application to sequence studies by restriction of tryptic hydrolysis to lysine residues. J Biol Chem. 1975;250:557-564.
218. Yankeelov JA, Jr., Mitchell CD, Crawford TH. A simple trimerization of 2,3-butanedione yielding a selective reagent for the modification of arginine in proteins. J Am Chem Soc. 1968;90:1664-1666.
219. Shapiro R, Hachmann J, Wahl R. A new self-condensation product of biacetyl. J Org Chem. 1966;31:2710-2712.
220. Yankeelov JA, Jr. Modification of arginine in proteins by oligomers of 2,3-butanedione. Biochemistry. 1970;9:2433-2439.
221. Mathews JM, Watson SL, Snyder RW, Burgess JP, Morgan DL. Reaction of the butter flavorant diacetyl (2,3-butanedione) with N-alpha-acetylarginine: a model for epitope formation with pulmonary proteins in the etiology of obliterative bronchiolitis. J Agric Food Chem. 2010;58:12761-12768.
222. Saurina J, Hernandez-Cassou S. Determination of amino acids by ion-pair liquid chromatography with post-column derivatization using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate. J Chromatogr A. 1994;676:311-319.
223. Darwish IA. Development and validation of spectrophotometric methods for determination of fluoxetine, sertraline, and paroxetine in pharmaceutical dosage forms. J AOAC Int. 2005;88:38-45.
224. Xuehua Zhang CL, Xuexin Cheng, Xuesong wang, Baowen Zhang. A near-infrared croconium dye-base colorimetric chemodosimeter for biological thiols and cyanide anion. Sensors and Actuators B: Chemical
2007;129:152–157.

225. Itano HA, Gottlieb AJ. Blocking of Tryptic Cleavage of Arginyl Bonds by the Chemical Modification of the Guanido Group with Benzil. Biochem Biophys Res Commun. 1963;12:405-408.
226. Weiler JM, Gellhaus MA, Carter JG, et al. A prospective study of the risk of an immediate adverse reaction to protamine sulfate during cardiopulmonary bypass surgery. J Allergy Clin Immunol. 1990;85:713-719.
227. Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. Biochem Biophys Res Commun. 1967;27:157-162.
228. Ordonez A, Martinez-Martinez I, Corrales FJ, et al. Effect of citrullination on the function and conformation of antithrombin. Febs J. 2009;276:6763-6772.
229. Turko IV, Fan B, Gettins PG. Carbohydrate isoforms of antithrombin variant N135Q with different heparin affinities. FEBS Lett. 1993;335:9-12.
230. Garone L, Edmunds T, Hanson E, et al. Antithrombin-heparin affinity reduced by fucosylation of carbohydrate at asparagine 155. Biochemistry. 1996;35:8881-8889.
231. Brennan SO, George PM, Jordan RE. Physiological variant of antithrombin-III lacks carbohydrate sidechain at Asn 135. FEBS Lett. 1987;219:431-436.
232. Olson ST, Frances-Chmura AM, Swanson R, Bjork I, Zettlmeissl G. Effect of individual carbohydrate chains of recombinant antithrombin on heparin affinity and on the generation of glycoforms differing in heparin affinity. Arch Biochem Biophys. 1997;341:212-221.
233. Yan SB, Chao YB, van Halbeek H. Novel Asn-linked oligosaccharides terminating in GalNAc beta (1-->4)[Fuc alpha (1-->3)]GlcNAc beta (1-->.) are present in recombinant human protein C expressed in human kidney 293 cells. Glycobiology. 1993;3:597-608.
234. Zhang P, Tan DL, Heng D, et al. A functional analysis of N-glycosylation-related genes on sialylation of recombinant erythropoietin in six commonly used mammalian cell lines. Metab Eng. 2010;12:526-536.
235. Wedepohl S, Kaup M, Riese SB, et al. N-glycan analysis of recombinant L-Selectin reveals sulfated GalNAc and GalNAc-GalNAc motifs. J Proteome Res. 2010;9:3403-3411.
236. Hasan K, Lazo-Langner A, Acedillo R, Zeller M, Hackam DG. Anticoagulant response after dalteparin overdose. J Thromb Haemost. 2010;8:2321-2323.
237. Odeberg J, Carlsson A, Hallsjo-Sander C, Agren A. A case series of five episodes of massive LMWH non-fatal self-induced overdose in a single patient. Thromb Res. 2012;129:668-670.
238. Raivio P, Kuitunen A, Petaja J, Ilveskero S, Lassila R. Monitoring high-dose heparinization during cardiopulmonary by-pass--a comparison between prothrombinase-induced clotting time (PiCT) and two chromogenic anti-factor Xa activity assays. Thromb Haemost. 2008;99:427-434.
239. Bordes J, Asencio Y, Kenane N, Fesselet J, Meaudre E, Goutorbe P. Recombinant activated factor VII for acute subdural haematoma in an elderly patient taking fondaparinux. Br J Anaesth. 2008;101:575-576.
240. Nielly H, Bousquet A, Le Garlantezec P, Perrier E, Bohand X. Severe bleeding secondary to misuse of fondaparinux: a case report. J Thromb Thrombolysis. 2010;29:503-511.
241. Svenarud P, Ovrum E. Clinical effects of different protamine doses after cardiopulmonary bypass. Asian Cardiovasc Thorac Ann. 2002;10:119-123.
242. Ishiguro K, Kojima T, Kadomatsu K, et al. Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. J Clin Invest. 2000;106:873-878.
243. Wu JK, Sheffield WP, Blajchman MA. Molecular cloning and cell-free expression of mouse antithrombin III. Thromb Haemost. 1992;68:291-296.
244. Tsakiris DA, Scudder L, Hodivala-Dilke K, Hynes RO, Coller BS. Hemostasis in the mouse (Mus musculus): a review. Thromb Haemost. 1999;81:177-188.
245. Emeis JJ, Jirouskova M, Muchitsch EM, Shet AS, Smyth SS, Johnson GJ. A guide to murine coagulation factor structure, function, assays, and genetic alterations. J Thromb Haemost. 2007;5:670-679.
246. Smeds E, Habuchi H, Do AT, et al. Substrate specificities of mouse heparan sulphate glucosaminyl 6-O-sulphotransferases. Biochem J. 2003;372:371-380.
247. GlaxoSmithKline. Monographie du produit: Arixtra. Ontario: GSK; 2012:72.

248. Ding R, Zhao D, Guo R, Zhang Z, Ma X. Treatment with unfractionated heparin attenuates coagulation and inflammation in endotoxemic mice. Thromb Res. 2011;128:e160-165.
249. Zettlmeissl G, Conradt HS, Nimtz M, Karges HE. Characterization of recombinant human antithrombin III synthesized in Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem. 1989;264:21153-21159.
250. Bjork I, Ylinenjarvi K, Olson ST, Hermentin P, Conradt HS, Zettlmeissl G. Decreased affinity of recombinant antithrombin for heparin due to increased glycosylation. Biochem J. 1992;286 (Pt 3):793-800.
251. Wasley LC, Atha DH, Bauer KA, Kaufman RJ. Expression and characterization of human antithrombin III synthesized in mammalian cells. J Biol Chem. 1987;262:14766-14772.
252. Kurihara M, Watanabe K, Inoue S, et al. Characterization of two novel mutations of the antithrombin gene observed in Japanese thrombophilic patients. Thromb Res. 2005;115:351-358.
253. Edmunds T, Van Patten SM, Pollock J, et al. Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. Blood. 1998;91:4561-4571.
254. Berry LR, Thong B, Chan AK. Comparison of recombinant and plasma-derived antithrombin biodistribution in a rabbit model. Thromb Haemost. 2009;102:302-308.