



HAL
open science

Résistance de cible aux antivitamines KR : analyse des conséquences catalytiques de différentes mutations de VKORC1 et, : étude du rôle d'une nouvelle enzyme, la VKORC1L1

Abdessalem Hammed

► **To cite this version:**

Abdessalem Hammed. Résistance de cible aux antivitamines KR : analyse des conséquences catalytiques de différentes mutations de VKORC1 et, : étude du rôle d'une nouvelle enzyme, la VKORC1L1. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10025 . tel-01558369

HAL Id: tel-01558369

<https://theses.hal.science/tel-01558369v1>

Submitted on 7 Jul 2017

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.

MEMOIRE DE THESE

Présenté pour obtenir le grade de
DOCTEUR ès SCIENCES
Mention BIOCHIMIE
(arrêté du 7 août 2006)

Délivré par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1 - ECOLE DOCTORALE « EDISS »

Présenté par **Abdessalem HAMMED**

Intitulé,

RESISTANCE DE CIBLE AUX ANTIVITAMINE K :
Analyse des conséquences catalytiques de
différentes mutations de VKORC1 et,
Étude du rôle d'une nouvelle enzyme, la VKORC1L1.

Sous la direction de M. Etienne BENOÎT et Mme. Virginie LATTARD

Soutenue publiquement le *13 février 2014* devant le jury composé de :

Président :	M. LACHUER Joël
Rapporteurs :	Mme. RAHUEL-CLERMONT Sophie Mme. SIGURET Virginie
Examineurs :	M. BENOIT Etienne Mme. LATTARD Virginie Mme TCHERTANOV Luba

Ce travail a été réalisé au sein de :

l'U.S.C.1233 (VAS/INRA) « Rongeurs Sauvages : Risques Sanitaire et Gestions des Populations »

à VetAgroSup, Campus Vétérinaire de Lyon (Marcy l'Etoile).

Ce travail a été en partie réalisé avec la collaboration :

du Service Sanguin de la Croix Rouge allemande, et
de l'Institut de la Transfusion médicale et d'Immuno-Hématologie

à l'Université Goethe à Francfort

et tout particulièrement avec la collaboration du Dr Gabriele SPOHN.

A vous tous,
Amis et famille,
Que vous soyez en France, en Tunisie ou ailleurs
Et plus particulièrement à ma petite sœur, Chaïma

REMERCIEMENTS

Je tiens dans un premier temps à remercier les membres du jury.

Je remercie très sincèrement Mme. **Sophie RAHUEL-CLERMONT** ainsi que Mme. **Virginie SIGURET** d'avoir accepté de rapporter ma thèse. Merci pour votre patience et votre gentillesse. Je vous exprime ma profonde gratitude.

Je suis également reconnaissant envers Mme. **Luba TCHERTANOV** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je suis particulièrement honoré que M. **Joël LACHUER** ait accepté de présider ma soutenance de thèse. Je vous en remercie très respectueusement.

Pour terminer avec la présentation de ce jury de thèse, je tiens à adresser mes remerciements à mes directeurs de thèse **Etienne BENOIT** et **Virginie LATTARD**. Merci pour votre accueil si chaleureux au sein de votre unité. J'ai pu apprécier non seulement votre dimension scientifique qui me semble sans fin, mais aussi votre indéniable dimension humaine. A contrario d'un environnement de travail stressant, vous vous évertuez à installer un climat serein, quasi familial. J'en profite donc pour vous exprimer ici, à tous deux, ma plus profonde gratitude.

Je suis convaincu que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser. Je tiens donc, dans un deuxième temps, à remercier toutes ces personnes.

Durant ces trois années de thèse, j'ai eu la chance de côtoyer à l'école vétérinaire de Lyon (Marcy l'Etoile) de nombreuses personnes attachantes : que toutes soient remerciées pour les bons moments partagés. Je pense notamment (pardon à ceux que j'oublie) à :

- ceux qui nous ont « abandonné » mais qui ont imprégné les locaux de leur sympathie : **Adrien, Ahmed** (mon bro), **Nolwenn, Pauline**...
- ceux qui sont fidèles au poste : **Arnaud, Claire, Joffrey, Khédidja, Ludivine, Marlène, Maylis, Sébastien**...
- celles (et ceux) d'à côté : **Céline, Edwige, Solange**...

- celui que je ne peux pas classer, celui qui a apporté une dimension particulière à mes années de doctorat. Eh oui, toi **Benjamin**, mon AbdelBachir. Tes jolis jeux de mots, ton langage soutenu, ton sens de la propreté... Bref, toutes ces qualités qui te font défaut !! Haha. Tu n'en demeures pas moins une personne attachante avec qui j'ai partagé d'excellents moments de complicité. Je t'en remercie 5ouya.

Je remercie également **Audrey MICHAUD** et **Elodie ROUSSET** pour leur soutien, leur amitié, leurs encouragements. Merci à elles d'avoir pris le temps de relire mon mémoire. A toi **Elodie**, je profite de l'occasion pour t'exprimer mon respect et ma reconnaissance. Tu as été, en quelque sorte, au début de toute cette aventure. Tu m'as accompagné dans la « phase finale » de mon cursus universitaire. Tu as encore été à mes côtés pour mes premiers pas dans le monde réel du travail, et tu es encore là aujourd'hui. Mon mentor, mon amie au grand cœur.

Enfin, ces remerciements seraient incomplets si je n'en adressais pas à mes proches :

Ma famille de sang: **Maman, Papa, Chiraz, Raouda, Oualid, Chaïma** ainsi que mes nièces (**Sarah & Shérazad**) et mon neveu (**Sofiane**) sans oublier le reste de la famille.

Ma famille de cœur : **Flo** (Chouquette), **Seb** (Chou), **Mica** (Toutage), **Alexandra** (Lalou), **Diane** (la Ka7loucha)...

Cette thèse, aboutissement de longues années d'études, je l'ai faite pour vous, pour que vous soyez fiers de moi. Je me rends compte que je vous en fais voir de toutes les couleurs avec mon caractère, mais vous êtes toujours là pour me soutenir. Votre confiance a été mon leitmotiv. Ma pudeur m'empêche de vous le dire souvent mais vous le savez, je vous aime.

Encore MERCI à vous tous.

RESUME

Les anticoagulants antivitamine K (AVK) sont destinés à limiter la coagulation du sang. Ils augmentent la fluidité sanguine et sont donc susceptibles de provoquer des saignements. En effet, les AVK ralentissent le recyclage de la vitamine K, micronutriment essentiel sous sa forme réduite pour la modification post-traductionnelle de protéines spécifiques (les PVKD). Il a été démontré que les AVK inhibent spécifiquement la VKORC1, enzyme catalysant la réaction VKOR qui réduit la vitamine K époxyde en vitamine K hydroquinone.

Les AVK sont utilisés chez l'homme dans le cadre du traitement et de la prévention de la survenue de phénomènes thromboemboliques. Chez les rongeurs, ils servent de rodenticides afin de contrôler la prolifération des populations de rongeurs qualifiés de nuisibles. Face à l'utilisation massive de ces AVK, il a été observé un phénomène de résistance qu'il est indispensable de mieux comprendre dans un intérêt économique, écologique ou encore de santé publique.

Chez des patients résistants aux AVK, 26 mutations ont été décrites dans la zone codante de VKORC1. L'expression hétérologue de ces enzymes mutées n'a permis de trouver que 6 mutations impliquées dans la résistance. Repérer ces mutations avant même le début d'un traitement permettra une mise en place du traitement beaucoup plus rapide. Les autres mutations ne seraient pas responsables du phénotype observé. Par ailleurs, la plupart des mutations présentes dans la boucle luminale sont responsables d'une modification de l'efficacité enzymatique, alors même que cette boucle ne semble pas impliquée dans la catalyse.

Par ailleurs, la VKORC1L1 (une protéine avec 30% d'homologie avec la VKORC1) a été décrite comme une protéine qui agit contre le stress oxydatif. Notre travail confirme que l'enzyme catalyse la réaction VKOR. Si sa participation dans la réduction de la vitamine K époxyde est insignifiante dans le foie, il en est tout autrement dans les autres tissus testés. De plus, la VKORC1L1 apparaît plus résistante aux AVK par rapport à la VKORC1. Ces propriétés catalytiques de la VKORC1L1 permettent d'expliquer l'absence d'effets des AVK sur les PVKD d'origine extra-hépatiques.

Enfin, un travail de mutagenèse dirigée a permis d'abaisser ou d'augmenter considérablement la sensibilité de VKORC1L1 aux AVK. Ces résultats nous permettent de décrire l'implication de différents acides aminés dans l'interaction avec les AVK.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES ARTICLES.....	4
LES ACIDES AMINÉS	5
LISTE DES ABREVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX.....	9
I - INTRODUCTION GENERALE.....	10
II - PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	12
2.1. LA VITAMINE K	12
2.1.1. Découverte.....	12
2.1.2. Les différentes vitamines K	13
2.1.3. Fonctions et utilisation pratique	15
2.2. PVKD & ACTIVATION	16
2.2.1. GGCX et Gamma-carboxylation.....	16
2.2.2. Mécanisme catalytique de la GGCX.....	18
2.2.3. Les différentes PVKD / Fonctions	19
2.2.3.1. Dans le foie / Facteurs de coagulation.....	19
2.2.3.2. Extra-hépatiques.....	23
2.2.3.2.1. Ostéocalcine	23
2.2.3.2.2. MGP.....	26
2.2.3.2.3. Gas6.....	27
2.2.3.2.4. La famille des protéines Gla transmembranaires	27
2.2.3.2.5. Protéines avec de nombreux Glu gamma-carboxylable dans sa séquence.....	28
2.3. RECYCLAGE DE LA VITAMINE K	30
2.3.1. L'activité VKOR et l'enzyme VKORC1.....	31
2.3.1.1. Topologie de VKORC1	33
2.3.1.2. Mécanisme catalytique de la VKORC1	34
2.3.2. VKORC1L1	37
2.3.3. Partenaire redox de l'activité VKOR	38
2.3.4. Complexe enzymatique ou pas ?.....	40
2.3.5. Activité VKR.....	41

2.4. INHIBITION DE L'ACTIVITE VKOR	42
2.4.1. Historique.....	42
2.4.2. Structures / Propriétés physico-chimiques des AVK	43
2.4.3. Mécanisme d'action	45
2.4.4. Métabolisme des AVK.....	47
2.4.4.1. Métabolisme des AVK chez l'homme. L'exemple du coumafène	48
2.4.4.2. Métabolisme des AVK chez le rat. L'exemple du coumafène	49
2.4.5. Utilisation pratique des AVK	49
2.4.5.1. Utilisation pratique des AVK en médecine humaine	50
2.4.5.1.1. Evaluation de la réponse aux AVK chez l'homme	50
2.4.5.1.2. Intoxication aux AVK chez l'homme	51
2.4.5.1.3. Facteurs influençant la réponse aux AVK	52
2.4.5.2. Utilisation pratique des AVK dans la gestion des populations de rongeurs.....	53
2.5. RESISTANCE AUX AVK	54
2.5.1. Résistance chez les rongeurs	54
2.5.2. Résistance chez l'homme.....	57
2.5.2.1. Facteurs génétiques influençant la réponse aux AVK chez l'homme	58
2.5.2.1.1. Polymorphisme Vkorc1 et Résistance	58
2.5.2.1.2. Polymorphisme CYP2C9	60
2.5.2.2. Nature et fréquence des polymorphismes dans le monde	60
2.5.3. Mécanisme de la résistance aux AVK	61
2.5.4. L'action des AVK sur les PVKD extra-hépatiques.....	62
2.5.5. La caluménine, un autre mécanisme de la résistance	63
 III - OBJECTIFS	 64
 IV - STRATEGIE	 66
 V - MATERIELS ET METHODES	 68
5.1 Matériels	68
5.1.1 Réactifs de biologie cellulaire.....	68
5.1.2 Réactifs biochimiques	68
5.1.3 Réactifs de biologie moléculaire	68
5.2 Méthodes expérimentales	69
5.2.1. Etude pharmacogénétique	69
5.2.1.1 Recrutement des patients	69
5.2.1.2 Génotypage	70
5.2.1.2.1 Extraction de l'ADN génomique.....	70
5.2.1.2.2 Génotypage de VKORC1	70

5.2.2. Expérimentation animale.....	70
5.2.3. Culture cellulaire	71
5.2.4. Etude de biologie moléculaire.....	71
5.2.4.1. Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc	71
5.2.4.2. PCR temps réel	72
5.2.5. Etude biochimique.....	72
5.2.5.1 Constructions plasmidiques	73
5.2.5.2 Mutagenèse dirigée	73
5.2.5.3 Transformation des bactéries compétentes et préparation de l'ADN plasmidique.....	73
5.2.5.4 Transformation des levures compétentes	74
5.2.5.5 Expression des protéines recombinantes	75
5.2.5.6 Préparation des fractions microsomales de levures.....	76
5.2.5.7 Dosage de protéines	77
5.2.5.8 Analyse de l'expression des protéines sauvages et de leurs mutants par immunoblot	77
5.2.5.9 Détermination semi-quantitative de l'expression des protéines recombinantes.....	78
5.2.5.10 Activité enzymatique	78
5.2.5.11 Analyse des résultats	79
VI - RESULTATS	80
6.1. Caractérisation biochimique des mutations spontanées de hVKORC1 détectées chez des patients résistants aux AVK.....	80
6.2. Caractérisation des propriétés catalytiques de la VKORC1L1 et rôle de cette enzyme dans le recyclage de la vitamine K dans certains tissus extra-hépatiques.....	82
6.3. Détermination des acides aminés de VKORC1L1 important dans son phénotype de résistance aux AVK	84
VII - DISCUSSION	86
VIII - CONCLUSIONS	96
VIII - PERSPECTIVES	98
IX - ANNEXES	100
X - LISTE BIBLIOGRAPHIQUE	101

LISTE DES ARTICLES

Articles publiés

Publication 1

VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity

Auteurs : Ahmed HODROGE, Benjamin MATAGRIN, Caroline MOREAU, Isabelle FOUREL, **Abdessalem HAMMED**, Etienne BENOÎT et Virginie LATTARD

Revue : *J. Thromb. Haemost.*

Année : 2012

Publication 2

VKORC1L1, an enzyme rescuing the VKOR activity in some extrahepatic tissues during anticoagulation therapy

Auteurs : **Abdessalem HAMMED**, Benjamin MATAGRIN, Gabriele SPOHN, Caroline PROUILLAC, Etienne BENOÎT et Virginie LATTARD

Revue : *J. Biol. Chem.*

Année : 2013

Publication 3

Identification of key functional residues in the active site of vitamin K epoxide reductase-like protein (VKORC1L1), a major enzyme involved in the vitamin K cycle

Auteurs : Benjamin MATAGRIN, **Abdessalem HAMMED**, Arnaud MICHAUX, Ahmed HODROGE, Etienne BENOÎT et Virginie LATTARD

Revue : *Biochem. Mol. Biol. J.*

Année : 2016

LES ACIDES AMINÉS

	Abréviation	Code	Chaîne latérale	Nature
Alanine	Ala	A	-CH ₃	Apolaire, Aliphatique
Arginine	Arg	R	-C ₄ H ₁₂ N ₃	Basique
Asparagine	Asn	N	-C ₂ H ₄ ON	Polaire
Aspartate	Asp	D	-C ₂ H ₃ O ₂	Acide
Cystéine	Cys	C	-CH ₃ S	Polaire
Glutamate	Glu	E	-C ₃ H ₅ O ₂	Acide
Glutamine	Gln	Q	-C ₃ H ₆ ON	Polaire
Glycine	Gly	G	-H	Apolaire, Aliphatique
Histidine	His	H	-C ₄ H ₅ N ₂	Basique, Aromatique
Isoleucine	Ile	I	-C ₄ H ₉	Apolaire, Aliphatique
Leucine	Leu	L	-C ₄ H ₉	Apolaire, Aliphatique
Lysine	Lys	K	-C ₄ H ₁₀ N	Basique
Méthionine	Met	M	-C ₃ H ₇ S	Apolaire
Phénylalanine	Phe	F	-C ₇ H ₇	Apolaire, Aromatique
Proline	Pro	P	-C ₃ H ₆	Apolaire
Sérine	Ser	S	-CH ₃ O	Polaire
Thréonine	Thr	T	-C ₂ H ₅ O	Polaire
Tryptophane	Trp	W	-C ₉ H ₈ N	Apolaire, Aromatique
Tyrosine	Tyr	Y	-C ₇ H ₇ O	Polaire, Aromatique
Valine	Val	V	-C ₃ H ₇	Apolaire, Aliphatique

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
AVK	Antivitamine K
BCR	Blood-clotting response
BGP	Bone Gla Protein (=ostéocalcine)
cM	centiMorgan
CMLV	Cellule musculaire lisse vasculaire
CYP	Cytochrome P-450
(k)Da	(kilo)Dalton
DTT	Dithiolthreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FR	Facteur de résistance
Gas6	Growth arrest-specific gene 6
GGCX	Gamma-glutamyl-carboxylase
Gla	Acide aminé gamma-carboxyglutamate
INR	International normalised ratio
insR	Récepteur d'insuline
ISI	Indice de sensibilité intrinsèque
KCl	Chlorure de potassium
K_i	Constante d'inhibition
K_M	Constante de Michaelis-Menten
KO	Knock out
LC/MS	Liquid chromatography mass spectrometry
Mb	Méga base
MGP	Matrix gla protéin
MK	Ménaquinone
NQO1	NAD(P)H déhydrogénase quinone 1
OC	Ostéocalcine (=BGP)
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDI	Protéine disulfure isomerase

PIVKA	Protein induced by vitamin K antagonist
PS	Protéine S
PVKD	Protéine vitamine K-dépendante
PZ	Protéine Z
rpm	Rotation par minute
RT-qPCR	Reverse transcriptase and quantitative PCR
SNP	Single nucleotide polymorphism
SVF	Sérum de veau foetal
TM	(segment) transmembranaire
TMG	Proteines Gla transmembranaire
TQ	Temps de Quick
Trx	Thioredoxine
unOC	Ostéocalcine non carboxylée
USC	Unité sous contrat
Vitamine KH2	Vitamine K hydroquinone
Vitamine K>O	Vitamine K époxyde
VKCFD2	Vitamin K Clotting Factor Deficiency 2
VKOR (activité)	(activité) vitamine K époxyde réductase
VKORC1	Vitamine K époxyde réductase sous-unité 1
VKORC1L1	VKORC1-like 1
VKR (activité)	(activité) vitamine K quinone réductase
Vmax	Vitesse maximale

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Noyau 2-méthyl-1,4 naphtoquinone	p.13
<u>Figure 2</u> : Les principales formes chimiques de la vitamine K	p.14
<u>Figure 3</u> : Réaction de gamma-carboxylation	p.16
<u>Figure 4</u> : Topologie GGCX selon Stafford <i>et al.</i> , 2005	p.17
<u>Figure 5</u> : Mécanisme catalytique de la gamma-carboxylation (Furie <i>et al.</i> , 1999)	p.18
<u>Figure 6</u> : Schéma simplifié des cascades de la coagulation	p.21
<u>Figure 7</u> : Rôle de l'ostéocalcine non-gamma-carboxylée selon Lee <i>et al.</i> , 2007	p.24
<u>Figure 8</u> : Rétroaction positive de l'ostéocalcine décarboxylée	p.25
<u>Figure 9</u> : Cycle de la vitamine K	p.30
<u>Figure 10</u> : Comparaison de la topologie de VKORC1	p.33
<u>Figure 11</u> : Topologie de VKORC1 proposée par Li <i>et al.</i> , 2010	p.34
<u>Figure 12</u> : Mécanisme réactionnel de la réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone (Silverman, 1981)	p.35
<u>Figure 13</u> : Mécanisme réactionnel de la réduction de vitamine K époxyde en vitamine K quinone (Matagrín <i>et al.</i> , 2013)	p.36
<u>Figure 14</u> : Formation de 3-OH-vitK quand VKORC1 est mutée en 139 (Matagrín <i>et al.</i> 2013)	p.37
<u>Figure 15</u> : Topologie de VKORC1L1 proposée par Westhofen <i>et al.</i> , 2011	p.38
<u>Figure 16</u> : Structure de NQO1 sous sa forme homo-dimère	p.41
<u>Figure 17</u> : Formation du dicoumarol	p.42
<u>Figure 18</u> : Structure chimique des différentes familles d'AVK	p.43
<u>Figure 19</u> : Structure chimique des AVK utilisés en médecine humaine	p.44
<u>Figure 20</u> : Structures chimique de quelques AVK utilisés comme rodenticides	p.44
<u>Figure 21</u> : Représentation Lineweaver et Burk d'une inhibition non-compétitive de l'activité VKOR par des microsomes de foies de rats sensibles	p.46
<u>Figure 22</u> : Mécanisme d'inhibition de VKORC1 par les AVK selon Silverman, 1980	p.47
<u>Figure 23</u> : Métabolisme du coumafène chez l'homme	p.48

<u>Figure 24</u> : Métabolisme du coumafène chez le rat	p.49
<u>Figure 25</u> : Principale mutation de VKORC1 observée chez le rat dans les régions d'Europe	p.54
<u>Figure 26</u> : Modèle hypothétique du système de carboxylation vitamine K-dépendant impliquant la caluménine (Wallin et Hutson, 2004)	p.63
<u>Figure 27</u> : Principe de la transformation des levures <i>Pichia pastoris</i>	p.74
<u>Figure 28</u> : Expression de protéines recombinantes par la levure <i>Pichia pastoris</i>	p.76

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Protéines Vitamine K dépendantes	p.29
<u>Tableau 2</u> : Propriétés physico-chimiques des principaux anticoagulants	p.45
<u>Tableau 3</u> : Exemples de mutation faux sens du gène <i>VKORC1</i> détectées chez des patients nécessitant un surdosage d'AVK pour leur traitement anticoagulant	p.59
<u>Tableau 4</u> : Comparaison des facteurs de résistance (FR) pour différents mutants de <i>VKORC1</i> déterminés en levure <i>Pichia pastoris</i> (Hodroge <i>et al.</i>) et en cellules HEK293 (Tie <i>et al.</i> / Czogalla <i>et al.</i>)	p.89
<u>Tableau 5</u> : Comparaison qualitative des constantes catalytiques des mutants de hVKORC1L1 déterminées <i>in vitro</i> , par rapport à celle de hVKORC1L1 non mutées.....	p.93
<u>Tableau 6</u> : Comparaison qualitative des constantes catalytiques des mutants de hVKORC1 déterminées <i>in vitro</i> , par rapport à celle de hVKORC1 non mutées.....	p.93

I - INTRODUCTION GENERALE

Les anticoagulants antivitamine K (AVK) sont des molécules destinées à empêcher ou à retarder la coagulation du sang. Ils sont donc susceptibles de provoquer des saignements. Ce sont des molécules utilisées aussi bien chez l'homme que chez l'animal, même si les molécules utilisées sont différentes.

Chez l'homme, les AVK sont utilisés dans le cadre du traitement et de la prévention de la survenue de phénomènes thromboemboliques (maladie thromboembolique veineuse, prothèses valvulaires cardiaques, fibrillation auriculaire, infarctus du myocarde...). Selon l'AFSSAPS, et en particulier selon l'étude EMIR (Effets indésirables des Médicaments Incidence et Risque), 900 000 patients étaient traités par ces médicaments en France durant l'année 2007 soit près du double du nombre de patients traités 10 ans plus tôt. Les accidents hémorragiques et thrombotiques liés à l'utilisation de ces médicaments arrivent au premier rang des accidents iatrogènes médicamenteux. Environ 17 000 hospitalisations par an sont dues à ces effets indésirables et les cas mortels sont de l'ordre de 0,6 % des patients traités (4800 décès par an). Le surdosage, très fréquent, est estimé entre 15 et 30 % des patients présentant ainsi un facteur de risque (INR>4) hémorragique grave. La difficulté de la mise en place du traitement est expliquée en grande partie par une variabilité génétique interindividuelle en raison de mutations du gène *VKORC1* codant la cible des AVK, et du gène *CYP2C9* codant l'enzyme impliquée dans le métabolisme des AVK. Les mutations du promoteur sont clairement liées à une modification de la sensibilité aux AVK chez l'homme. En revanche, le rôle causal des 28 mutations codantes (pour 163 acides aminés) qui ont été retrouvées sur *VKORC1* chez des patients nécessitant une posologie anormalement importante en AVK (plus de 10 à 15 mg de coumafène par jour) est peu analysé et constitue une partie du travail développé dans ce mémoire.

La large utilisation des AVK en tant que raticides a débuté après la deuxième guerre mondiale. L'inefficacité de ces molécules dans la lutte contre les nuisibles a été observée dès les années 1960. Des mutations de ce même gène *Vkorc1* ont été retrouvées chez des rongeurs résistants qui, de ce point de vue, sont des excellents modèles pour l'étude de la résistance de l'homme. En effet, chez l'homme, un phénomène de résistance a également été observé chez des patients pour qui la dose d'antivitamine K à administrer doit au moins être multipliée par deux pour que son rôle d'anticoagulant soit efficace.

Une analyse des rôles biologiques de la vitamine K et en particulier du rôle de cette vitamine au travers des protéines vitamines K dépendantes non liées à la coagulation telles que la MGP, l'ostéocalcine, la périostine 1 ou Gas6 montre clairement que la vitamine K est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques. L'analyse du cycle de la vitamine K montre qu'actuellement une seule et unique enzyme, la VKORC1 permet d'assurer le recyclage de cette vitamine. Or, ce recyclage apparaît être absolument indispensable. Il semble pourtant qu'une seule fonction, la coagulation sanguine, est impactée par les AVK tandis que les autres fonctions ne semblent pas être touchées. Une question naît de ces constatations : Pourquoi, alors que la vitamine K est impliquée dans la protection contre les calcifications ectopiques, les AVK ne provoquent-ils pas de telles calcifications ? Pourquoi, alors que l'ostéocalcine non gamma-carboxylée est hypoglycémiant, n'observons-nous pas d'hypoglycémie chez les patients traités aux AVK ? Ces questions ont été à l'origine également d'une partie de ce travail.

Cet ouvrage participe donc à ces objectifs, en se focalisant sur la caractérisation biochimique des mutations du gène *VKORC1* détectées chez l'homme résistant aux AVK, puis plus particulièrement sur la caractéristique catalytique d'une nouvelle enzyme, la VKORC1L1. Pour développer le travail que j'ai réalisé, je consacrerai la première partie de ce mémoire à une revue bibliographique des connaissances actuelles qui ont permis d'orienter les travaux menés pendant cette thèse. Ces travaux seront décrits dans une deuxième partie et seront suivis, dans une troisième partie, d'une discussion générale.

II - PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. LA VITAMINE K

2.1.1. Découverte

La vitamine K est une vitamine liposoluble, résistante à la chaleur mais détruite par la lumière. C'est le chercheur biochimiste danois Carl Peter Henrik Dam qui réussit à isoler ce micronutriment. En effet, alors qu'il étudiait le rôle du cholestérol en nourrissant des poulets avec une alimentation pauvre en lipides vers la fin des années 1920, il constate qu'après plusieurs semaines de régime, ces animaux souffrent d'hémorragies persistantes (même après ajout de cholestérol dans leur alimentation). Il apparaît clair qu'en plus du cholestérol, une autre substance a été retirée des aliments et que cette substance a un effet coagulant. Cette découverte a été publiée en allemand et cette molécule a alors été désignée comme Koagulation vitamin (pour vitamine de la coagulation) et reçoit ainsi la lettre K (Dam, 1935).

En 1936, le docteur Dam parvient à purifier la vitamine K à partir de la luzerne mais il faudra attendre 1939 pour que le Dr Edward Doisy publie sa synthèse chimique. Ces deux scientifiques se partagèrent le Prix Nobel de médecine en 1943 pour leurs travaux sur la vitamine K.

Cette vitamine K est décrite comme un micronutriment essentiellement apporté par l'alimentation étant donné que nous ne sommes pas capables de le synthétiser. En effet, même si dans notre flore intestinale certaines bactéries produisent de la vitamine K, sa contribution dans le statut vitaminique reste hypothétique. Pour l'homme, l'apport journalier en vitamine K doit être d'environ 1µg/kg en se basant uniquement sur les besoins de la coagulation sanguine.

2.1.2. Les différentes vitamines K

Trois formes de cette vitamine sont décrites. Toutes appartiennent à la famille des quinones car elles présentent dans leur structure chimique une naphtoquinone (2-méthyl-1,4-naphtoquinone) nécessaire aux transferts d'électrons (Figure 1).

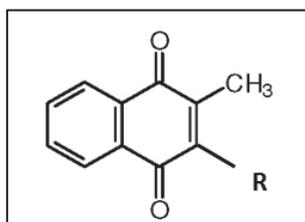


Figure 1 : Noyau 2-méthyl-1,4 naphtoquinone

Cette naphtoquinone est substituée en position 3 par une chaîne latérale carbonée qui détermine la divergence dans les propriétés particulières de chacune de ces vitamines :

- La vitamine K1 (Figure 2) : Sa chaîne latérale est une chaîne phytyl. Egalement appelée phylloquinone, elle est retrouvée au niveau des membranes des chloroplastes de certains légumes verts. Peu absorbée, sa contribution dans le statut vitaminique est en réalité surestimée. Insoluble dans l'eau, elle est soluble dans les graisses et se présente (quand elle est pure) sous la forme d'une huile jaune.

- La vitamine K2 (Figure 2) : elle fait partie du groupe des ménaquinones (MK) et retrouvée dans les aliments fermentés tel que le fromage. Son absorption est meilleure que celle de la vitamine K1. La différence structurale de ces deux vitamines se situe au niveau de leur chaîne aliphatique. Cette chaîne latérale des vitamines K2 est composée d'un nombre variable d'unités terpénoïdes. Toujours lipophiles, les chaînes les plus longues donnent les molécules les plus hydrophobes et la vitamine K2 contient habituellement de 4 à 14 unités isoprène. Chez les animaux, cette chaîne latérale comporte toujours quatre isoprènes, d'où le nom de MK-4, tandis que la MK-7 (chaîne latérale à 7 isoprènes) est dominante dans le spectre des ménaquinones présentes dans le soja. Par ailleurs, la forme MK-4 peut être alkylée à partir des autres isoformes de ménaquinones apportées par l'alimentation. De même, dans certains tissus spécifiques, la MK-4 peut être synthétisée à partir de la phylloquinone.

Après absorption dans les intestins, la vitamine K est transportée par des lipoprotéines (n'ayant pas de transporteur spécifique). La différence de liposolubilité des vitamines K1 et K2 peut expliquer leurs différences dans le transport ou encore dans la demi-vie. Par ailleurs, la vitamine K1 apparaît comme utilisée prioritairement dans le foie tandis que la vitamine K2 s'accumulerait préférentiellement dans les artères ou autres localisation extra-

hépatiques (Spronk *et al.*, 2003). La vitamine K1 serait préférentiellement transportée par des lipoprotéines riches en triglycérides et délivrée au niveau hépatique, tandis que la K2 est transportée par des LDL et HDL jusqu'à d'autres organes cibles (Beulens *et al.*, 2009). Ainsi, Beulens décrit une relation entre la vitamine K2 et les tissus extrahépatiques suite à l'observation d'une accumulation et une utilisation de la vitamine K2 plus importante que celle de la vitamine K1 dans des tissus extra-hépatiques.

- La vitamine K3 (Figure 2) : moins connue et moins étudiée, cette vitamine est une forme uniquement synthétique qui se différencie des deux autres par l'absence de chaîne aliphatique. Parce que ne disposant pas de « chaîne latérale », elle est soluble dans l'eau, et convertie en vitamine K2 dans les tissus spécifiques ; elle possède une activité biologique 2 à 3 fois supérieure aux vitamines K1 et K2, mais elle n'est plus guère utilisée dans l'alimentation humaine des pays développés en raisons d'effets secondaires délétères (nausées, vomissements, syndrome hémolytique, anémie hémolytique, asthénie, sensation de faiblesse, sensation vertigineuse, mélanodermie toxique, surtout chez les patients souffrant d'une insuffisance hépato-cellulaire). Plusieurs médicaments à base de K3 ont d'ailleurs été retirés du marché.

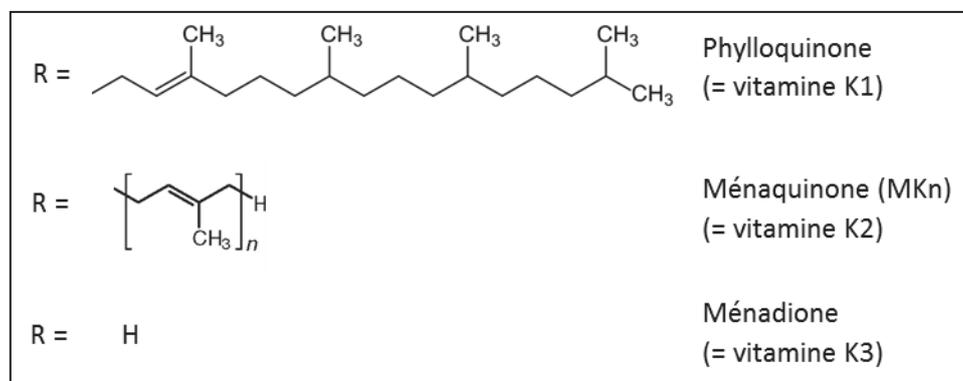


Figure 2 : Les principales formes chimiques de la vitamine K

2.1.3. Fonctions et utilisation pratique

En 1974, le professeur Stenflo ainsi que l'équipe de Nelsestuen ont simultanément décrit un inhabituel acide aminé γ -carboxyglutamate (Gla) dans la prothrombine (facteur II). Ils ont décrit que ce Gla résulte d'une carboxylation post-traductionnelle des résidus glutamate (Glu). Cette réaction est catalysée par la gamma-glutamyl-carboxylase (GGCX) et nécessite un cofacteur, la vitamine K sous sa forme réduite (hydroquinone). Les protéines subissant cette modification sont alors appelées protéines vitamine K dépendantes (PVKD). Ces protéines sont caractérisées par la présence dans leur structure d'un domaine riche en acide glutamique. La gamma-carboxylation de ces acides aminés permet de fonctionnaliser ces protéines. La structure di-carboxylique des résidus « Gla » (analogue à celle observée dans l'EDTA) permet de créer des liaisons salines très intenses avec des cations divalents et en particulier avec le calcium ionisé. La présence des résidus Gla au sein du domaine dit « Gla » est donc indispensable pour la liaison des ions calcium. Ainsi, les fonctions de la vitamine K peut être assimilée à celles des protéines qu'elle active.

La principale vitamine K apportée par l'alimentation est la phylloquinone (>90%). Ceci laisse penser que la forme majeure de la vitamine K utilisée comme co-substrat de la gamma-carboxylation est vitamine K1. Néanmoins, certaines ménaquinones peuvent également remplir ce rôle (Reedstrom et Suttie, 1995).

Par ailleurs, plusieurs études montrent que la vitamine K a des effets spécifiques indépendants de la réaction de gamma-carboxylation. Parmi ces fonctions directes de la vitamine K, une étude a montré le rôle de la MK-4 dans l'inhibition de la synthèse de prostaglandine E2, un agent inducteur de la résorption osseuse dans des cultures d'ostéoblastes (Koshihara *et al.*, 1993). La MK-4 inhibe également la formation de cellules ostéoclastiques dans des cellules dérivées de la moelle osseuse (Hara *et al.*, 1995). D'autres études montrent que cette MK-4 inhibe la croissance de certains types de cellules cancéreuses. Quelques études concluent, par ailleurs, sur une relation inverse entre le taux de vitamine K et la réponse inflammatoire (Reddi *et al.*, 1995). Enfin, la vitamine K apparaît être directement impliquée dans la prévention de dommages oxydatifs (Li *et al.*, 2003), dans la synthèse de sphingolipides (Lev et Milfort, 1972) ainsi que dans l'activité exocrine du pancréas (Thomas *et al.*, 2004).

L'utilisation de la vitamine K en médecine débuta au moment même où une forme pure fût disponible. Dans un premier temps, les patients souffrant de la jaunisse et des problèmes biliaires conduisant à une tendance aux saignements ont été traités avec de la vitamine K. Le traitement prophylactique des nouveau-nés avec de la vitamine K est rapidement devenu un des axes principaux de l'utilisation thérapeutique pour prévenir les saignements excessifs à la naissance et est encore administré à cet effet aujourd'hui.

2.2. PVKD & ACTIVATION

La vitamine K est un métabolite nécessaire à la modification de protéines impliquées dans la coagulation, le métabolisme du calcium et d'autres processus physiologiques. Toutes ces protéines sont modifiées par carboxylation post-traductionnelle de résidus d'acide glutamique pour former des résidus Gla (Figure 3).

Les PVKD sont donc des protéines avec « beaucoup » de glutamates qui subissent une gamma-carboxylation. Cette réaction post-traductionnelle, nécessitant la vitamine K, le CO_2 et l' O_2 comme cofacteurs, a été découverte en 1975 (Esmon *et al.*, 1975) et a lieu dans le réticulum endoplasmique.

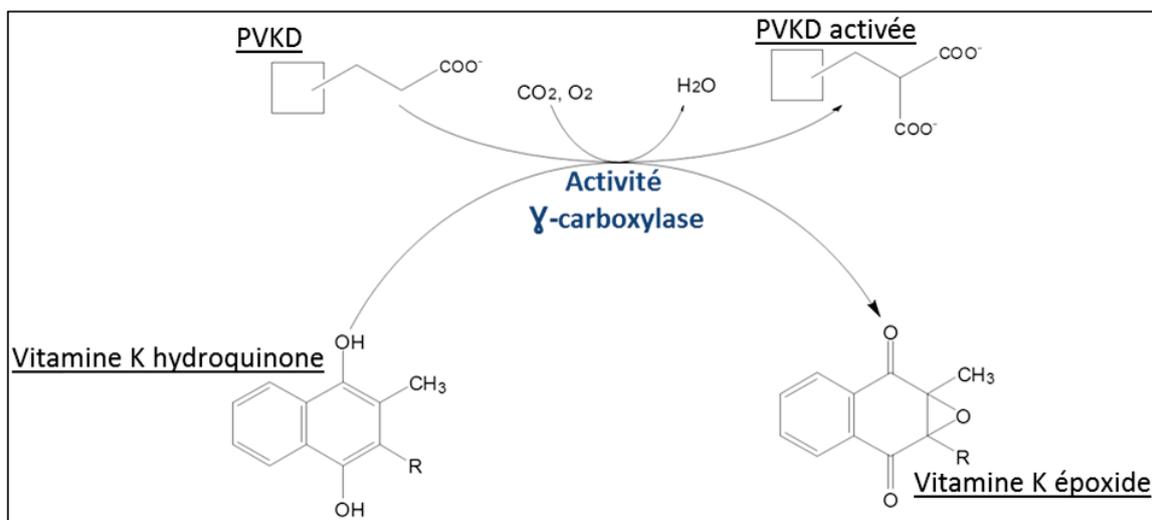


Figure 3 : Réaction de gamma-carboxylation

2.2.1. GGCX et Gamma-carboxylation

La gamma-carboxylation consiste en la substitution d'un atome d'hydrogène par un groupement carboxyle (COO⁻) sur le carbone γ d'un acide glutamique (Glu) le transformant ainsi en acide γ -carboxylglutamique (Gla). La réaction de γ -carboxylation ainsi réalisée engendre un résidu γ -carboxylglutamique ainsi que de la vitamine K sous forme oxydée. La γ -carboxylase catalysant cette réaction est une enzyme monomérique membranaire située dans le réticulum endoplasmique rugueux : la Gamma Glutamyl Carboxylase ou GGCX (Figure 4).

Le gène *GGCX* fait 13kb et comporte 15 exons. Sa séquence nucléotidique est très conservée entre les espèces (88% d'homologie entre le rat et l'humain) et code une protéine

de 758 résidus pour un poids moléculaire de 94 kDa. Cette protéine membranaire du réticulum endoplasmique possède 5 segments transmembranaires.

Le mécanisme de la réaction débute par la liaison de la GGcX sur une PVKD *via* une séquence conservée longue de 18 acides aminés (résidus 495-513) (Furie *et al.*, 1999 ; Lin *et al.*, 2002). Les PVKD possèdent également une séquence consensus située en amont d'un domaine Gla (= domaine comprenant plusieurs résidus d'acide glutamique) et leur permettant de se fixer à la gamma-carboxylase : Z-F-Z-X-X-X-X-A avec Z, un acide-aminé hydrophobe aliphatique (Ile, Val, Leu) et X, n'importe quel acide-aminé (Furie *et al.*, 1999 ; Benzakour *et al.*, 2007). La découverte de cette séquence de fixation a permis de purifier l'enzyme GGcX et de l'isoler par chromatographie d'affinité (Furie *et al.*, 1999).

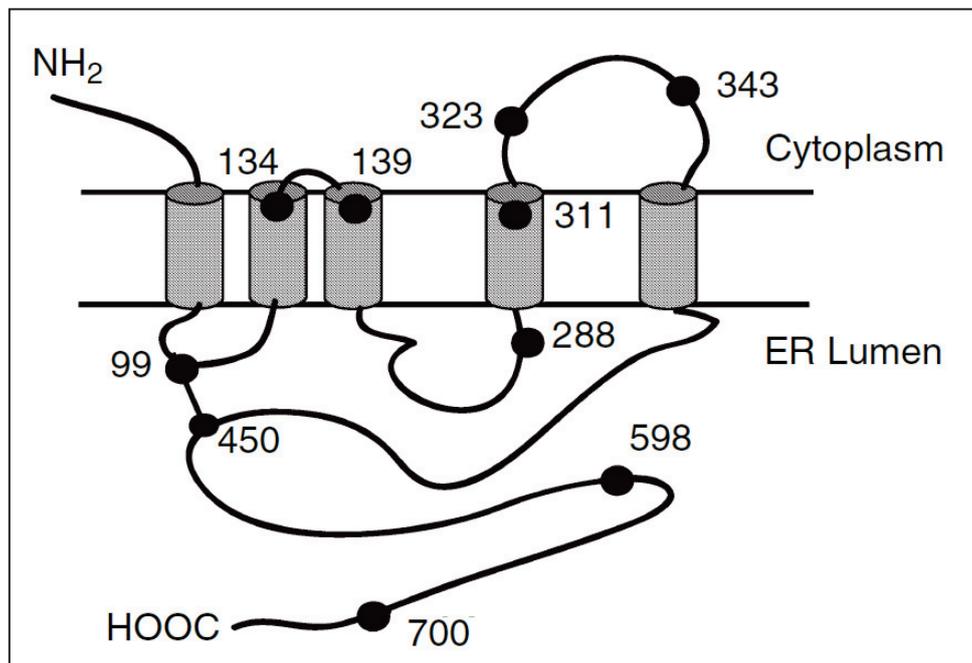


Figure 4 : Topologie GGcX selon Stafford *et al.*, 2005

En raison de l'activation allostérique initiée par la liaison entre la PVKD et la GGcX, le rapprochement des résidus Glu non modifiés vers le centre actif de l'enzyme est augmenté (Knobloch et Suttie, 1987). A noter que le Glu à modifier doit être au maximum à 40 acides-aminés du site de fixation (Furie *et al.*, 1999). La liaison enzyme-substrat provoque un deuxième changement de conformation allostérique, conduisant à une affinité accrue de la GGcX pour la vitamine K hydroquinone (Soute *et al.*, 1992).

2.2.2. Mécanisme catalytique de la GGCX

En 1999, Furie et ses collaborateurs ont proposé un mécanisme de carboxylation (Figure 5) où la vitamine KH₂ doit être considérée comme une base faible. L'attaque par un résidu thiolate de la vitamine KH₂ (en présence d'O₂) permet d'obtenir une structure fortement basique correspondant à la vitamine K-2,3-époxyde-4-alkoxyde. Ce composé attaque le carbone γ d'un glutamate de la protéine cible (PVKD) aboutissant à la formation d'un carbanion sur le glutamate et de l'époxyde de la vitamine K. Le carbanion réagit avec du CO₂ pour provoquer la formation du résidu glutamique γ -carboxylé (ou Gla).

Pendant ce processus, le propeptide reste lié au centre actif, contrairement au domaine Gla nouvellement formé, ce qui entraîne le positionnement du prochain résidu d'acide glutamique non carboxylé pour modification. Lorsque la plupart ou la totalité des domaines Gla de la PVKD a été carboxylé, l'affinité de la séquence consensus de la PVKD pour le centre actif de GGCX est réduite, libérant ainsi la protéine modifiée.

Ce postulat constitue à ce jour le mécanisme réactionnel adopté par la majorité de la population scientifique. Il implique que le site actif de la GGCX soit constitué d'une cystéine, ce que l'équipe de Stafford n'admet pas. En 2005, ils proposent alors une autre théorie selon laquelle le substrat se fixe fortement à GGCX via son propeptide, ce qui permet de gamma-carboxyler en une seule étape tous les glutamates proches du site actif.

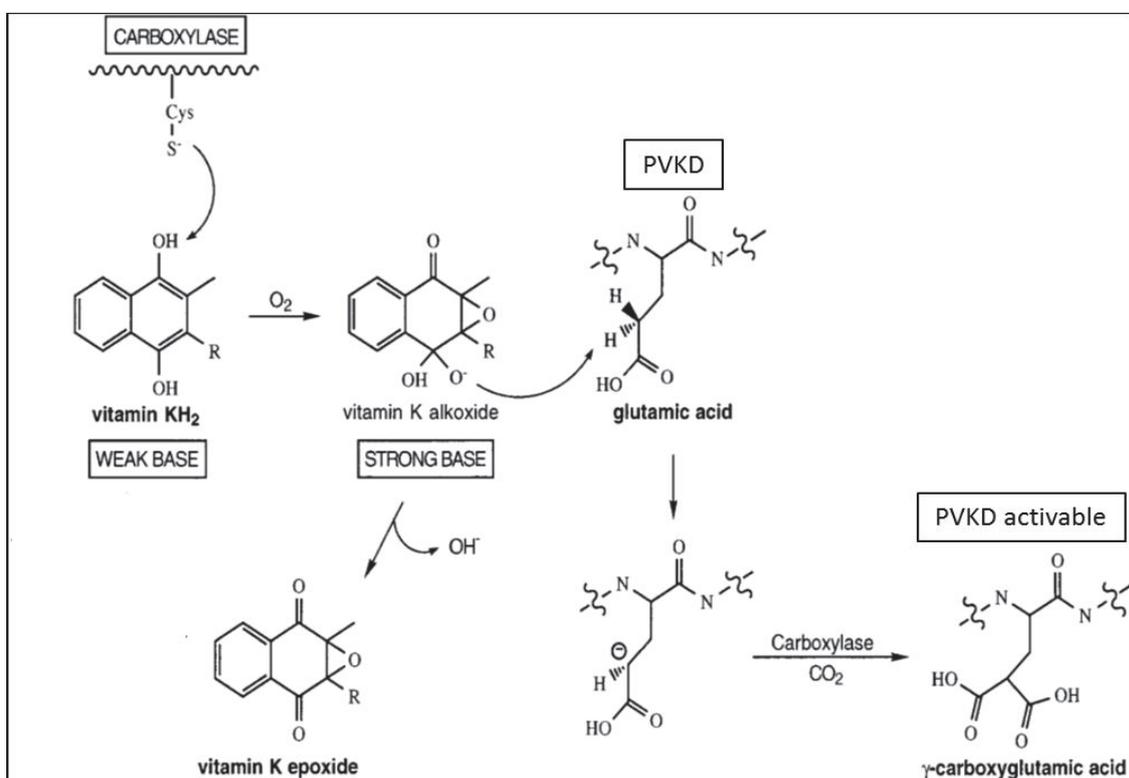


Figure 5 : Mécanisme catalytique de la gamma-carboxylation (Furie *et al.*, 1999)

Sans vitamine K, la carboxylation ne se produit pas et les protéines sont alors synthétisées sans être modifiées ce qui conduit à la synthèse de facteurs de coagulation biologiquement inactifs par exemple. Dam a d'ailleurs observé qu'une carence en vitamine K entraîne un saignement excessif (Dam, 1935). Pour toutes ces protéines, la liaison des ions Ca^{2+} , par chélation des résidus Gla, joue un rôle central dans leur liaison aux lipides dans les membranes biologiques et la modulation de leur fonction physiologique.

Le résidu Gla confère des charges négatives qui permettent de lier Ca^{2+} avec une haute affinité, contrairement à l'acide glutamique non modifié. Il apparaît donc que Gla permet la liaison de la PVKD au Ca^{2+} et donc d'interagir avec les phospholipides membranaires (Benzakour *et al.*, 2007). Cette étape de carboxylation est donc nécessaire pour la fonction biologique des PVKD tels que les facteurs de coagulation vitamine K dépendants.

2.2.3. Les différentes PVKD / Fonctions

A ce jour, 16 PVKD ont été citées dans la littérature. Pendant de nombreuses années, on a attribué aux PVKD un rôle physiologique exclusivement dans la coagulation sanguine. En effet, 7 d'entre elles sont synthétisées dans le foie, organe central de la coagulation. L'identification de 9 autres protéines contenant des résidus carboxyglutamate a permis d'orienter les recherches sur de nouvelles fonctions de la vitamine K (tels que la prévention de la calcification vasculaire ou le métabolisme énergétique). Toutes ces fonctions nécessitent la fixation du calcium *via* le domaine Gla de ces PVKD. La présence de plusieurs Gla permet une meilleure coordination et une affinité plus grande pour la fixation du calcium (Stenflo, 1999). Ceci stabilise la structure tertiaire et permet ainsi au domaine Gla de se fixer à la surface cellulaire (Berkner et Runge, 2004).

Si la majorité de ces protéines sont des sérine-protéase, 3 d'entre elles sont des tyrosine-kinase. Pour la suite, je choisis de répartir les PVKD selon deux familles : les protéines vitamine K dépendantes hépatiques et les protéines vitamine K dépendantes extra-hépatiques.

2.2.3.1. Dans le foie / Facteurs de coagulation

La coagulation débute presque instantanément après une brèche au niveau de la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins. Les plaquettes forment immédiatement un clou pour bloquer le saignement : c'est l'hémostase primaire. L'hémostase secondaire débute au

même moment : des protéines plasmatiques appelées « facteurs de coagulation » réagissent dans une cascade complexe pour former des fibres de fibrine, qui renforcent le clou plaquettaire.

La cascade de coagulation (Figure 6) est constituée de deux voies qui mènent à la formation de cette fibrine. Ces deux voies sont la voie extrinsèque (dépendante du facteur tissulaire) et la voie intrinsèque. Les deux voies sont des séries de réactions dans lesquelles un zymogène de sérine protéase et son cofacteur glycoprotéique sont activés pour ensuite catalyser la prochaine réaction. Les facteurs de coagulation sont normalement identifiés par des chiffres romains, avec un a minuscule pour indiquer la forme active.

Le rôle principal de la voie extrinsèque est de générer très rapidement une grande quantité de thrombine. Le facteur VIIa circule dans des quantités plus élevées que tout autre facteur de coagulation.

La voie intrinsèque se caractérise par une activation en cascade de plusieurs facteurs plasmatiques au contact de l'endothélium lésé et en présence d'ions calciques. L'activation débute avec le facteur XII qui active le facteur XI activant lui-même le facteur IX. Ce dernier facteur, alors activé, se combine au facteur VII en présence de calcium ionisé et de phospholipides plaquettaires pour former un complexe appelé tenase. Ce complexe va permettre l'activation du facteur X.

L'activation du facteur X est le carrefour de rencontre des voies intrinsèque et extrinsèque. Le facteur Xa et son cofacteur Va forment le complexe prothrombinase, qui active la prothrombine en thrombine. La thrombine va alors transformer le fibrinogène en fibrine.

L'ion calcium ionisé (Ca^{2+}) apparaît donc comme nécessaire à l'activité de la plupart des étapes de la coagulation.

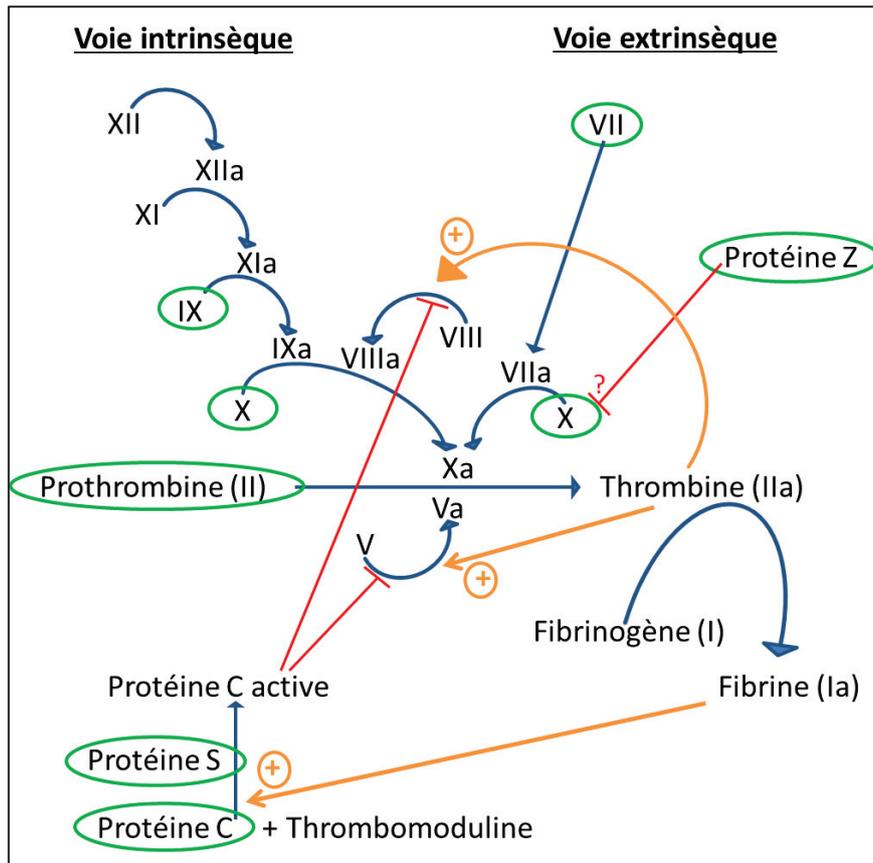


Figure 6 : Schéma très simplifié des cascades de la coagulation (les protéines vitamine K-dépendantes sont entourées en vert)

Les facteurs de coagulation sont généralement des sérines protéases (enzymes). Il y a quelques exceptions tels que le facteur VIII et le facteur V qui sont des glycoprotéines.

Les protéines procoagulantes vitamine K dépendantes (la prothrombine ou facteur II, le facteur VII, le facteur IX, et le facteur X) circulent dans le sang sous forme de précurseurs inactifs.

Après sécrétion dans le plasma de l'appareil circulatoire, des résidus Gla se lient sur les ions Ca^{2+} , contribuant ainsi à stabiliser la structure tertiaire de la protéine finale (Furie *et al.*, 1979 ; Tai *et al.*, 1984). Ce processus est associé à un changement de conformation, exposant ainsi un site de liaison aux phospholipides membranaires. Dans la voie intrinsèque, les FII, FIX et FX jouent un rôle central *via* leur activation par gamma-carboxylation de leur site de fixation à la membrane. En effet, après liaison sur les phospholipides, libérée par les cellules endommagées, la liaison non covalente est médiée par des ions Ca^{2+} coordonnés sur les lipides anioniques de la surface membranaire de la cellule. Grâce à la coordination des ions Ca^{2+} , cette interaction est forte.

En l'absence de résidus Gla ou lorsque la carboxylation est inefficace, l'activité de coagulation vitamine K dépendante est considérablement réduite.

Les PVKD impliquées dans le processus de la coagulation sont hépatiques.

En résumé, la vitamine K joue un rôle majeur dans l'activation des facteurs pro-coagulants vitamine K-dépendants (facteurs II, VII, IX et X). La gamma-carboxylation leur permet de se lier par des liaisons calcium-dépendantes aux groupements phosphates des phosphatidyls sérines présentes à la surface de l'agrégat plaquettaire. Ces 4 facteurs vitamine K dépendants, contrôlant les dernières étapes de la fibrino-formation, peuvent ainsi se concentrer de façon importante à la surface de l'agrégat ce qui permet d'interagir les uns avec les autres et de déclencher la coagulation à la surface même de l'agrégat plaquettaire.

La vitamine K, *via* la gamma-carboxylation, est aussi impliquée dans l'activation de trois protéines aux propriétés anticoagulantes : la protéine C, la protéine S et la protéine Z. (Stafford, 2005 ; Berkner et Runge, 2004) :

- La protéine C régule négativement la coagulation catalysant la dégradation des facteurs Va et VIIIa.

- La protéine S (PS) peut circuler dans le sang en étant soit libre (40%), soit liée à une protéine (60%). Sous sa forme libre, elle assure le rôle de cofacteur de la protéine C et permet ainsi d'optimiser son rôle anticoagulant.

En revanche, une fois complexée à la C4BP, son rôle est de limiter l'activation du complément et intervient dans l'élimination des cellules apoptotiques par phagocytose. En effet, sans régulation, le complément peut provoquer une réponse inflammatoire indésirable au niveau des tissus infectés. Durant l'apoptose, la phosphatidylsérine est exposée vers l'extérieur de la membrane cellulaire de telle façon que le complexe [PS/C4BP] s'y fixe *via* les résidus Gla de la PS. Le C4BP peut ainsi intervenir dans les dernières étapes de l'activation du complément et assurer sa fonction de cofacteur de la dégradation de la protéine C4b. Ainsi, en se liant à la protéine C4BP, la protéine S affiche un rôle important pour éviter une réponse inflammatoire indésirable (Berkner et Runge, 2004). Par ailleurs, contrairement aux autres PVKD hépatiques, la protéine S est fortement synthétisée par les cellules endothéliales.

- La protéine Z (PZ) est la dernière PVKD hépatique décrite dans la littérature. Identifiée en 1977 et isolée en 1984, elle présente la particularité de ne pas avoir d'activité enzymatique. Cette protéine est décrite comme un cofacteur de ZPI, une protéase qui inhibe le facteur X activé. La séquence nucléotidique de la PZ compte 9 exons et sa séquence peptidique est composée de 396 acides aminés pour un poids moléculaire d'environ 50 kDa. Cette glycoprotéine est synthétisée dans le foie principalement et possède 13 résidus Gla. Il a fallu attendre que la protéine ZPI soit isolée dans la fin des années 1990 pour démontrer la

fonction de la PZ dans la coagulation. En effet, le ZPI inhibe 1000 fois plus le facteur Xa lorsqu'il est complexé à la PZ. Cependant, son rôle n'est pas d'empêcher de former le complexe prothrombinase mais de réguler la cascade de coagulation. Le facteur Xa induit la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) ainsi son inhibition conduit à la réduction de risque de resténose (rétrécissement d'une artère due à la formation d'une plaque d'athérome qui a déjà été supprimée). La régulation du facteur Xa par le complexe [ZPI-PZ] protège donc contre le développement d'athérosclérose (Vasse, 2008).

2.2.3.2. Extra-hépatiques

Contrairement aux PVKD de la coagulation précédemment décrites, la documentation sur les 9 PVKD restantes est bien plus légère. Pour la plupart, leur fonction reste très incertaine. La Matrix Gla Protein (MGP) et l'ostéocalcine (OC encore appelé Bone Gla Protein = BGP) sont les protéines vitamine K dépendantes dont les fonctions sont les plus étudiées à ce jour.

2.2.3.2.1. Ostéocalcine

L'ostéocalcine (OC) est spécifiquement produite par les ostéoblastes (Elle est d'ailleurs également nommée Bone Gla Protein ou BGP dans la littérature). Il s'agit de la protéine non-collagénique la plus abondamment sécrétée par les ostéoblastes. Cette PVKD compte 49 acides aminés et son domaine Gla compte 3 acides glutamiques et peut circuler sous forme gamma-carboxylée ou non.

L'OC est différente des autres PVKD car sa gamma-carboxylation lui procure une forte affinité pour les ions calcium de l'hydroxyapatite de l'os. En effet, son domaine Gla n'est pas autant affine aux ions calcium que celui des autres PVKD. Ainsi, alors que ces dernières se fixent aux membranes cellulaires *via* les ions calcium, pour l'OC la gamma-carboxylation des 3 Glu forme une hélice alpha où tous les Gla sont orientés vers la surface et la protéine fixe ainsi le calcium *via* les cristaux d'hydroxyapatites (Berkner et Runge, 2004). Ceci explique sa forte présence dans la matrice osseuse et suppose un rôle fonctionnel majeur dans l'os. Cependant, des souris *Oc*^{-/-} n'ont présenté aucune anomalie osseuse. En revanche, il a été observé chez ces souris une surcharge pondérale et plus précisément (Ducy *et al.*, 1996) :

- une diminution de la taille des îlots de Langerhans du pancréas,
- une hypoinsulinémie, ou encore
- une diminution de l'expression et de la concentration plasmatique de l'adiponectine.

L'ajout d'une ostéocalcine recombinante à une co-culture de fibroblastes et de cellule β stimule l'expression de l'insuline (Ducy *et al.*, 1996). De plus, les cellules exprimant l'ostéocalcine stimulent significativement la synthèse d'insuline et d'adiponectine. Enfin, en présence de cellules β , les ostéoblastes des souris $Oc^{-/-}$ ne peuvent pas stimuler la sécrétion d'insuline et d'adiponectine. Toutes ces données appuient l'hypothèse selon laquelle l'OC agit comme une hormone osseuse dans la communication entre l'os et le pancréas.

Lee *et al.* (2007) précise qu'elle favorise (Figure 7) :

- la prolifération des cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas.
- la sécrétion d'insuline par ces cellules *bêta* pancréatiques.
- la sécrétion d'adiponectine dans les adipocytes, rendant les tissus adipeux plus sensibles à l'insuline.

Il apparaît donc que les os régulent hormonalement le métabolisme énergétique *via* l'OC. Cette régulation se fait avec la forme circulante non-carboxylée de l'OC (unOC) (Lee *et al.*, 2007 et Ferron *et al.*, 2008). Comme toute hormone, l'OC doit agir sur les cellules *bêta* pancréatiques *via* un récepteur qui reste à ce jour encore inconnu (Ferron *et al.*, 2008).

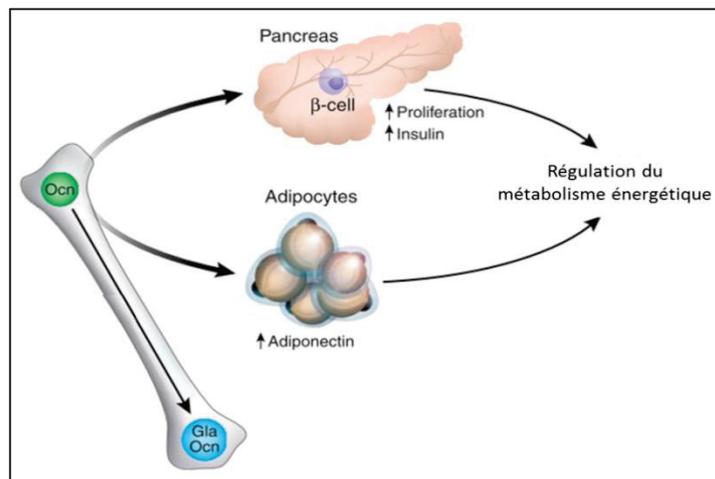


Figure 7 : Rôle de l'ostéocalcine non-gamma-carboxylée selon Lee *et al.*, 2007

Au même moment, Lee *et al.* (2007) ont décrit une tyrosine phosphatase intracellulaire aux fonctions opposées à l'OC : il s'agit de l'OST-PTP. En effet, lorsque le gène de l'OST-PTP est éteint chez la souris (gène *Esp*), ils observent une augmentation de la prolifération des cellules *bêta* pancréatiques et une augmentation de la sécrétion d'insuline, conduisant à une hypoglycémie. Par ailleurs, si le gène de l'OC est éteint chez ces même souris, elles retrouvent alors un phénotype normal. Ces résultats ont permis à l'équipe de Lee de conclure que l'OST-PTP influence la fonction de l'OC en régulant sa gamma-carboxylation. Par ailleurs, Ferron *et al.*, (2008) démontrent que l'OST-PTP n'agit pas directement sur l'OC mais régule la gamma-carboxylation de l'OC *via* les récepteurs à insuline (insR). Ces

derniers sont des tyrosine-kinases et sont donc inhibées par des tyrosine-phosphatases. Les insR sont donc vraisemblablement des substrats de l'OST-PTP, ainsi la signalisation par l'insuline dans les ostéoblastes est régulée par OST-PTP.

La même équipe se demande si cette régulation existe chez l'humain étant donné que chez l'homme, *ESP* est un pseudogène et leur réponse est que cette régulation existe bien chez l'humain mais *via* une autre protéine tyrosine-phosphatase : la PTP1B.

Ils montrent enfin que l'insuline assure une rétroaction positive sur l'activité de l'unOC (figure 8) : le signal de l'insuline dans les ostéoblastes augmente l'activité de l'OC et impacte sur l'homéostasie du glucose en facilitant la capacité des ostéoblastes à augmenter la résorption des os et des ostéoclastes à acidifier la matrice osseuse extracellulaire. En effet, le pH acide favorise la décarboxylation des protéines. La forme non gamma-carboxylée de l'OC serait ainsi plutôt issue d'une réaction de décarboxylation de l'OC que de l'absence de carboxylation d'une OC néosynthétisée.

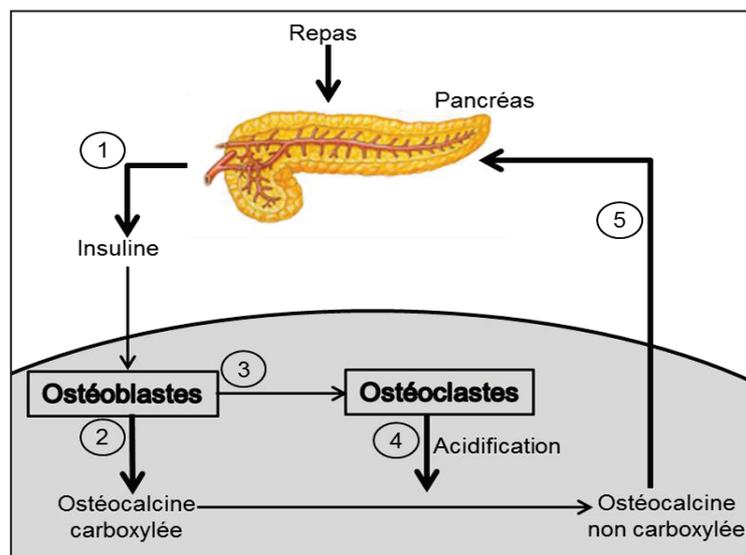


Figure 8 : Rétroaction positive de l'ostéocalcine décarboxylée

De plus, l'insuline transmet son signal en inhibant l'activité de FoxO1. Or, dans les ostéoblastes, FoxO1 est connue pour réguler négativement le métabolisme énergétique en stimulant la carboxylation de l'OC (Rached *et al.*, 2010). En inhibant FoxO1, l'insuline favorise la résorption de l'os qui constitue donc un moyen de décarboxyler l'OC et réguler positivement l'activité métabolique.

Le modèle « ostéocalcine » permet de démontrer la possible régulation du niveau de gamma-carboxylation des PVKD. Jusqu'à présent, cette régulation n'a été démontrée que pour l'OC. Cependant une régulation du niveau de gamma-carboxylation peut être envisagée pour l'ensemble des PVKD.

En plus de son rôle endocrine en tant que régulateur de l'homéostasie du glucose (Lee *et al.*, 2007), l'ostéocalcine favoriserait la fertilité masculine (Oury *et al.*, 2011). Selon Oury *et al.*, l'OC stimule la synthèse de la testostérone par les cellules de Leydig (localisées dans les testicules). La testostérone est une hormone stéroïde requise dans plusieurs fonctions des testicules mais sans effet sur la fertilité féminine. L'os est donc un régulateur positif de la fertilité masculine *via* son hormone, l'ostéocalcine qui se fixe sur des récepteurs spécifiques (Gprc6a) localisés sur la membrane des cellules de Leydig.

2.2.3.2.2. MGP

La matrice Gla protéine (MGP) se trouve également dans la matrice extracellulaire de l'os. Cependant, contrairement à l'OC, elle est également synthétisée dans plusieurs autres tissus et notamment dans le cœur, les poumons, les reins. Elle est produite par les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins, dont elle favorise la différenciation. L'accumulation significative de la MGP est uniquement observée dans la matrice extracellulaire de l'os ou dans du cartilage calcifié, tandis que dans les tissus non calcifiés, la MGP doit sûrement être sécrétée dans la circulation (Berkner et Runge, 2004).

La fonction de cette PVKD a été clairement définie après avoir éteint son expression dans des souris : la MGP est depuis considérée comme le principal inhibiteur de la calcification vasculaire. Les souris *Mgp*^{-/-} sont normales à la naissance mais développent rapidement de sévères calcifications artérielles conduisant à leur mort après 8 semaines (Luo *et al.*, 1997). Le mécanisme d'inhibition de la calcification nécessite la fixation de la MGP à une protéine morphogénique osseuse, la BMP-2 (pour Bone Morphogenic Protein 2), permettant à la MGP de réguler l'ostéogénèse. BMP-2 est un facteur de croissance induisant la production de cartilage et d'os à partir de cellules souches du mésenchyme. En formant ce complexe, la MGP empêche la BMP-2 de se lier à son récepteur et inhibe donc sa signalisation (Berkner et Runge, 2004). Une concentration élevée en MGP, qu'elle soit circulante ou locale, est significativement associée à une augmentation de la calcification vasculaire et à une augmentation de l'apoptose des vaisseaux sanguins cardiaques.

Par ailleurs, deux études montrent qu'un traitement au coumafène (un inhibiteur de l'activité VKOR) couplé à une prise de vitamine K1 conduit à des calcifications artérielles chez le rat

(Price *et al.*, 1998) et chez l'homme (Schurgers *et al.*, 2004). Deux autres études, l'une menée chez le rat (Spronk *et al.*, 2003) et l'autre réalisée sur près de 600 femmes (Beulens *et al.*, 2009), conclue que de telles calcifications ectopiques ne sont pas observées lorsque le traitement au coumafène est associé à de la vitamine K2. Ces observations leur a permis de conclure que la vitamine K2 a un rôle spécifique dans les tissus non hépatiques.

2.2.3.2.3. Gas6

La protéine Gas6 (Growth arrest specific gene 6) est une glycoprotéine sécrétée de 75 kDa. Cette PVKD possède 44% d'homologie de séquence avec la protéine S et les domaines structuraux de ces deux protéines sont presque identiques (la protéine Gas6 ne possède pas un site de clivage par sérine protéases, contrairement à la protéine S). De plus, ces deux protéines activent de la même façon une classe particulière de récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase : les récepteurs TAM (pour **TYRO3**, **AXL**, **MER**) (Benzakour *et al.*, 2007), dont elles sont les seuls ligands connus.

L'inactivation de ces 3 types de récepteurs TAM conduit à chaque fois à la dérégulation du processus de phagocytose entraînant des anomalies fonctionnelles diverses. Il en découle que la régulation de la phagocytose serait le dénominateur commun par lequel Gas6 (mais aussi la protéine S) régulerait un grand nombre de processus physiologiques. Par exemple, en se fixant sur son récepteur AXL, Gas-6 stimule la protéine anti-apoptique BCL-2 et inhibe la protéine pro-apoptique Caspase-3. Il a été démontré que les corps apoptiques peuvent former des sites favorables à la calcification. Ainsi, le complexe Gas-6-Axl protège les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins contre la calcification en inhibant l'apoptose, conférant à Gas6 une fonction similaire à celle de la MGP, mais à niveau bien plus faible.

2.2.3.2.4. La famille des protéines Gla transmembranaires

Cette famille de protéines regroupe 4 protéines aux fonctions non claires. Il s'agit des protéines Gla riches en proline 1 et 2 (PRGP1, PRGP2) (Kulman *et al.*, 1997) et des protéines Gla membranaires 3 et 4 (TMG3, TMG4) (Kulman *et al.*, 2001). Leurs fonctions restent inconnues à ce jour.

Leur ADN complémentaire prédit que ce sont des protéines de la membrane plasmatique (d'où leurs appellations), alors que les autres PVKD circulent dans l'espace extra-cellulaire. Ces protéines sont donc liées à la membrane *via* un segment transmembranaire tandis que

les autres PVKD utilisent leur domaine Gla pour se lier à la membrane cellulaire. Pour les TMG, le domaine Gla aurait donc une autre fonction. En 2004, Berkner et Runge proposent l'hypothèse suivante : les cellules qui expriment les TMG peuvent interagir *via* leur domaine Gla avec d'autres cellules qui exposent la phosphatidylserine à leur surface.

2.2.3.2.5. Protéines avec de nombreux Glu gamma-carboxylable dans sa séquence

Les 2 dernières PVKD possèdent 16 résidus Glu potentiellement gamma-carboxylés.

La première, la Gla-rich protein (GRP) est une protéine de 74 acides aminés exprimée dans l'os et le cartilage principalement. Il a été clairement montré qu'elle est associée au dépôt calcique (de façon similaire à la MGP) (Viegas *et al.*, 2009). En revanche, aucune information n'est réellement établie sur son état de gamma-carboxylation et sur sa fonction.

La deuxième, la periostine 1 se retrouve dans les tissus conjonctifs riches en collagène (incluant l'os). Elle est associée à la matrice extracellulaire où elle jouerait potentiellement un rôle dans la minéralisation (Coutu *et al.*, 2008). Son rôle et l'importance de sa gamma-carboxylation reste actuellement à clarifier. Selon les tissus et l'état de différenciation cellulaire, la periostine 1 serait plus ou moins gamma-carboxylée. Ainsi dans les cellules mésenchymateuses stromales et les adipocytes, elle serait gamma-carboxylée, alors que dans les ostéoblastes, elle serait non-gamma-carboxylée.

Tableau 1 : Protéines Vitamine K dépendantes

Proteines VKD	Tissus de γ-carboxylation	Fonction
Facteur II (prothrombine)	Foie	Pro-coagulante, Fonctions régulatrices dans l'inflammation
Facteur VII		Pro-coagulante
Facteur IX		
Facteur X		
Protéine C	Foie	Anticoagulante, Anti-inflammatoire
Protéine S	Foie, cellules endothéliales...	Anticoagulante, Anti-inflammatoire, Phagocytose, Apoptose
Protéine Z	Foie	Anticoagulante (par dégradation du facteur Xa)
MGP	Ostéoblaste, cellules musculaire lisse des vaisseaux musculaires lisses, macrophages...	Régulation négative de la calcification vasculaire
Gas-6	cellules musculaire lisse des vaisseaux musculaires lisses, ostéoblaste...	Régulation de la phagocytose des cellules apoptotiques
Osteocalcine (ou BGP)	Ostéoblaste	Régulation positive de la synthèse et la sécrétion d'insuline
Proline-rich Gla proteins	La plupart des tissus	Inconnue
Transmembrane Gla proteins periostin		Inconnue

2.3. RECYCLAGE DE LA VITAMINE K

Les études montrent que les besoins en vitamine K (120 µg/jour chez l'homme adulte) ne sont pas couverts par l'alimentation (exceptées chez les personnes qui consomment des aliments fermentés en quantité importante) (Beulens *et al.*, 2009). Or, la γ -carboxylation conduit à l'oxydation de la vitamine K hydroquinone en vitamine K époxyde. Cette forme oxydée de la vitamine K ne peut être utilisée par la GGCX et doit alors être recyclée pour pouvoir à nouveau être utilisée comme cofacteur. Lorsque la vitamine K n'est pas réduite, les PVKD sont sécrétées sous une forme non ou sous-gamma-carboxylées et donc avec des fonctions altérées. Ce recyclage s'effectue en deux étapes (Figure 9) :

- La première réaction consiste en la réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone et nécessite une enzyme à activité vitamine K époxyde réductase (activité VKOR), et plus précisément par la VKORC1.
- La vitamine K quinone est ensuite réduite en vitamine K hydroquinone. Cette deuxième étape est principalement catalysée par l'enzyme NQO1 (NAD(P)H Déhydrogénase Quinone 1) mais l'enzyme VKORC1 peut également assurer cette réaction.

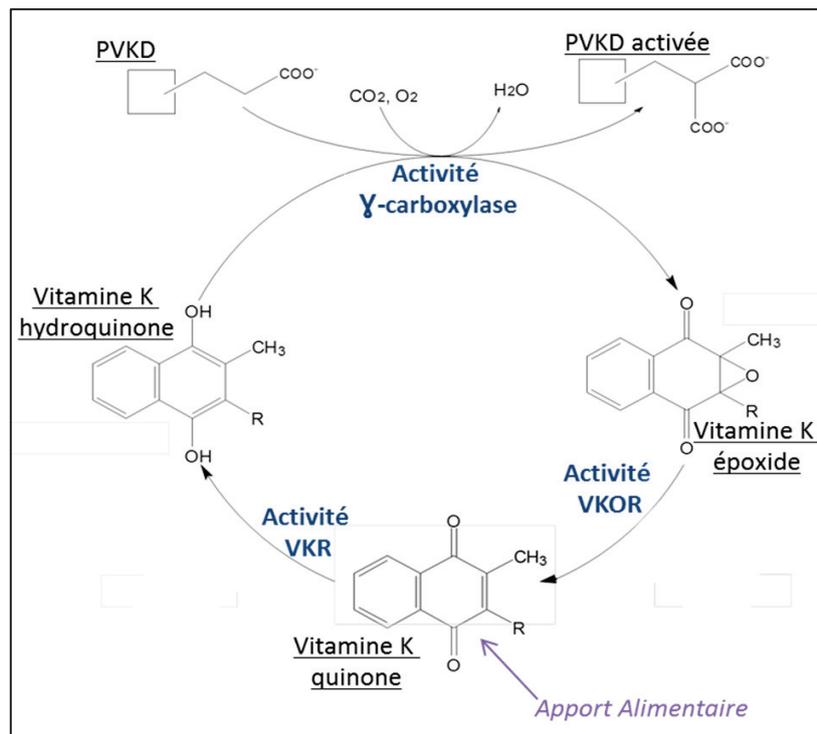


Figure 9 : Cycle de la vitamine K

L'activité qui permet de recycler la vitamine K₂O en vitamine K₂H₂ a été décrite peu de temps après la découverte de l'activité carboxylase. Ainsi, une molécule de vitamine K peut assurer autour de 500 réactions de carboxylation (Chatrou *et al.*, 2011).

2.3.1. L'activité VKOR et l'enzyme VKORC1

L'activité vitamine K époxyde réductase (VKOR) a été décrite pour la première fois en 1970 par Bell and Matschiner. Cette activité fut très rapidement décrite comme inhibable dans le foie par injection de coumafène, molécule anticoagulante développée en 1943. Cette activité a été initialement imputée à un large complexe multiprotéique. Cette notion a été remise en question en 2004 avec la découverte par 2 équipes différentes (Rost *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2004) d'un gène appelé *Vkorc1* (vitamine K epoxide reductase complex subunit 1). Il est localisé sur le chromosome 1 chez le rat, le chromosome 7 chez la souris et le chromosome 16 chez l'homme.

Ce gène, long de 5126 paires de bases et constitué de 3 exons, code une petite protéine de 163 acides aminés (18 kDa), la VKORC1. Le « knockdown » de ce gène par siRNA entraîne une réduction significative de l'activité VKOR (Li *et al.*, 2004). En revanche, la surexpression de VKORC1 en cellules d'insectes entraîne l'apparition d'une activité VKOR, inhibable par les anticoagulants antivitamine K (Rost *et al.*, 2004).

La fonction de la VKORC1 ne fait plus aucun doute depuis 2009, année où Gabriele Spohn et son équipe ont réussi à obtenir des souris *Vkorc1*^{-/-}. Si ces souris naissent normalement, 50% d'entre elles meurent d'hémorragie dès la première semaine et à 3 semaines aucune ne survit. Seule une injection journalière d'une forte dose de vitamine K permet de les maintenir en vie avec un phénotype identique à celui des souris sauvages. Néanmoins, les souris meurent une semaine après la fin de la supplémentation en vitamine K. L'analyse sanguine de ces souris montrent que 2 jours après l'arrêt de l'injection de vitamine K, l'activité des facteurs de coagulation devient indétectable. La relation qui lie la VKORC1 et l'activation des facteurs de coagulation par gamma-carboxylation est alors établie.

VKORC1 a donc un rôle central dans le cycle de la vitamine K, au même titre que GGCX. Cependant, des différences de phénotype ont été observées sur leur KO. En effet, les souris *Vkorc1*^{-/-} naissent normalement, tandis que les KO en GGCX conduit à une mort embryonnaire. En effet, les souris *Vkorc1*^{-/-} conservent une capacité de gamma-carboxylation (contrairement aux souris *Ggcx*^{-/-}). Ceci explique que la supplémentation en vitamine K permette leur survie. La mort de ces souris est clairement liée à des hémorragies sans autres signes tels que des calcifications ectopiques. Or, les souris *Mgp*^{-/-} meurent très rapidement avec des calcifications massives (comme détaillé ci-avant). Les souris *Vkorc1*^{-/-} semblent donc incapables de gamma-carboxyler leurs facteurs de coagulation hépatiques normalement mais capables de gamma-carboxyler la MGP dans les parois artérielles et ainsi de prévenir la calcification ectopiques. Une voie de supplémentation à VKORC1, particulièrement dans les tissus non hépatiques, est de ce fait probable.

L'existence d'une activité VKOR est établie depuis très longtemps (1970) puisqu'on connaissait son rôle central dans le cycle de la vitamine K. Cependant, aucune protéine ni aucun gène n'avaient été identifiés, jusqu'en 2004. Cette année-là, deux études parues dans la revue *Nature* ont identifié une composante essentielle de la cible des AVK faisant partie du complexe de la VKOR : la vitamine K époxyde réductase sous-unité 1 ou VKORC1 (Rost *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2004).

L'équipe allemande (Rost *et al.*, 2004) a identifié le gène codant pour cette nouvelle protéine VKORC1 en comparant les régions chromosomiques autour du locus D1rat219 (appelé locus *Rw*) et celles autour du locus où avait été localisé le gène d'une maladie génétique humaine très rare, la VKCFD2 (Vitamin K dependent Clotting Factors Deficiency 2). En effet, il avait été montré que cette affection hémorragique touchait simultanément l'ensemble des facteurs de coagulation vitamine K-dépendants sans pour autant qu'il n'y ait de modification de la structure des gènes correspondants ni de la structure du gène de la gamma-carboxylation. Ces deux locus ont été décrits comme impliqués dans l'activité VKOR et l'hypothèse posée fut que leur base génétique était commune. Par séquençage systématique des zones les plus orthologues de ces deux régions génétiques chez des rats d'une part et chez des patients atteints de VKCFD2 d'autre part, ils ont réussi à repérer le gène qu'ils appelèrent *VKORC1*.

Ils énoncèrent par la même occasion la découverte d'un gène paralogue à *Vkorc1* (chez l'homme et la souris) alors appelé *VKORC1L1* pour *VKORC1-LIKE1*.

L'équipe américaine (Li *et al.*, 2004) a dans un premier temps comparé les séquences chromosomiques des régions comportant le locus *Rw* chez le rat, le locus *War* chez la souris (équivalent du locus *Rw* du rat) et le locus associé au VKCFD2. Ils ont alors repéré dans ces régions les gènes communs, qu'ils soient décrits ou putatifs (au nombre de 190). Parmi ces 190 gènes, seulement 13 codaient des protéines transmembranaires. Par RNA interférence, l'expression de ces 13 transcrits a été inhibée pendant 72 heures dans des cellules eucaryotes présentant une activité VKOR endogène élevée. Ils ont ainsi localisé le gène *VKORC1* codant pour une enzyme catalysant l'activité VKOR.

Cette petite protéine de 163 acides aminés (soit 18 kDa) est localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique. Li *et al.*, (2004) proposent une topologie de cette protéine avec 1 à 3 segments transmembranaires.

L'analyse systématique de séquence a permis de démontrer que le gène *VKORC1* appartient à une large famille de gènes homologues retrouvés aussi bien chez les vertébrés que chez les insectes, les plantes, les bactéries... Toutes ces séquences orthologues possèdent un motif CXXC et quelques acides aminés particuliers strictement conservés (Oldenburg *et al.*, 2006).

2.3.1.1. Topologie de VKORC1

Toute comme la GGCX, la VKORC1 est une enzyme membranaire du réticulum endoplasmique rugueux. Dès la découverte du gène *VKORC1*, Stafford propose une structure de l'enzyme avec 1 à 3 segments transmembranaire (Li *et al.*, 2004).

La même année, Goodstadt et Ponting remettent en question cette topologie. L'étude de l'homologie par alignement de 37 séquences de VKORC1 leur permet de prédire *in silico* une protéine avec 4 domaines transmembranaire. Malgré tout, l'année suivante, Stafford persiste et propose une topologie avec 3 segments transmembranaire (Tie *et al.*, 2005) (figure 10).

Suite à la cristallisation d'un homologue bactérien de VKORC1, l'ubiquinone réductase de *Synechococcus sp.* (Li *et al.*, 2010), la topologie proposée par Tie *et al.* (2005) s'est vue profondément remise en question. En effet, la partie homologue à VKORC1 de l'ubiquinone réductase bactérienne s'organise selon 4 domaines transmembranaires, ce qui rejoint la prédiction de Goodstadt et Ponting (2004). A partir de cette structure cristallographique, Li *et al.*, (2010) proposent une nouvelle topologie de la VKORC1 humaine avec une extrémité N-terminale cytoplasmique, 4 domaines transmembranaires et une longue boucle luminale reliant les domaines transmembranaires 1 et 2 (Figures 10 et 11).

Au niveau de la structure, plusieurs laboratoires s'accordent sur le fait que certains résidus sont importants dans l'activité de la VKORC1 et la position de ces résidus est en faveur d'une topologie à 4 segments transmembranaires.

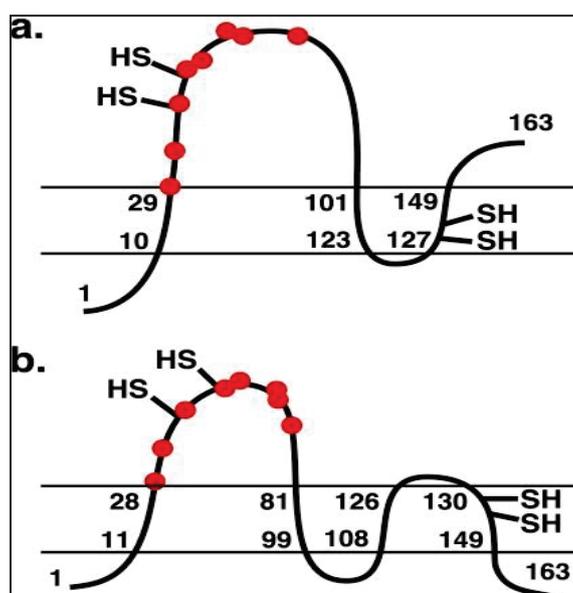


Figure 10 : Comparaison de la topologie de VKORC1. Tie *et al.* (2005) ont proposé une VKORC1 avec 3 TM (a.) tandis que Li *et al.* (2010) avec 4 TM (b.) (Rishavy *et al.*, 2010)

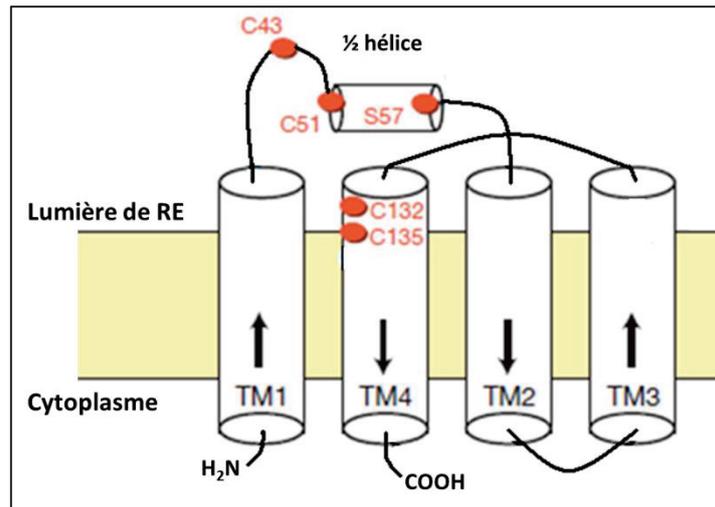


Figure 11 : Topologie de VKORC1 proposée par Li *et al.*, 2010

2.3.1.2. Mécanisme catalytique de la VKORC1

Un travail, réalisé par Goodstadt et Ponting (2004), consistait à étudier l'homologie de séquence de VKORC1 dans plusieurs espèces (vertébrés, arthropodes et plantes). Ils ont mis en évidence la conservation de 4 cystéines (Cys43, Cys51, Cys132 et Cys135). Cette forte conservation permet de supposer une importance fonctionnelle de ces 4 acides aminés. Un autre acide aminé est fortement conservé entre les espèces : la sérine en position 57.

Le postulat proposé est l'implication de ces cystéines dans le transfert du pouvoir redox conduisant à la réduction de l'époxyde de vitamine K. En effet, les résidus Cys132 et Cys135 formeraient un motif de type CXXC, motif rencontré dans de nombreuses oxydoréductases. L'importance du motif Cys132-XXCys135 a d'ailleurs été mis en évidence récemment (Jin *et al.*, 2007; Rishavy *et al.*, 2010) par mutagenèse dirigée. La mutation de ces deux cystéines en une alanine conduit à la perte de l'activité VKOR ce qui permet de conclure que ces cystéines font parties du site actif de VKORC1 (Jin *et al.*, 2007). Ces deux cystéines ont d'ailleurs été placées par Li *et al.* (2010) dans le 4^e segment transmembranaire, le site actif de l'enzyme devant se retrouver dans un environnement hydrophobe (Figure 11).

La même expérience a été réalisée sur les cystéines 43 et 51, capables de former un pont disulfure. Les résultats sont surprenants car ces mutations n'affectent aucunement l'activité VKOR de l'enzyme. Les auteurs proposent alors de vérifier si l'hypothèse de Lee et Fasco (1984) selon laquelle deux ponts disulfures distincts sont requis pour les 2 réactions du recyclage de la vitamine K. Autrement dit, ils vérifient si ces cystéines 43 et 51 interviennent dans l'activité VKR du cycle de la vitamine K. Mais à nouveau, cette hypothèse est invalidée : Les auteurs concluent que seules les cystéines 132 et 135 contribuent aux

activités VKOR et VKR de la protéine VKORC1, les cystéines 43 et 51 ayant probablement juste une fonction structurale.

Il faut cependant noter que l'ensemble de ces conclusions ont été obtenues suite à des études enzymatiques *in vitro* utilisant de fortes concentrations de DTT comme agent réducteur. Or, comme le soulignent Rishavy *et al.* (2010), le DTT est perméable à la membrane et peut donc avoir directement accès aux sites CXXC et alors donner de faux résultats positifs. Ainsi, le DTT utilisé dans de fortes concentrations peut induire une erreur d'interprétation de la fonction des cystéines 43 et 51. Ils ont alors répété l'expérience en utilisant un agent réducteur imperméable à la membrane. Il en résulte que les 2 cystéines de la boucle luminale sont importantes dans la réduction de la vitamine K \rightarrow O. Ce sont ces deux acides-aminés qui vont transférer le pouvoir redox aux cystéines du motif CXXC (Rishavy *et al.*, 2010).

L'ensemble des travaux de mutagenèse dirigée des acides aminés pouvant être importants pour l'activité VKOR ont suggéré (1) la participation de l'acide aminé conservé Ser 57 dans la fixation du substrat, (2) l'implication des Cys 132 et 135 dans le centre redox CXXC et enfin (3) l'implication des Cys 43 et 51 dans le transfert du pouvoir réducteur.

En 1981, c'est-à-dire 23 ans avant la découverte du gène *VKORC1*, un mécanisme réactionnel de conversion de l'époxyde de vitamine K en vitamine K quinone fut proposé par Silverman, basé sur des études chimiques (Figure 12).

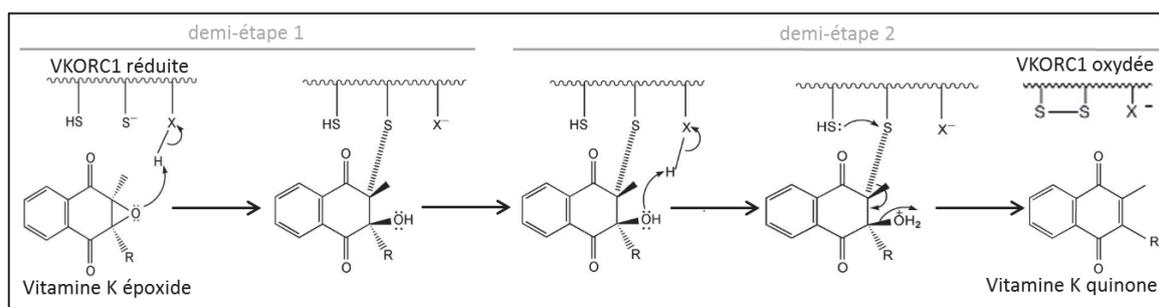


Figure 12 : Mécanisme réactionnel de la réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone (Silverman, 1981)

Ce mécanisme implique un site actif composé de deux cystéines et d'un acide aminé acide qui pourrait jouer le rôle de catalyseur acide-base. Dans la forme oxydée de l'enzyme, ces cystéines, se trouvent sous forme de pont disulfure. Ce pont disulfure est tout d'abord réduit, ce qui permet l'activation de la protéine. L'enzyme réduite fixe alors l'époxyde de la vitamine K et l'atome d'oxygène de cet époxyde est protonné par l'acide aminé acide de VKORC1

proche du site actif. De façon concomitante par un mécanisme vraisemblablement concerté, le thiol d'une des 2 cystéines du site actif attaque le carbone 2 de l'époxyde formant un adduit covalent (demi-étape 1). La protonation du groupement hydroxyle conduit ensuite, toujours par un mécanisme sans doute concerté, au départ du groupement OH⁻ sous forme de H₂O avec formation de la forme oxydée de l'enzyme et de la vitamine K quinone (demi-étape 2) (Figure 12).

Après la demi-étape 1, VKORC1 doit être protonnée pour pouvoir finir son activité VKOR. Toutefois, aucune explication n'a été décrite dans la littérature jusqu'à cette année où Matagrín *et al.* (2013) ont réussi à détailler ce mécanisme catalytique de manière un peu plus poussée, en faisant intervenir la tyrosine en position 139 (qui pour rappel est un aminoacide conservé dans la séquence de VKORC1) comme donneur de proton (Figure 13).

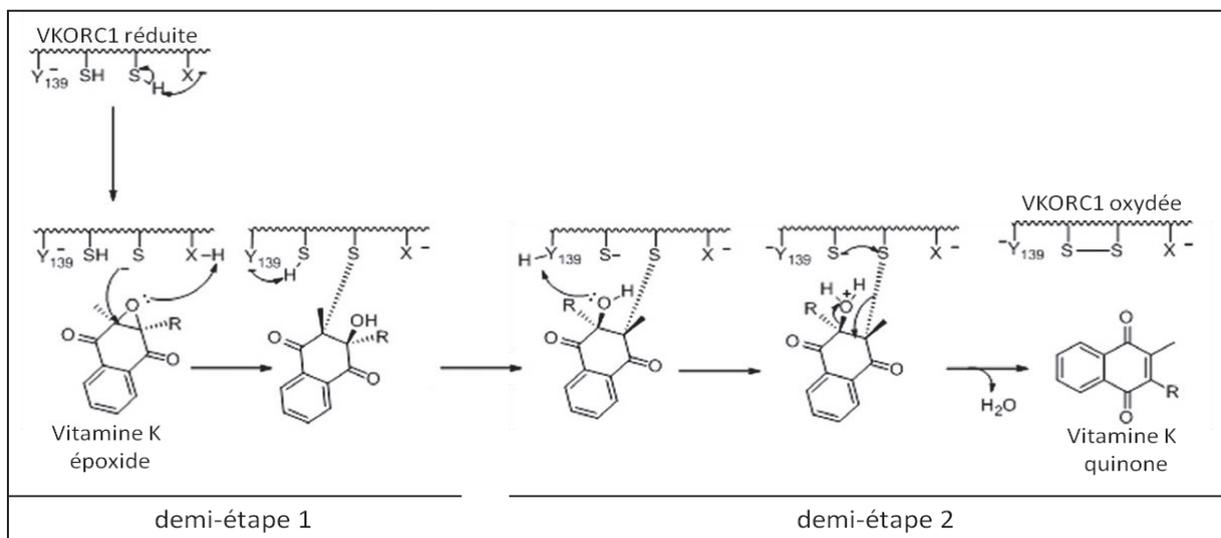


Figure 13 : Mécanisme réactionnel de la réduction de vitamine K époxyde en vitamine K quinone (Matagrín *et al.*, 2013)

En 1983, Fasco *et al.*, découvrent que pour certains rats, l'activité VKOR conduit à la synthèse d'hydroxyvitamine K. Pour rappel, à cette période, le gène de la VKORC1 n'avait pas encore été découvert. Ils en conclurent alors que la formation de l'hydroxyvitamine K résulte d'une conversion non enzymatique. Par ailleurs, en 2011, Watzka *et al.* ont mené une étude sur 626 patients et ont découvert que lorsqu'elle mutée en 139 (Tyr139Ser), la VKORC1 produit de l'hydroxyvitamine K à hauteur de 70% (contre 30% de vitamine K quinone). Ce n'est que cette année que notre laboratoire (Matagrín *et al.*, 2013) a éclairci le mécanisme. Selon nous, la formation d'un hydroxyvitamine K par la VKORC1 mutée en 139 ne résulte pas d'une conversion non enzymatique mais plutôt d'une modification du mécanisme réactionnel, ce qui démontre le rôle crucial de la tyrosine 139 dans ce mécanisme. L'alcool de la Tyr139 intervient dans la protonation du groupement hydroxyle du C3 de l'intermédiaire de la vitamine K produit après la demi-étape 1 (Figure 14).

En absence de tyrosine, un autre proton (du milieu ?) peut être utilisé pour produire de la vitamine K quinone mais la formation de l'hydroxyvitamine K, ne nécessitant pas de protonation, est privilégiée (Figure 14). Ceci conduit également au ralentissement important de la réaction.

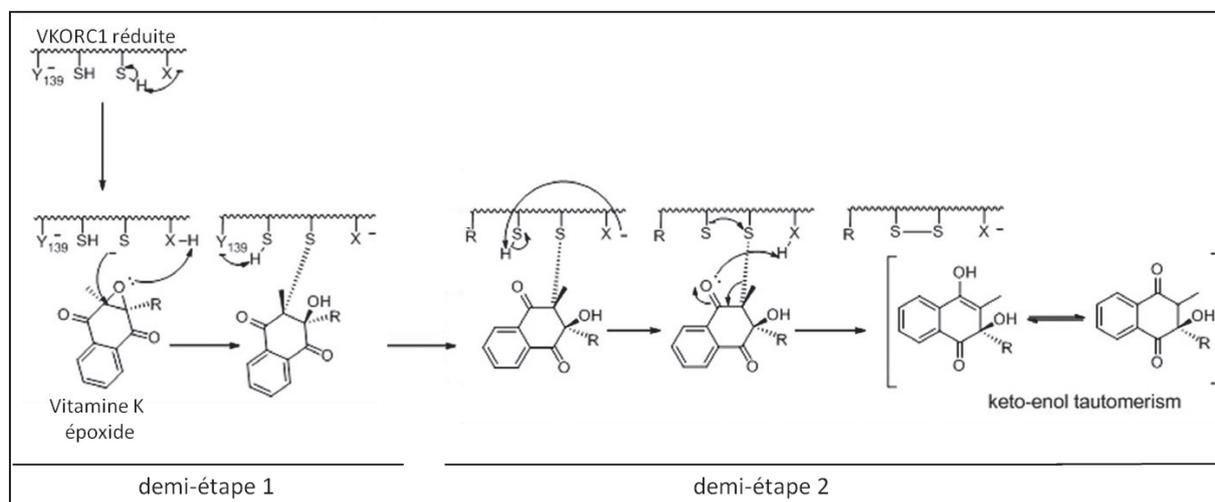


Figure 14 : Formation de 3-OH-vitK quand VKORC1 est mutée en 139 (Matagrín *et al.* 2013)

2.3.2. VKORC1L1

En 2004, le séquençage systématique du génome humain a permis de mettre en évidence l'existence d'un gène paralogue de *VKORC1*. Ce gène fut nommé *VKORC1L1* du fait de l'existence de motifs très similaires à ceux retrouvés dans la *VKORC1*. Ce gène code une protéine de 176 acides aminés (Rost *et al.*, 2004).

VKORC1L1 présente plus de 60 % d'homologie avec *VKORC1*. Il est à noter la stricte conservation du motif CXXC décrit comme le site catalytique de *VKORC1*, des cystéines 43 et 51 supposées participer au transfert interne de pouvoir réducteur, de la tyrosine 139 identifiée comme jouant un rôle majeur dans l'interaction avec l'anticoagulant.

La protéine *VKORC1L1* est très fortement conservée entre les espèces. Ainsi les séquences protéiques sont 100 % identiques entre le rat et la souris, et 97 % identiques entre l'homme et les rat/souris. Une topologie de cette enzyme a été proposée. Cette topologie est calquée sur celle de la *VKORC1* récemment proposée par Li *et al.* (2010). Les extrémités N- et C-terminales seraient localisées du côté cytoplasmique du réticulum endoplasmique et la protéine posséderait 4 domaines transmembranaires (Figure 15).

Jusque très récemment, la *VKORC1L1* constituait une grande inconnue, tant par son activité, son expression tissulaire, que son rôle physiologique. Une seule étude a été publiée et cette étude n'a été publiée qu'en 2011 par Westhofen *et al.* Leurs travaux leur a permis de

démontrer, après expression hétérologue en cellules HEK 293T, que VKORC1L1 possède une activité vitamine K époxyde réductase. Elle est capable au même titre que VKORC1 de catalyser la réduction de l'époxyde de vitamine K (K1 et K2) en vitamine K quinone, puis hydroquinone. Cette activité est inhibée à 29 % par 5 μ M de coumafène (dans les mêmes conditions, VKORC1 est inhibée à 50 %) (Westhofen *et al.*, 2011).

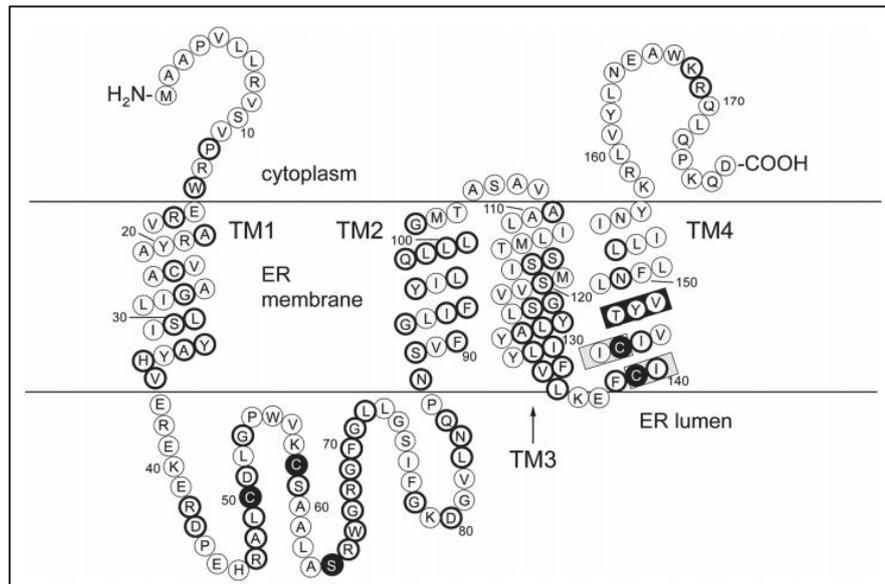


Figure 15 : Topologie de VKORC1L1 proposée par Westhofen *et al.*, 2011

Concernant le rôle physiologique de VKORC1L1, cette étude suggère la participation de VKORC1L1 dans la lutte contre le stress oxydant. En effet, un stress oxydant provoqué par H₂O₂ sur des cellules HEK 293T provoque une augmentation de l'activité VKOR et une augmentation des transcrits VKORC1L1 (alors que ceux de VKORC1 diminuent). Cette observation a permis à Westhofen *et al.* (2011) de proposer l'existence d'un grand cycle de la vitamine K aboutissant à la lutte contre le stress oxydant avec une implication majeure de la VKORC1L1 dans la réduction de la vitamine K quinone en hydroquinone.

Néanmoins, malgré cette étude, la connaissance de VKORC1L1 reste très insuffisante, son expression tissulaire effective restant à ce jour toujours inconnue. La caractérisation enzymatique de cette enzyme et son rôle dans le recyclage de la vitamine K constitue une des parties expérimentales de ce manuscrit.

2.3.3. Partenaire redox de l'activité VKOR

La participation d'autres partenaires protéiques dans cette activité VKOR reste plus que probable. En effet, la présence d'un site actif incluant un motif redox de type CXXC suggère

l'intervention d'un réducteur physiologique. C'est pourquoi les études *in vitro* de l'activité VKOR nécessitent l'utilisation d'un agent réducteur tel que le DTT (dithiothreitol). En effet, pour être active la VKORC1 doit être sous sa forme réduite. Cependant, l'identité de la molécule à l'origine du pouvoir redox reste inconnue.

Le rôle du glutathion en tant qu'agent réducteur a été exclu par des études faites par Whitlon *et al.* (1978).

La thioredoxine proposé comme réducteur physiologique de VKORC1 parce que capable de réduire le motif redox CXXC de VKORC1 (Van Haarlem *et al.*, 1987 ; Silverman et Nandi, 1988), a pu lui aussi être exclu par les études de Preusch (1992). Par la suite, divers réducteurs physiologiques de VKORC1 ont été proposés, à commencer par la protéine disulfure isomérase (PDI) énoncée en 2004 par Goodstadt et Ponting. L'année suivante, Stafford (2005) montre que lorsque la PDI est ajoutée à des microsomes, l'activité VKOR est mesurable sans ajout de DTT. De plus, par immunoprécipitation, puis analyse en 2D-SDS-PAGE, la VKORC1 apparaît étroitement associée à la PDI (Wajih *et al.*, 2007). La PDI est une « thioredoxine-like (Trx-like) oxydoréductase » luminale. Elle est capable de fournir des électrons pour la réduction du centre redox de VKORC1. Son pouvoir réducteur lui est transmis *via* le « folding » des protéines. Néanmoins la participation de la PDI a par la suite été remise en question par les études de co-immunoprécipitation (Schulman *et al.*, 2010) de VKORC1 avec les 20 protéines Trx-like que compte le réticulum endoplasmique des mammifères. Parmi ces protéines, 12 ont au moins un motif CXXC (Hatahet et Ruddock, 2009). Malgré tout, ces études montrent l'éventuelle participation de 2 autres protéines appartenant à la famille des Trx-like, la TMX, la TMX4. Ainsi, le modèle proposé par Wajih *et al.* (2007) resterait valable en remplaçant la PDI par une des TMX.

TMX et TMX4 sont deux protéines membranaires et présentent un motif CXXC avec une proline comme deuxième acide aminé du motif (soit CPXC). Cette proline semble importante dans l'interaction avec VKORC1 car quand muté en alanine alors une forte diminution des interactions est observée. A noter qu'une autre protéine de type Trx-like semble également interagir avec la VKORC1 : il s'agit de l'ERp18, une protéine soluble. Parmi toutes les protéines testées, seules ces 3 protéines présentent une interaction avec la VKORC1. Ce sont également les seules composé d'un unique motif CXXC.

Lorsque dans la séquence peptidique de VKORC1 la cystéine 43 de VKORC1 est remplacée par une alanine, alors la VKORC1 ne semble ne plus interagir avec plus aucun agent réducteur laissant l'enzyme inactive. Cette interaction conforte l'hypothèse selon laquelle le pouvoir réducteur soit transmis dans un premier temps aux cystéines 43 et 51. De plus, les protéines Trx-like ne pénètrent pas dans la membrane et ne peuvent apporter le pouvoir redox au motif CXXC du site actif. Ceci rejoint l'idée que les cystéines 43 et 51 de la boucle luminale sont nécessaires au transfert du pouvoir redox entre le partenaire redox et le site

actif enfoui dans la membrane (Rishavy *et al.*, 2010). Cet échange entre les 2 paires de cystéines conforte la topologie de VKORC1 proposée par Li *et al.* en 2010. En effet, dans la topologie de Tie *et al.* (2005) les deux paires de cystéines seraient trop éloignées pour qu'elles puissent interagir, tandis que la topologie à 4 segments transmembranaire les rapproche suffisamment pour que le transfert du pouvoir redox s'effectue (figure 10).

Face à l'ensemble de ces hypothèses, la recherche du(es) réducteur(s) physiologique(s) reste d'actualité et représente un enjeu majeur pour la compréhension des conséquences fonctionnelles des mutations spontanées détectées chez l'homme et l'animal.

2.3.4. Complexe enzymatique ou pas ?

Depuis la découverte en 2004 d'un gène codant pour une unique protéine pouvant catalyser la réaction VKOR, le postulat qui voulait que ce soit un complexe multienzymatique qui assure la réduction de la vitamine K₁₀ est remis en question. A ce jour, aucune réponse ne peut être apportée. Pour Stafford (2005), VKORC1 devrait former un complexe avec une voire plusieurs protéines car sa solubilisation avec un détergent conduit à une perte de l'activité VKOR. L'équipe de Wallin propose que VKORC1 forme un complexe avec une époxyde hydrolase microsomale (EHM) et une glutathion-S-transferase (GST) (Guenther *et al.*, 1998) ou encore avec la caluménine (Wallin *et al.*, 2001 puis 2004). Cependant, il a été démontré que le KO du gène codant pour l'EHM chez la souris n'a aucune incidence sur l'activité VKOR. Quant à la GST, aucune donnée confirme ou infirme l'hypothétique complexe qu'elle formerait avec la VKORC1. Par ailleurs, la solubilisation déstructure plus que probablement l'enzyme ce qui explique sa perte d'activité. Toutefois, Li *et al.* (2010) réussissent à obtenir un cristal d'une VKORC1 bactérienne qui s'avère former un complexe avec la PDI. Par ailleurs, nous savons désormais que chez les organismes eucaryotes la VKORC1 nécessite l'action d'une protéine à activité redox de type Trx-like : Ces deux protéines forment-elles un complexe ? La question reste toujours sans réponse.

En 1997, Cain *et al.* ont invalidé l'hypothèse que les deux enzymes principales du cycle de la vitamine K puissent former un complexe stable étant donné que la VKORC1 et la GGX peuvent être aisément séparées par des méthodes de chromatographie. Cette hypothèse semble d'autant plus vraie car ces deux enzymes isolées conservent leur activité. Toutefois, Rishavy *et al.* (2010) décrivent qu'en formant un complexe, l'activité VKOR voit son efficacité multipliée par 3 à 4.

2.3.5. Activité VKR

Cette activité constitue la seconde étape dans la réduction de la vit>O. Assurée par VKORC1 et VKORC1L1, la réaction VKR est également catalysée par une NADPH quinone oxydoréductase (NQO), encore appelée DT-diaphorase, et plus précisément par la protéine NQO1. Cette enzyme est une flavoprotéine cytosolique de 273 acides aminés exprimée sous forme de dimère (figure 16). Chaque sous-unité du dimère fixe de façon non-covalente une molécule de FAD et cette fixation est permanente tout au long du cycle catalytique.

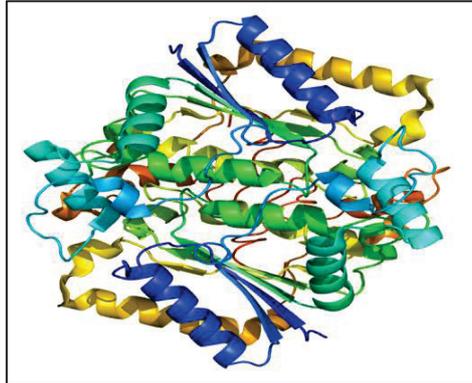


Figure 16 : Structure de NQO1 sous sa forme homo-dimère.

Cette enzyme catalyse donc la réduction des quinones (dont la vitamine K quinone) en hydroquinone en présence de NADPH. La réaction suit un mécanisme de type ping-pong, c'est-à-dire que le NADPH et le substrat entrent alternativement dans le même site de fixation. La NQO1 est une enzyme majeure du métabolisme des xénobiotiques (Bianchet *et al.*, 2008), mais elle contribuerait également à la réduction de la vitamine K quinone en hydroquinone (Wallin and Hutson, 1982 ; Wallin *et al.*, 1978). En effet, la NQO1 est partiellement inhibée par le dicoumarol et autres AVK (Ernster *et al.*, 1962) et elle fut initialement isolée en tant que vitamine K réductase. Néanmoins, comme la VKORC1 est également capable de catalyser la réduction de la quinone en hydroquinone, la contribution de la NQO1 dans cette activité n'est pour l'instant pas objectivée. En effet, la vitamine K hydroquinone est un composé très instable en présence d'oxygène rendant la détermination de l'activité vitamine K réductase très difficile.

Un récent article décrit que des souris *Nqo1*^{-/-} ne présentent aucune modification de l'activité VKR comparativement à des souris saines. Ces données, publiées par Ingram *et al.*, remettent en cause la contribution de NQO1 dans le cycle de la vitamine K.

Au terme de cette activité VKR, la vitamine K se retrouve à nouveau sous sa forme hydroquinone et ainsi peut être utilisée comme cofacteur par la GCX.

2.4. INHIBITION DE L'ACTIVITE VKOR

2.4.1. Historique

Les antivitamine K (AVK) ont été découverts par hasard, au Canada et au nord des Etats Unis en 1920. A cette époque, des bovins présentent des épisodes hémorragiques spontanés fatals. En 1922, F.W. Schofield, un vétérinaire américain montre que ces troubles sont liés à l'utilisation de la luzerne (trèfle doux) ou du mélilot (*Melilotus alba* ou *Melilotus officinalis*) importé d'Europe. Il note que ces aliments sont avariés au moment de la consommation à cause du délai d'importation. Ces hémorragies sont provoquées par une augmentation du temps de coagulation. Il constate que le retrait du trèfle doux de l'alimentation, ainsi que la transfusion des bestiaux, permet de guérir cette maladie (Schofield, 1922).

En 1939, l'équipe de Karl Paul Link isole la structure cristalline de l'agent hémorragique, la 3,3'-diméthylène-4-hydroxycoumarine, appelée encore dicoumarol. Cette molécule explique la nocivité du trèfle doux avarié, le trèfle frais étant inoffensif. Lors de la dégradation du trèfle doux, la coumarine est oxydée en 4-hydroxycoumarine, couplée au formaldéhyde et enfin dimérisée pour produire le dicoumarol (Figure 17).

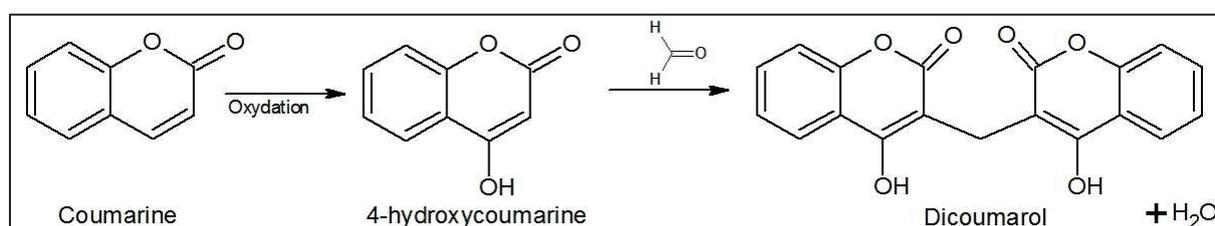


Figure 17 : Formation du dicoumarol

En 1935, le test du temps de prothrombine a été développé par Quick et ses collaborateurs (Quick *et al.*, 1935). La mise au point de ce test leur a permis de démontrer en 1937 l'augmentation du temps de prothrombine dans la maladie du trèfle doux avarié et dans la maladie hémorragique du poulet. Karl Paul Link démontre par la suite que l'action délétère du dicoumarol peut être contrée par l'injection de vitamine K. Ce résultat a permis de révéler l'action antivitamine K du dicoumarol (Link, 1959).

Aujourd'hui les traitements anticoagulants suivent deux stratégies thérapeutiques :

- Inhibition de l'activité des facteurs de la coagulation : utilisation d'héparines ou de nouvelles molécules anticoagulantes tels que des dérivés de l'hirudine ou de la danaparoiïde).
- Inhibition de la synthèse de certains facteurs de la coagulation : utilisation d'AVK.

2.4.2. Structures / Propriétés physico-chimiques des AVK

Les AVK peuvent être classés en trois grandes familles, les dérivés de la 4-hydroxy-coumarine, les dérivés de la 4-hydroxy-thiocoumarine et les dérivés de l'indane-1,3-dione (figure 18).

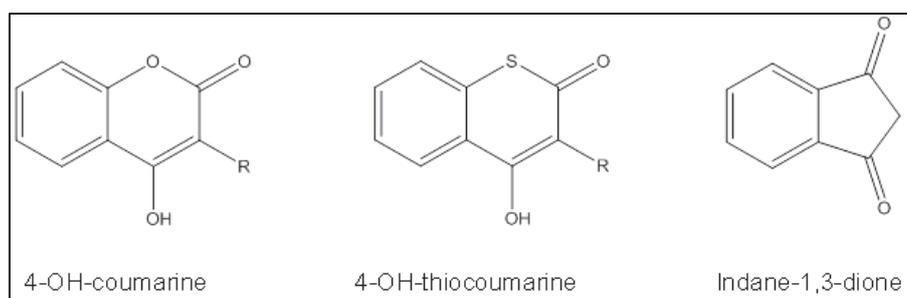


Figure 18 : Structure chimique des différentes familles d'AVK

En médecine humaine, seuls sont utilisés les dérivés de la 4-hydroxy-coumarine avec l'acénocoumarol (SINTROM®, MINISINTROM®), le coumafène (COUMADINE®) et le tiocloumarol (APEGMONE®) et les dérivés de l'indane-dione avec, le fluindione (PREVISCAN®) et le phenindione (PINDIONE®). En France, seuls sont utilisés le coumafène, l'acénocoumarol et le fluindione (figure 19).

En matière de lutte contre les rongeurs, les AVK utilisés appartiennent aux 3 familles chimiques précédemment décrites. Le coumafène n'est plus utilisé en raison de sa très faible efficacité par rapport aux autres molécules. Parmi les molécules utilisées, nous citerons la bromadiolone, le difénacoum et le brodifacoum comme dérivé 4-hydroxycoumarine; la diféthialone comme dérivé 4-hydroxy-thiocoumarine ; la chlorophacinone comme dérivé indane-1,3-dione (figure 20).

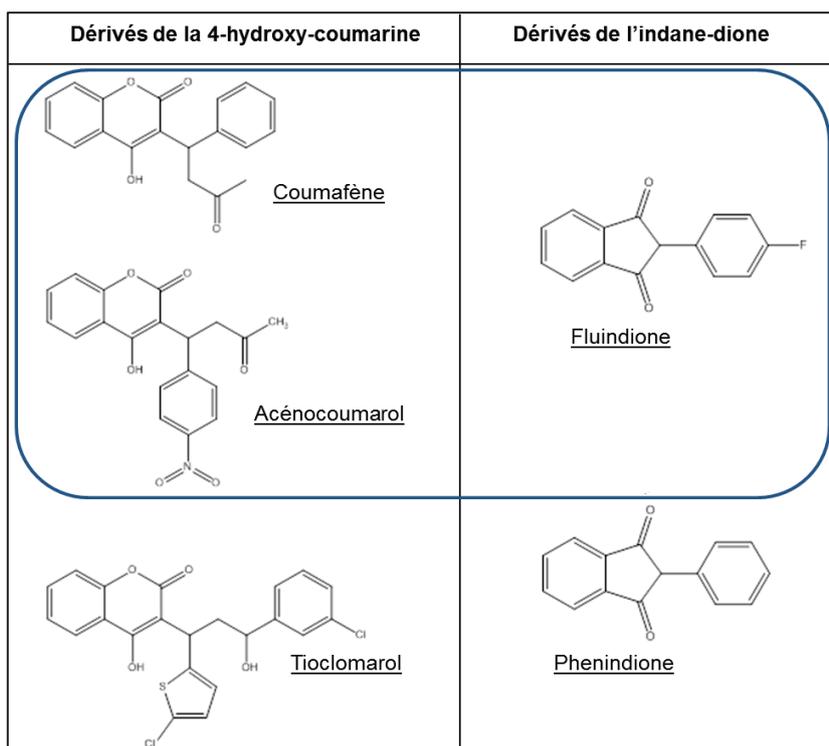


Figure 19 : Structure chimique des AVK utilisés en médecine humaine. Sont encadrés en bleu ceux utilisés en France

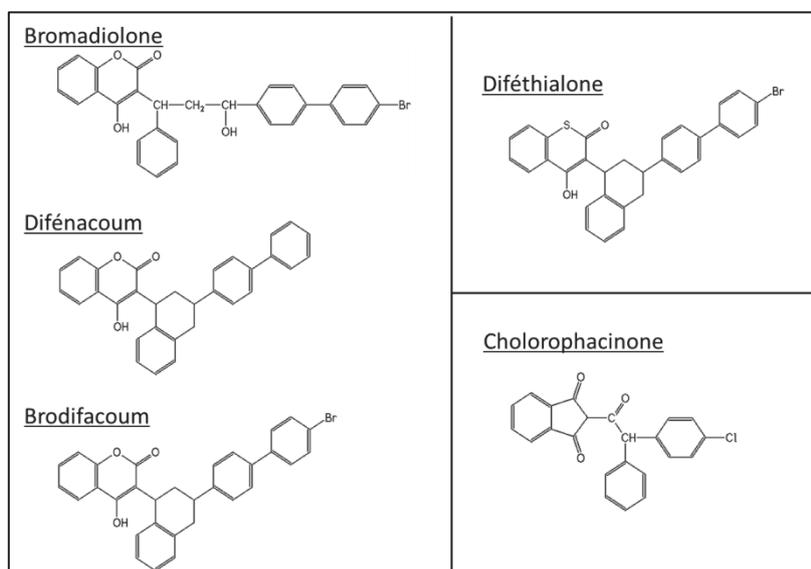


Figure 20 : Structures chimique de quelques AVK utilisés comme rodenticides.

Ces dérivés présentent tous une analogie structurale avec la vitamine K. Les propriétés physico-chimiques de tous ces anticoagulants varient avec la nature de leur chaîne latérale et la présence ou non d'halogènes (Tableau 2).

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques des principaux anticoagulants

	Formule brute	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Point de Fusion (°C)	Solubilité
Coumafène	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	308,32	161	Soluble dans acétone Insoluble dans eau
Acénocoumarol	C ₁₉ H ₁₅ NO ₆	396,51	196-199	Presque insoluble dans tous les solvants organiques et l'eau
Phénindione	C ₁₅ H ₁₀ O ₂	222,23	149-151	Soluble dans solvants organiques Insoluble dans eau froide
Fluindione	C ₁₅ H ₉ FO ₂	240,24	120	Soluble dans solvants organiques Insoluble dans eau froide
Bromadiolone	C ₃₀ H ₂₄ BrO ₄	527,4	200-210	Soluble dans acétone Insoluble dans eau, hexane et éther
Difénacoum	C ₃₁ H ₂₄ O ₃	444,5	215-217	Insoluble dans eau Peu soluble dans alcool et benzène Soluble dans acétone
Brodifacoum	C ₃₁ H ₂₃ O ₃	523,4	228-232	Soluble dans acétone et chloroforme Peu soluble dans eau et benzène
Chlorophacinone	C ₂₃ H ₁₅ O ₃ Cl	374,82	141-145	Soluble dans acétone et méthanol Insoluble dans eau
Diféthialone	C ₃₁ H ₂₃ BrO ₂ S	539,5	-	Peu soluble dans eau et acétone Soluble dans diméthylformamide

2.4.3. Mécanisme d'action

Les AVK sont des anticoagulants oraux qui interviennent de manière indirecte sur la coagulation en inhibant l'activité VKOR. *Ex vivo*, lorsque des microsomes hépatiques de rats utilisés comme source d'enzyme(s) à activité VKOR, l'inhibition est de type non compétitif et les constantes d'inhibition vont de 0,7 µM pour le coumafène (figure 21) à 5 nM pour le brodifacoum.

Etant donné l'homologie structurale des AVK et de la vitamine K époxyde, Li *et al.* (2010) proposent qu'ils partagent le même site de fixation. Toutefois, le caractère non compétitif et irréversible de cette inhibition laisse penser que l'AVK et la vitamine K époxyde ne se fixe pas au même endroit sur VKORC1 (Rishavy *et al.*, 2010). Si le site de fixation des AVK n'est pas clairement défini, une hypothèse implique la tyrosine 139 de la VKORC1 dans cette liaison et plus précisément du motif TYA (Thréonine – Tyrosine – Alanine) (Rost *et al.*, 2005 ; Ishizuka *et al.*, 2008).

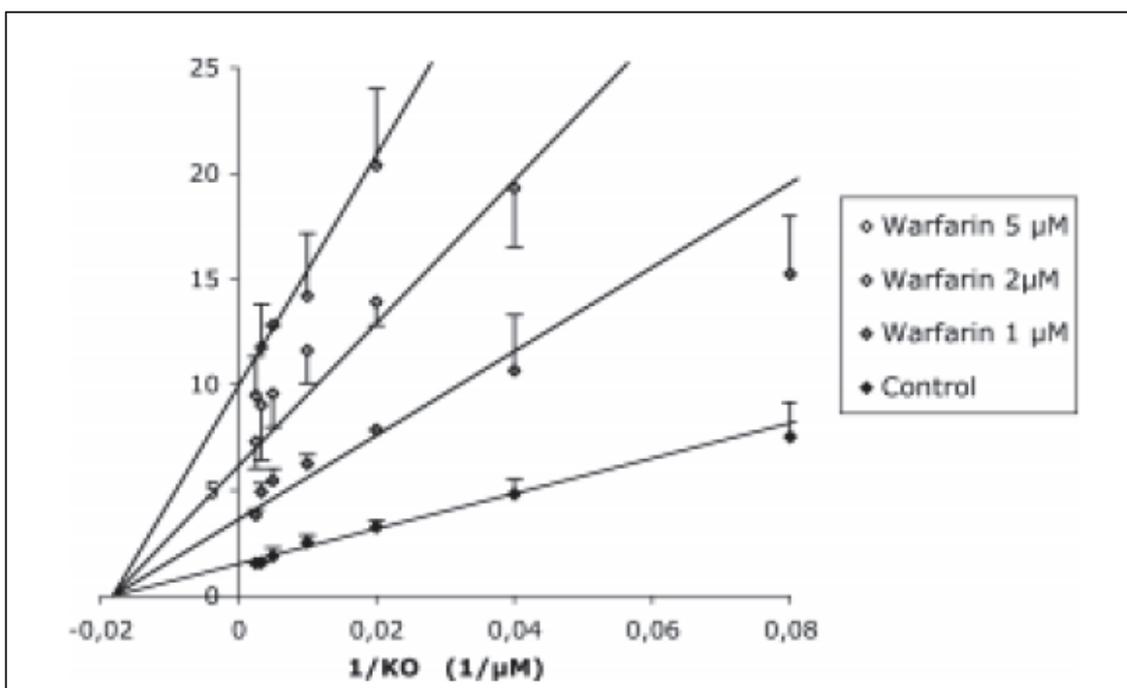


Figure 21 : Représentation Lineweaver et Burk d'une inhibition non-compétitive de l'activité VKOR par des microsomes de foies de rats sensibles (Lasseur *et al.*, 2005).

L'utilisation des AVK a pour résultat le blocage du cycle de la vitamine K en inhibant deux étapes successives du cycle : la réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone (activité VKOR), mais aussi la réduction de la vitamine K quinone en hydroquinone (activité VKR) par la VKORC1 (Li *et al.*, 2004 ; Rost *et al.*, 2004).

L'arrêt du cycle de la vitamine K entraîne une diminution de la vitamine K disponible et donc une diminution de l'activité gamma-glutamyl-carboxylase. Les facteurs de la coagulation vitamine K dépendant restent alors sous forme non-gamma-carboxylée et voient leur activité pro-coagulante fortement diminuée : ils sont alors appelés PIVKA (protein induced by vitamine K antagonist). Leur dosage permet de caractériser un état de subcarence en vitamine K.

Les facteurs de coagulation étant sous forme non-gamma-carboxylée, le calcium ne peut pas être fixé par la pince « di-carboxylique », ce qui empêche l'interaction avec les phospholipides anioniques plaquettaires. Les AVK induisent ainsi une augmentation du temps de coagulation et retardent la formation de fibrine (revoir la cascade de coagulation, figure 6).

En dépit de leur utilisation intensive dans le monde entier, le mode d'action des antagonistes de la vitamine K est resté incertain. Le mécanisme d'inhibition proposé par Silverman (1980)

implique l'acylation par l'inhibiteur d'une des 2 cystéines du site catalytique de VKOR ou éventuellement d'un acide aminé nucléophile et proche dans l'espace (figure 22). Le thioester produit (si une des 2 cystéines est le nucléophile) rendrait compte du caractère irréversible de l'inhibition et de son mécanisme non compétitif. Cependant, l'instabilité relative de ce thioester rendrait sa mise en évidence difficile à pH neutre.

D'autres études indiquent que l'effet inhibiteur du coumafène serait plus important lorsque la VKOR est incubée avec l'inhibiteur préalablement à l'introduction du dithiothréitol (Fasco *et al.*, 1983). Les auteurs en concluent que le coumafène interagirait avec la VKOR oxydée et bloquerait la réduction de la VKOR contredisant le mécanisme décrit par Silverman (1980). Enfin, plus récemment, Rishavy *et al.* (2010) propose l'hypothèse selon laquelle la fixation du coumafène constituerait une barrière empêchant la cascade de transfert d'électrons nécessaire à l'activation de la VKORC1.

Le mécanisme de l'inhibition n'est donc toujours pas clairement établi.

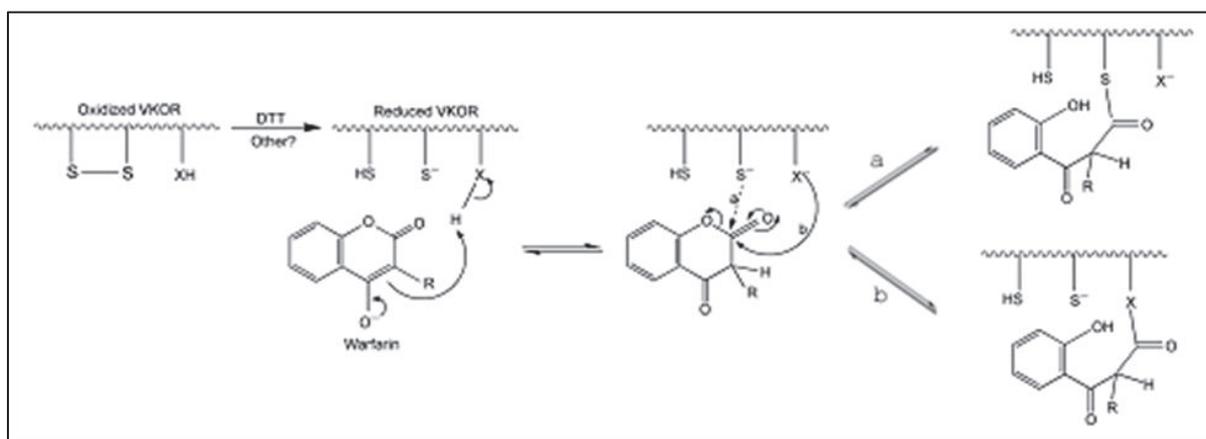


Figure 22 : Mécanisme d'inhibition de VKORC1 par les AVK selon Silverman, 1980

2.4.4. Métabolisme des AVK

L'ensemble des xénobiotiques administrés à un organisme subit d'importantes biotransformations se déroulant selon quatre étapes, l'entrée dans la cellule, les phases de bio-activation puis de conjugaison et enfin la sortie de la cellule. La phase de bio-activation met en jeu des réactions de réduction, d'hydrolyse ou d'oxydation ; ces dernières étant de loin les plus fréquentes. Le métabolisme oxydatif médié par les cytochromes P450 (CYP) représente certainement la voie prédominante suivie par la majorité des xénobiotiques.

Les CYP-450 constituent une superfamille d'enzymes divisée en familles dont les membres présentent un pourcentage d'homologie de 40% dans leur séquence protéique. Ces familles

sont subdivisées en sous-familles dont les membres présentent une similitude de 55% de leur séquence protéique.

Parmi les principaux cytochromes ayant un rôle important en pharmacologie humaine, on distingue les CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6, CYP3A5 et CYP2C19.

Chez le rat, les principaux CYP-450 sont le CYP3A, les CYP2C11 et 2C12, les CYP2B et 1A (1 et 2). Les CYP2D et 2E sont très minoritaires. De plus, il existe des spécificités de sous-famille CYP-450 en fonction du sexe de l'animal. En effet, les femelles sur-expriment le CYP2C12 et sont dépourvus de CYP3A tandis que les jeunes mâles sous-expriment le 2C11.

En règle générale, la biodisponibilité des AVK est proche de 100%.

2.4.4.1. Métabolisme des AVK chez l'homme. L'exemple du coumafène

Chez l'homme, le métabolisme de la plupart des AVK coumariniques est principalement dépendant de l'hydroxylation par le CYP2C9 localisé dans le foie.

Le coumafène (ou warfarin), commercialisé en France sous le nom de Coumadine[®], est un mélange racémique de deux énantiomères R et S aux propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques différentes. Le S-coumafène (3 à 5 fois plus actif que le R-coumafène) est métabolisé en composés inactifs (6- et 7- hydroxy-coumafène) par le CYP2C9. Le R-coumafène est quant à lui métabolisé par de nombreux cytochromes (principalement par le CYP2C19) (Uno *et al.*, 2008) (Figure 23). Les métabolites ainsi hydroxylés sont ensuite éliminés dans la bile et les urines.

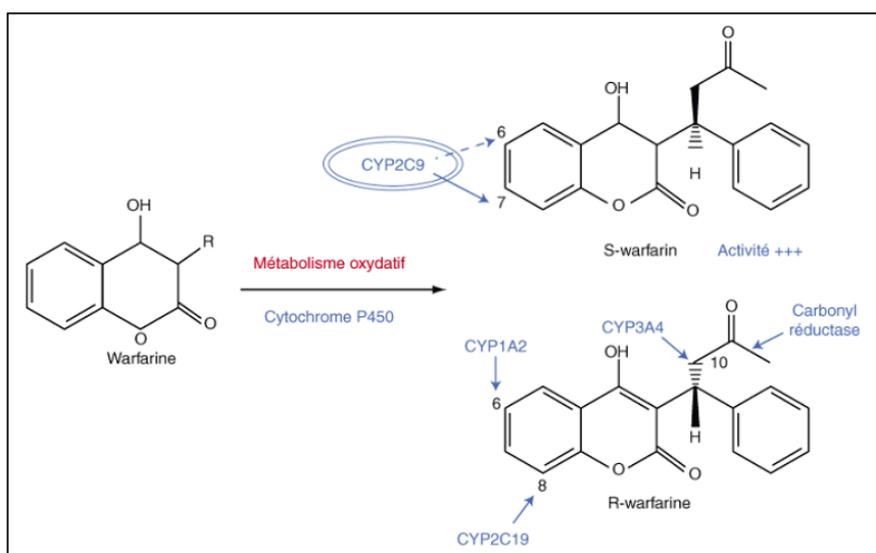


Figure 23 : Métabolisme du coumafène chez l'homme

2.4.4.2. Métabolisme des AVK chez le rat. L'exemple du coumafène

Même si peu d'informations sont connues sur le métabolisme des AVK par les rongeurs, il a été décrit que chez le rat. L'oxydation du coumafène est principalement catalysée par les CYP1A1, CYP2B1, CYP2C6, CYP2C11 et CYP3A2 (Guenguerich *et al.*, 1982). Ce métabolisme oxydatif aboutit à la production de 5 métabolites différents, 4'-OH-coumafène, 6-OH-coumafène, 7-OH-coumafène, 8-OH-coumafène et 10-OH-coumafène (Figure 24). Ces métabolites sont ensuite glucuronconjugués puis éliminés dans les urines (Ischizuka *et al.*, 2008).

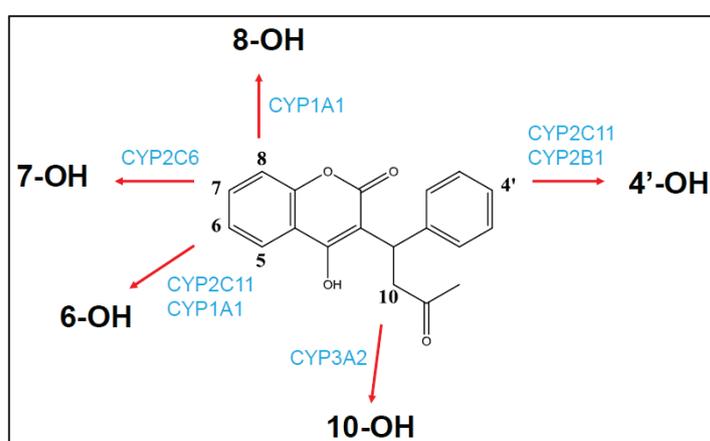


Figure 24 : Métabolisme du coumafène chez le rat

Le métabolisme des autres AVK utilisés comme rodenticides chez les rongeurs reste de nos jours inexploré.

2.4.5. Utilisation pratique des AVK

Vers la fin des années 30, sur la base du travail de Link et Campell (Link, 1959), le dicoumarol (antagoniste de la vitamine K) a été soumis à des essais cliniques dans l'hôpital Général du Wisconsin et de la Clinique de Mayo comme un anticoagulant par voie orale dans la prévention des thromboses veineuses et artérielles. Il a été pendant plusieurs années l'anticoagulant oral le plus populaire. Tout en travaillant à synthétiser des antagonistes de la vitamine K plus puissants, Link a développé un rodenticide en 1948, le coumafène. En 1951, les premières études ont été menées pour introduire le coumafène comme anticoagulant thérapeutique. Il a été jugé supérieur au dicoumarol, et a été approuvé en 1954 pour un usage médical.

2.4.5.1. Utilisation pratique des AVK en médecine humaine

Les AVK sont majoritairement indiqués dans le cadre d'un traitement chronique (environ 80% des prescriptions). Plus de la moitié des affections ainsi visées sont des cardiopathies de type arythmie, insuffisance cardiaque, endocardites sur valve et cardiomyopathies. Les autres indications concernent essentiellement l'infarctus du myocarde et le port de prothèses valvulaires. L'utilisation d'AVK a pour but de prévenir d'éventuelles complications thromboemboliques artérielles et veineuses.

Les accidents iatrogènes observés lors de la mise en place du traitement peuvent être dus soit à l'hypersensibilité des patients soit à un phénomène de résistance. Parmi tous les patients traités, 12% présentent un grave épisode de saignement et 2% d'entre eux en meurent (Stafford, 2005).

En 2011, le coumafène était le 11^{ème} médicament le plus prescrit aux USA (avec une moyenne d'un million de patients traités par an).

2.4.5.1.1. Evaluation de la réponse aux AVK chez l'homme

L'évaluation de la réponse aux AVK se fait grâce au test biologique du temps de Quick (TQ), également connu sous le nom de taux de prothrombine. Ce test consiste à mesurer le temps que met le plasma sanguin à coaguler quand on le met en présence d'un extrait de tissu humain, animal ou synthétique appelé thromboplastine, cytozyme ou thrombokine. Il s'agit d'un ensemble de protéines permettant d'activer la voie extrinsèque de la coagulation et en particulier le facteur VII. L'activation de ce facteur permet ensuite d'activer le facteur X, c'est-à-dire de transformer la prothrombine en thrombine (Figure 6). Durant les premiers jours de traitement par AVK, la prolongation du TQ reflète principalement une réduction du facteur VII. Après, elle reflète également une réduction des facteurs II et X. Le TQ est réalisé en ajoutant du calcium et de la thromboplastine au plasma citraté du patient. La capacité de réaction d'une thromboplastine peut être mesurée en calculant son indice de sensibilité intrinsèque (ISI). Cet ISI est très variable d'une thromboplastine à une autre. La sensibilité d'une thromboplastine augmente quand son ISI diminue. Ces différences ont provoqué une difficulté à trouver un consensus sur les valeurs cibles recommandées : en effet, la plupart des laboratoires européens utilisaient des thromboplastines beaucoup plus sensibles que celle utilisée aux Etats-Unis. C'est pourquoi un autre modèle d'expression des résultats a été mis en place en 1982 et adopté par l'ensemble des pays : l'INR (International Normalised Ratio). Il permet une standardisation des tests en autorisant la comparaison des mesures malgré les différences de thromboplastine.

L'INR est défini comme étant le rapport du temps de Quick du malade sur celui d'un témoin (moyenne géométrique du temps de Quick d'une trentaine de plasmas sains), élevé à la puissance ISI. Ce rapport permet ainsi de minimiser la variabilité inter-laboratoires.

$$\text{INR} = (\text{TQ}_{\text{malade}} / \text{TQ}_{\text{témoin}})^{\text{ISI}}$$

La surveillance biologique d'un traitement par les AVK repose donc aujourd'hui uniquement sur la mesure de l'INR (Andrews *et al.*, 1995). Chez le sujet sain non anticoagulé, l'INR est voisin de 1. Il augmente proportionnellement au degré d'hypocoagulabilité. Pour la majorité des indications, la zone thérapeutique est définie par un INR entre 2 et 3. Au cours d'un traitement, un INR inférieur à 2 reflète une anticoagulation insuffisante augmentant le risque thrombotique. Un INR supérieur à 3 traduit une anticoagulation trop importante et représente donc un risque de saignement. Au-delà de 5, le risque hémorragique est inacceptable.

L'INR doit être mesuré toutes les 48 heures au début du traitement pour ajustement de la dose, puis le contrôle se fait toutes les deux semaines. Les AVK sont souvent prescrits pour de longue période, et les principales complications d'un tel traitement sont des hémorragies qui surviennent soit suite à un surdosage, soit à cause d'une lésion hémorragique. Ces complications justifient les contrôles réguliers.

2.4.5.1.2. Intoxication aux AVK chez l'homme

L'utilisation d'AVK est systématiquement associée à un risque accru d'hémorragie.

Lors de traitement aux AVK, un INR > 5 nécessite une correction de l'hypocoagulabilité immédiate. Le traitement est alors immédiatement interrompu. Par ailleurs, la vitamine K constitue un antidote efficace étant donné que la seule administration de vitamine K1 permet le retour en 6 à 12 heures à un seuil de sécurité défini par un INR < 1,5.

Des cas d'intoxications volontaires ou non avec des AVK (raticides) nécessitent également une intervention immédiate. Ainsi, chaque année en France, le Centre anti-poison reçoit environ 300 appels pour exposition aux rodenticides dont environ 200 concernent les enfants ; sur ces enfants, 41% sont âgés de 1 à 4 ans (Berny *et al.*, 2010). De rares cas d'intoxications volontaires ont été rapportés, mais à chaque fois l'administration de vitamine K a permis la survie du patient. Ce traitement antidotique peut être couplé à un lavage gastrique et à une transfusion si nécessaire.

2.4.5.1.3. Facteurs influençant la réponse aux AVK

La difficulté de maniement des médicaments antivitamine K s'explique par leur marge thérapeutique étroite et par la grande variabilité inter et intra-individuelle observée dans la réponse au traitement. Différents facteurs non génétiques ont été mis en cause dans cette variabilité.

2.4.5.1.3.1. Caractéristiques démographiques du patient

- L'âge : la dose moyenne nécessaire pour atteindre l'équilibre diminue de 8 à 10% par décennie, le vieillissement physiologique aboutissant à une diminution des fonctions hépatiques.
- Le sexe : les femmes nécessitent des doses plus faibles que les hommes.
- Le poids : une corrélation significative entre le poids du patient (et par conséquent son indice de masse corporelle) et la dose à l'équilibre a été démontrée dans certaines études (Carlquist *et al.*, 2006 ; Wadelius *et al.*, 2007).

2.4.5.1.3.2. Caractéristiques clinico-biologiques

De nombreuses comorbidités telles que l'insuffisance hépatique, l'insuffisance rénales sévère, l'insuffisance cardiaque, les dysthyroïdies et les pathologies intercurrentes (fièvre, diarrhées...) jouent un rôle dans l'instabilité du traitement par AVK (Penning-van Beest *et al.*, 2001).

2.4.5.1.3.2. Facteurs environnementaux

Une alimentation équilibrée est recommandée chez les patients traités par AVK. En effet, un régime alimentaire dépourvu en légumes verts peut entraîner une carence en vitamine K contribuant à l'instabilité du traitement (Franco *et al.*, 2004 ; Rombouts *et al.*, 2007). De la même façon, un régime riche en légumes verts est également déconseillé en raison d'un apport exogène en vitamine K trop important.

De plus, de nombreux médicaments influencent la réponse au traitement. En effet, le coumafène est à la fois l'AVK le plus prescrit, mais également celui le plus incriminé de sa classe thérapeutique dans les interactions médicamenteuses (Nutescu *et al.*, 2006 ; Bates *et al.*, 2008).

2.4.5.2. Utilisation pratique des AVK dans la gestion des populations de rongeurs

En 1941, Campbell et Link (Link, 1959) ont isolé le dicoumarol, responsable d'une maladie hémorragique du bétail. Ils ont également observé que l'administration de vitamine K bloquait l'action du dicoumarol, suggérant l'effet antivitamine K du dicoumarol. L'intérêt pratique de cette découverte fut mis en évidence en 1948 par O'Connor *et al.* (1948) qui proposa l'utilisation du dicoumarol comme raticide. Depuis cette découverte, l'utilisation des AVK a largement supplanté celle des toxiques aigus directs, tel que la strychnine. Leur utilisation permet d'envisager une éradication massive des rongeurs en particulier sur de grandes surfaces et la création de zones, voire de villes exemptes de rongeurs. En effet, l'utilisation d'AVK permet d'obtenir un effet retardé permettant d'éviter les phénomènes d'aversion alimentaire.

2.5. RESISTANCE AUX AVK

2.5.1. Résistance chez les rongeurs

L'utilisation fréquente du coumatène a conduit à l'apparition d'un phénotype de résistance vis-à-vis des AVK chez les rongeurs. Cette résistance a d'abord été observée chez le rat en 1958 à Scotland (Boyle, 1960) puis quelques années plus tard chez la souris. Cette résistance est observée partout dans le monde mais c'est en Europe qu'elle est le plus étudiée (Figure 25).

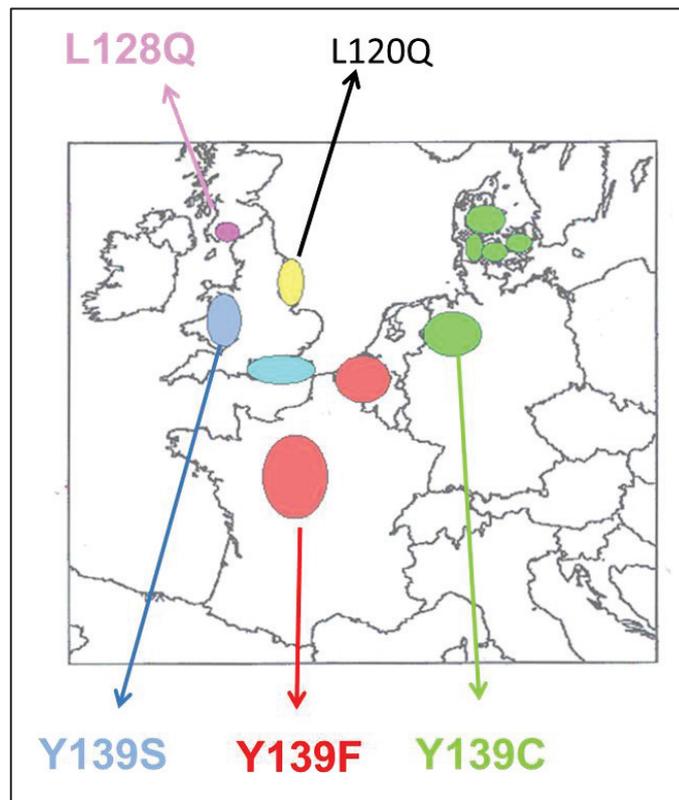


Figure 25 : Principale mutation de VKORC1 observée chez le rat dans les régions d'Europe

La définition de la résistance aux anticoagulants chez les rongeurs a évolué au cours du temps et au fur et à mesure de la mise sur le marché des diverses molécules anticoagulantes. Il semble nécessaire de ne pas confondre des situations de non-consommation des appâts ou de faible sensibilité naturelle des rongeurs avec une situation de résistance avérée. En effet, cette résistance doit être génétique et potentiellement transmissible aux portées de jeunes rongeurs. Diverses définitions ont été données. Nous retiendrons la définition qui fût proposée par Greaves *et al.* en 1994 qui fait bien apparaître trois éléments fondamentaux de la résistance aux anticoagulants : « La résistance aux anticoagulants est une perte majeure d'efficacité de ces derniers lors d'une utilisation

correcte dans les conditions normales. Cette perte d'efficacité est due à la présence de lignées de rongeurs possédant une sensibilité aux anticoagulants notablement réduite et transmissible génétiquement. ».

La résistance génétique chez le rat est principalement due à deux mécanismes (Matagrín *et al.*, 2013) :

- l'inefficacité vis-à-vis de VKORC1, la cible des AVK.
- la dégradation plus rapide de l'inhibiteur par les cytochromes P450.

L'identification des mutations du gène *Vkorc1* chez les rongeurs a fait l'objet de nombreuses études. A partir de différentes populations de rongeurs situées dans des régions largement exposées aux AVK, Pelz *et al.* (2005) ainsi que Rost *et al.* (2009) ont identifié plusieurs polymorphismes du gène *Vkorc1*. La première étude fut réalisée sur des populations localisées exclusivement en Europe. Par cette étude, ils mirent en évidence les 5 principales mutations associées à la résistance aux AVK chez le rat (L120Q, L128Q, Y139C, Y139F et Y139S). Ces 5 mutations présentaient une distribution géographique bien précise et ces mutations pouvaient alors être dénommées « mutation allemande/danoise » pour Y139C, « mutation française » pour Y139F, « mutation galloise » pour Y139S, « mutation anglaise » pour L120Q et « mutation écossaise » pour L128Q. Par la suite cette répartition devint plus compliquée (Grandemange *et al.*, 2010). En effet, l'étude de la distribution de la résistance en France couplée au génotypage de *Vkorc1* permet de montrer la complexité de la répartition géographique des mutations. Ainsi Y139F est la mutation principale retrouvée en France, mais d'autres mutations sont présentes sur le territoire. La deuxième étude de Rost *et al.* (2009) a été réalisée sur plus de 250 rats/souris du monde entier. Ces polymorphismes sont disséminés à travers le monde entier. Cette étude a permis de détecter de nouveaux polymorphismes aussi bien chez le rat *Rattus norvegicus* que chez la souris *Mus musculus*. Afin d'évaluer l'implication de ces SNP dans la résistance aux AVK, les différentes protéines ont été exprimées en cellules HEK. L'activité VKOR a ensuite été évaluée sans et avec coumafène. Seules les mutations en position 139, chez le rat et la souris, ont été démontrées comme positivement associées au phénotype de résistance aux AVK. Néanmoins, l'expression en cellules HEK étant faibles, l'exploration fonctionnelle a été très limitée (une seule concentration de coumafène à 60 μ M) limitant les interprétations possibles.

Face à l'absence de données *in vitro* et à la difficulté d'en obtenir, une exploration fonctionnelle *in vivo* relative à l'étude des conséquences des mutations a donc par la suite été réalisée par Grandemange *et al.* (2009). Puisque les mutations ont toujours été détectées chez des rats sauvages, il était difficile dans ces conditions d'attribuer un effet

spécifique à un gène en particulier, le reste du génome restant totalement inconnu. C'est pourquoi Grandemange *et al.* (2009) ont réalisé l'introgession de la mutation 139F dans le génome d'une souche de rats de laboratoire. Après 6 générations successives, la proportion du génome du rat sauvage donneur de la mutation 139F a pu être estimée à 1,56%. La taille du segment moyen inséré (centré autour de *Vkorc1*) était de 28,3 Mb. Les conséquences phénotypiques associées à cette mutation ont alors pu être appréhendées. La présence de cette seule mutation est responsable de la résistance aux AVK de première génération observée chez le rat sauvage. Cette mutation présente à l'état hétérozygote engendre un phénotype intermédiaire, démontrant une codominance entre les allèles sauvages et mutés.

En 1983, Fasco décrit que les rats résistants produisent du 3-OH-vitamine K contrairement aux rats sensibles (Fasco *et al.*, 1983). Pour rappel, à cette époque, le gène de *VKORC1* n'avait pas été découvert. Matagrín précise que seuls les mutants en 139 produisent du 3-OH-vitamine K (inactive) + de la vitamine K, alors que les mutants en 120 ou 128 par exemple, ne produisent que de la vitamine K.

Pour les mutants 139C, leur foie produit 3 fois moins de vitamine K et pour les mutants 139F, leur foie produit 6 fois moins de vitamine K par rapport à l'activité d'une *VKORC1* non-mutée (Matagrín *et al.*, 2013).

Ainsi, la résistance observée chez le rat suite à une mutation du résidu 139 de la séquence protéique de *VKORC1* induit également un coût biologique se traduisant par une activité *VKOR* basale plus faible que celle d'un rat non muté. La propagation de la résistance chez le rat dépend donc du bénéfice de cette mutation et du coût biologique. Un tel coût biologique associé à une mutation de *VKORC1* peut conduire à une diminution de la fréquence allélique de cette mutation conférant la résistance et ce en absence de traitement AVK (Matagrín *et al.*, 2013).

Suite aux résistances, de nouvelles molécules ont été développées à partir de 1970 : les AVK de 2^{ème} génération, soit avec noyau 4-hydroxy-coumarine (brodifacoum, bromadiolone, difenacoum), soit dérivés inadione (diphacinone, chlorphacinone). Ils ont une demi-vie plus longue (→ toxicité secondaire) et sont plus efficaces (→ mais les résistances apparaissent rapidement). (Ishizuka *et al.*, 2008).

Les fortes homologies de séquences entre la protéine *VKORC1* des rongeurs et celle de l'homme rend l'étude comparée des mécanismes de résistance particulièrement intéressante.

2.5.2. Résistance chez l'homme

Au contraire des rongeurs qui ont subi une pression de sélection, des cas de résistance aux AVK d'origine génétique sont rares chez l'homme, avec une incidence difficile à estimer. Le terme de résistance aux AVK recouvre plusieurs entités chez l'homme. On distingue.

- La **résistance clinique** qui consiste en une récurrence de thrombose malgré une apparente efficacité biologique appréciée sur l'INR. Avant de parler d'échec des AVK, il faut évaluer la réalité de l'hypercoagulabilité. Quel était l'INR réel lors de l'accident thrombotique ? L'INR est-il applicable chez ce patient ? En effet, certains patients présentent des anomalies de l'hémostase (lupus (ou anticoagulants circulants) et/ou anticorps phospholipides, déficit en facteur de coagulation, en particulier déficits acquis ou congénitaux en facteur II, IV, X) qui rendent l'INR difficilement interprétable. Devant une résistance biologique, il convient tout d'abord de chercher les causes classiques de résistance (mauvaise observance, mauvaise absorption de l'AVK, interaction médicamenteuse, alimentation...). C'est seulement, et seulement si toutes les causes classiques de résistances ont été écartées, que l'on peut parler de résistance biologique.

- La **résistance biologique** se définit comme une difficulté à obtenir une hypocoagulabilité pour des doses supérieures à la valeur habituellement utilisée pour parvenir à un équilibre thérapeutique. On distingue :

- la résistance primaire, ou génétique, qui se traduit par une inefficacité du traitement avec un INR proche de 1, malgré une posologie adaptée après au moins dix jours de traitement.
- la résistance secondaire, ou acquise, qui se traduit par une inefficacité du traitement après équilibration correcte pendant un certain temps.

Chez les rongeurs, la résistance génétique aux AVK a été sélectionnée par des campagnes successives de dératisation. Ces campagnes ont permis de sélectionner des mutations provoquant des tolérances aux AVK extrêmes (jusqu'à 100 fois la dose pour certaines mutations). Chez l'homme, cette sélection n'ayant pas eu lieu, les facteurs de résistance sont nettement plus faibles et à partir de 3 fois la dose (2 pour certains auteurs), le patient peut être considéré comme résistant. Il serait peut-être plus raisonnable de parler de variabilité de la réponse aux AVK ou de tolérance. Chez l'homme, cette réponse aux AVK peut être normale, diminuée (on parle alors de résistance) ou augmentée (on parle alors d'hypersensibilité). Plusieurs facteurs génétiques ont aujourd'hui été décrits pouvant être

associés à la variabilité de réponse (Wadelius *et al.*, 2007). Suivant les modèles mathématiques proposés, ces facteurs génétiques pourraient expliquer 25 à 60 % de la variabilité de la réponse clinique constatée (Rieder *et al.*, 2005 ; D'Andrea *et al.*, 2005 ; Bodin *et al.*, 2005 ; Veenstra *et al.*, 2005 ; Wadelius *et al.*, 2005).

2.5.2.1. Facteurs génétiques influençant la réponse aux AVK chez l'homme

2.5.2.1.1. Polymorphisme *VKORC1* et Résistance

La caractérisation du gène *VKORC1* a initialement permis d'expliquer les phénomènes de résistance aux AVK chez des patients nécessitant des doses très élevées en coumafène (Kéréveur *et al.*, 1997). En effet, ces derniers ont démontré chez un homme de 63 ans, que sa résistance aux AVK n'était due ni à une malabsorption, ni à un métabolisme accéléré de la vitamine K, mais à une absence de blocage du cycle de la vitamine K par les AVK.

Depuis cette première constatation, de nombreuses équipes ont reporté des cas de résistance au coumafène ou autres AVK utilisés en médecine humaine, associés à des mutations codantes sur *VKORC1*. (Tableau 3)

Bien que différentes études aient permis la détection de plusieurs SNP communs chez des patients résistants aux AVK, l'association de la résistance clinique au génotype de *VKORC1* reste toujours très incertaine, la caractérisation fonctionnelle des conséquences des mutations de *VKORC1* restant à ce jour très limitée. Seule une étude d'activité relative à 5 mutations de *VKORC1* a jusqu'à présent été publiée (Rost *et al.*, 2004). Ces mutants ont été exprimés comme pour les mutants rats en cellules HEK et l'activité a été étudiée par mesure d'une activité spécifique en présence, cette fois-ci de concentrations variables en coumafène. Les conclusions que l'on peut tirer de cette étude restent cependant très limitées. En effet, 4 mutants sur 5 présentent une activité quasi négligeable. Le mutant Val29Leu présente une activité similaire à celle de l'enzyme sauvage et sa réponse aux AVK semble parallèle à celle de l'enzyme sauvage, suggérant une non-résistance aux AVK.

Tableau 3 : Exemples de mutation faux sens du gène *VKORC1* détectées chez des patients nécessitant un surdosage d'AVK pour leur traitement anticoagulant.

Mutation	Localisation	Résistance à	Niveau	Référence
Ala 26 Pro	TM1	Coumafène Fluindione	x 5	Bodin <i>et al.</i> , 2008
Ala 26 Thr	TM1	Phenprocoumone	x 2	Watzka <i>et al.</i> , 2011
Leu 27 Val	TM1	Fluindione	x 3	Peoc'h <i>et al.</i> , 2009
His 28 Gln	TM1	Phenprocoumone	x 4	Watzka <i>et al.</i> , 2011
Val 29 Leu	TM1	Coumafène Phenprocoumone	x 2 x 8	Rost <i>et al.</i> , 2004
Asp 36 Tyr	Boucle luminale	Coumafène	x 2	Loebstein <i>et al.</i> , 2007
Asp 36 Gly	Boucle luminale	Coumafène	x 5	Watzka <i>et al.</i> , 2011
Ala 41 Ser	Boucle luminale	Coumafène	x 2	Rieder <i>et al.</i> , 2005
Val 45 Ala	Boucle luminale	Coumafène	x 2	Rost <i>et al.</i> , 2004
Ser 52 Leu	Boucle luminale	Acénocoumarol Phenprocoumone	x 2 x 3	Schmeits <i>et al.</i> , 2009
Ser 52 Trp	Boucle luminale	Phenprocoumone	x 3	Watzka <i>et al.</i> , 2011
Val 54 Leu	Boucle luminale	Coumafène Acénocoumarol Fluindione	x 2 x 2 x 3	Bodin <i>et al.</i> , 2008
Ser 56 Phe	Boucle luminale	Phenprocoumone	x 6	Watzka <i>et al.</i> , 2011
Arg 58 Gly	Boucle luminale	Coumafène	x 5	Rost <i>et al.</i> , 2004
Trp 59 Arg	Boucle luminale	Acénocoumarol Phenprocoumone	x 2 x 6	Wilms <i>et al.</i> , 2008
Trp 59 Cys	Boucle luminale	Phenprocoumone	x 4	Watzka <i>et al.</i> , 2011
Trp 59 Leu	Boucle luminale	Phenprocoumone	x 4	Watzka <i>et al.</i> , 2011
Val 66 Met	Boucle luminale	Coumafène Phenprocoumone	x 5 x 3	Harrington <i>et al.</i> , 2004
Val 66 Gly	Boucle luminale	Phenprocoumone	x 3	Watzka <i>et al.</i> , 2011
His 68 Tyr	Boucle luminale	ND	-	Osman <i>et al.</i> , 2006
Gly 71 Ala	Boucle luminale	Phenprocoumone	x 2	Watzka <i>et al.</i> , 2011
Asn 77 Ser	Boucle luminale	Phenprocoumone	x 3	Watzka <i>et al.</i> , 2011
Asn 77 Tyr	Boucle luminale	Coumafène	x 4	Watzka <i>et al.</i> , 2011
Ile 123 Asn	TM3	Phenprocoumone	x 7	Watzka <i>et al.</i> , 2011
Leu 128 Arg	TM3	Coumafène Acénocoumarol Fluindione Phenprocoumone	x 6 x 3 x 4 x 10	Rost <i>et al.</i> , 2004
Tyr 139 His	TM4	Phenprocoumone	x 3	Watzka <i>et al.</i> , 2011

De plus amples études sont donc nécessaires pour comprendre l'implication des mutations de *VKORC1* dans l'apparition du phénotype de résistance aux AVK. Ce travail fait l'objet d'une des parties expérimentales de ce manuscrit.

2.5.2.1.2. Polymorphisme CYP2C9

Le CYP2C9 est le principal cytochrome P450 impliqué dans le métabolisme du coumafène et de l'acénocoumarol chez l'homme. Le gène *CYP2C9* est localisé sur le chromosome 10 et comprend neuf exons. Il code une protéine de 490 acides aminés correspondant à un poids moléculaire calculé de 55,6 kDa. De nombreux polymorphismes de ce gène ont été décrits et leur fréquence varie selon l'ethnie. L'allèle *CYP2C9*1* correspond à la forme sauvage et constitue la séquence de référence. Dans la population caucasienne, les deux principaux variants alléliques sont *CYP2C9*2* (Arg144Cys) et *CYP2C9*3* (Ile359Leu). La fréquence allélique de *CYP2C9*2* est de 12%. 19% de la population caucasienne est hétérozygote (**1/*2*) et 3% est homozygote mutée (**2/*2*). La fréquence allélique de *CYP2C9*3* est de 8%. 15% de la population caucasienne est hétérozygote (**1/*3*) et 1% est homozygote mutée (**3/*3*). Ainsi, 40% des individus Caucasiens sont porteurs d'au moins un allèle muté *CYP2C9*2* ou *CYP2C9*3* (Xie *et al.*, 2002).

Les enzymes *CYP2C9*2* ou *CYP2C9*3* issues de ces polymorphismes ont une activité diminuée par rapport à l'enzyme sauvage *CYP2C9*1*, ce qui induit chez les porteurs à l'état hétérozygote, *a fortiori* à l'état homozygote, une diminution de la clairance hépatique des AVK, entraînant une augmentation de leur effet et la nécessité de diminuer la posologie pour obtenir le même degré d'hypocoagulabilité (Bodin and Lorient, 2003). Les individus peuvent être identifiés comme métaboliseurs intermédiaires lorsque leur génotype est intermédiaire pour l'un des variants ou métaboliseurs lents lorsque le génotype est homozygote muté.

Différentes études ont montré une liaison entre génotype et dose moyenne de coumafène à l'équilibre. La possession d'un allèle muté est un facteur prédictif indépendant de la dose à l'équilibre. Dans une étude rétrospective menée chez 185 patients traités par du coumafène au long cours avec un suivi moyen de 13 mois, Higashi *et al.* (2002) ont montré que la possession d'au moins un allèle muté du *CYP2C9* est associée de manière significative à une augmentation du risque de surdosage, à un allongement du délai d'atteinte de l'équilibre, et surtout à une augmentation du risque d'hémorragies majeures. Plus récemment, Moreau *et al.* (2010) décrit également un lien étroit entre la présence d'allèles mutés du *CYP2C9* et le risque d'hémorragie, ces patients nécessitant des doses d'AVK à l'équilibre plus faibles par rapport aux individus ne présentant pas de mutation du *CYP2C9*.

2.5.2.2. Nature et fréquence des polymorphismes dans le monde

Des variations inter-ethniques concernant la nature et la fréquence des polymorphismes sont observées. Par exemple, 80% de la population asiatique présente une mutation au niveau de

la séquence protéique de VKORC1 (alors que moins de 5% sont mutés en CYP2C9). La population asiatique nécessite donc une dose plus faible en AVK par rapport aux Caucasiens. En suivant la même réflexion, les Africains nécessitent des doses en AVK plus élevées car la présence de variants est plus rare.

2.5.3. Mécanisme de la résistance aux AVK

Chez les rongeurs et notamment chez le rat brun (*Rattus norvegicus*), une forte implication de facteurs génétiques dans la résistance aux AVK fut très tôt suspectée. Ainsi, un travail de comparaison réalisé entre le test BCR (pour Blood Clotting-Response) et le statut génétique de rat avant ou après croisement avec des rats standard (Martin *et al.*, 1979) permit de suspecter l'existence d'un gène de la résistance qui fut appelé *Rw* (*War* chez la souris). Ce gène *Rw* fut ensuite localisé sur le chromosome 1 du rat (Greaves et Ayres, 1967 et 1982). Puis sa localisation fut de plus en plus précise suite aux travaux de Kohn et Pelz (1999 ; 2000) par suivi de la liaison du gène *Rw* avec un microsatellite D1Arb18 (Kohn et Pelz, 1999), puis avec 8 microsatellites (Kohn et Pelz, 2000), puis enfin avec 26 microsatellites recouvrant une région de 32 cM (centiMorgan) incluant le gène *Rw*. La liaison la plus intense a été observée pour D1rat219. Ainsi, le marqueur D1Rat219 contenu dans cette région estime la résistance correctement chez 91% des rats testés. Il est le meilleur marqueur de la résistance même si d'autres marqueurs potentiels sont modifiés par déséquilibre de liaison. En conséquence, les auteurs localisent le locus *Rw* dans une zone de 2,2 cM autour de D1rat219 (Kohn *et al.*, 2003). Il est remarquable de noter *a posteriori* que le gène *Vkorc1* est localisé à environ 1 mégabase de ce marqueur.

La pharmacogénétique comparée entre l'homme et le rat a rapidement permis de montrer que le mécanisme impliqué dans la résistance aux AVK chez l'homme possède une large base commune avec le mécanisme impliqué chez les rongeurs résistants au coumafène.

Rien n'est connu quant au mécanisme d'action des AVK. L'inhibition répond à un modèle non-compétitif décrit par Michaelis et Menten. Cela impliquerait donc une fixation de l'AVK sur la VKORC1 sur un site différent de celui de la vitamine K, le substrat naturel de l'enzyme. Cependant, la structure très similaire de la vitamine K et des AVK peut laisser penser à un site de fixation commun. L'hypothèse d'une inhibition de type suicide (avec une interaction irréversible) semble ainsi la plus appropriée à notre modèle : l'inhibiteur se fixerait au substrat, bloquant ainsi, au travers d'une liaison covalente, le fonctionnement de l'enzyme. Toutefois, rien n'a été démontré et cette hypothèse reste à vérifier.

2.5.4. L'action des AVK sur les PVKD extra-hépatiques

Pendant les traitements à long terme aux AVK, les effets sur les PVKD synthétisées dans le foie et impliquées dans la coagulation sont indéniables. En revanche, pour les autres PVKD (synthétisées dans les tissus extra-hépatiques), l'effet est inapparent ou très difficile à observer.

Pour induire une calcification artérielle chez le rat en inhibant la MGP avec du coumafène, des doses excessivement élevées sont requises (Schurgers *et al.*, 2012 ; Price *et al.*, 1998). A titre d'exemple, Price *et al.* (1998) a réussi à induire une calcification rapide des vaisseaux sanguins chez le rat suite à un traitement avec 15mg/100g en coumafène à raison de deux administrations par jour, soit environ 4000 fois la dose thérapeutique utilisée pour l'homme. D'autres études révèlent qu'un traitement au coumafène conduit à une diminution du taux d'ostéocalcine dans les os (Price *et al.*, 1981 ; Hara *et al.*, 2005). Toutefois, ces expérimentations ont été réalisées chez des rats dont l'alimentation est dépourvue en vitamine K. Leurs résultats restent difficilement interprétables.

Une étude *in vivo* menée par Binkley *et al.* (2007) sort du lot. En effet, ils ont travaillé sur des singes qu'ils ont traités pendant 30 mois avec 0,15 mg/kg/jour de coumafène (soit environ 2 fois la dose utilisée en routine chez l'homme). L'INR de ces singes est passé de 0,7 à une moyenne de 3. Par ailleurs, ils ont observé que ce traitement long terme en coumafène n'a pas eu de répercussions (ou très peu) sur l'ostéocalcine plasmatique.

L'ucOC circulante est capable de stimuler la sécrétion d'insuline, d'augmenter la sensibilité des tissus à l'action de l'insuline (Lee *et al.*, 2007 ; Ferron *et al.*, 2008) et plus récemment une action dans la fertilité des mâles a été décrite (Oury *et al.*, 2011). Or, pendant de longs traitements antivitamine K chez l'homme, aucune modification de l'homéostasie du glucose ou de dysfonctionnement de la fertilité n'a été reportée.

2.5.5. La caluménine, un autre mécanisme de la résistance

Il semblerait que d'autres protéines peuvent avoir un rôle dans le phénomène de résistance contre les AVK : Wallin décrit en 2001 que certains rats étaient résistants (colonie de Chicago) à l'action du coumafène. Selon lui, cette résistance est corrélée à une surexpression de caluménine chez ces rats résistants. Il valide son hypothèse lorsqu'il découvre que les rats sensibles n'expriment que très peu la caluménine. Retrouvée dans la membrane du réticulum endoplasmique, la caluménine est une protéine chaperone appartenant à la famille CREC dont la fonction principale est d'aider d'autres protéines à fixer le calcium (elles-même n'ayant qu'une très faible affinité avec le calcium) (Wallin *et al.*, 2001). Selon lui, l'interaction de la VKORC1 avec la caluménine lui permet de résister au coumafène. Toutefois, à cette période, la séquence protéique de VKORC1 et la localisation de son gène n'avait pas encore été découvert. Ainsi, en 2004, peu de temps après les publications de Rost et Li, Wallin vérifia si sa lignée de rats résistants possède une mutation sur VKORC1 : la séquence de VKORC1 des rats résistants ne présente aucune mutation, ni aucune différence avec celle des rats sensibles de son animalerie (Wallin et Hutson, 2004). Il ajoute par ailleurs que la caluménine peut également s'associer à la GGCX conduisant à l'inhibition de son activité (Figure 26).

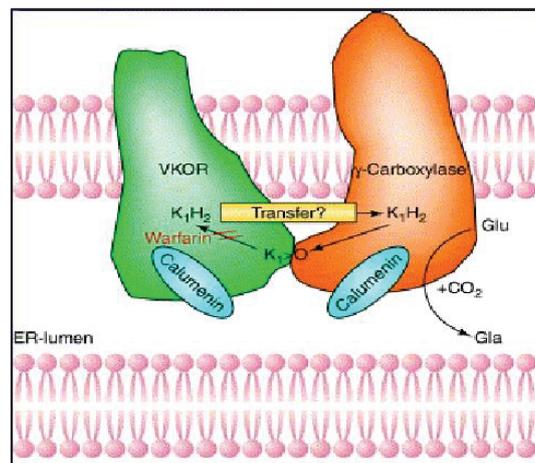


Figure 26 : Modèle hypothétique du système de carboxylation vitamine K-dépendant impliquant la caluménine (Wallin et Hutson, 2004)

Il conclut donc que la caluménine est une protéine chaperone régulatrice qui maintient un système de coagulation normal. Toutefois, ce type de résistance n'a été observé nulle part ailleurs. Par exemple, les rats de notre laboratoire ayant la mutation Y139F ne surexpriment pas la caluménine (Lasseur *et al.*, 2005).

III - OBJECTIFS

VKORC1 est l'enzyme cible de l'action des anticoagulants coumariniques. Des mutations spontanées de cette protéine sont décrites comme responsables du phénotype résistant aux AVK (Grandemange *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'étude des propriétés catalytiques des microsomes hépatiques de rats ayant une protéine VKORC1 mutée en Y139F donne des résultats cohérents avec le phénotype résistant de ces rats (Lasseur *et al.*, 2005). Enfin, l'expression hétérologue de VKORC1 (mutée et non mutée) par la levure *Pichia pastoris* permet de décrire leurs propriétés catalytiques et en particulier d'obtenir des informations sur les constantes d'inhibition. L'analyse des corrélations entre les propriétés catalytiques des microsomes hépatiques des rats résistants et les propriétés de la VKORC1 « Y139F » exprimée par *Pichia pastoris* nous permettent de considérer que les renseignements issus de l'étude des propriétés des protéines VKORC1 mutées exprimées en *Pichia pastoris* semblent raisonnablement informatifs quant au phénotype de résistance.

Chez l'homme, différentes mutations ont été décrites chez des patients résistants au coumafène. Dans la mesure où les facteurs de variation de la posologie nécessaire pour obtenir l'effet thérapeutique souhaité sont très nombreux, l'éventuelle relation de causalité entre le génotype et le phénotype de résistance reste à confirmer.

Ainsi, **le premier objectif de ce travail** fut la caractérisation des propriétés catalytiques des mutants spontanés de VKORC1 retrouvés chez l'homme afin de confronter les informations recueillies auprès des patients relevant de leur résistance clinique aux constantes catalytiques des enzymes recombinantes en particulier en terme de résistance de l'enzyme à l'action des anticoagulants coumariniques.

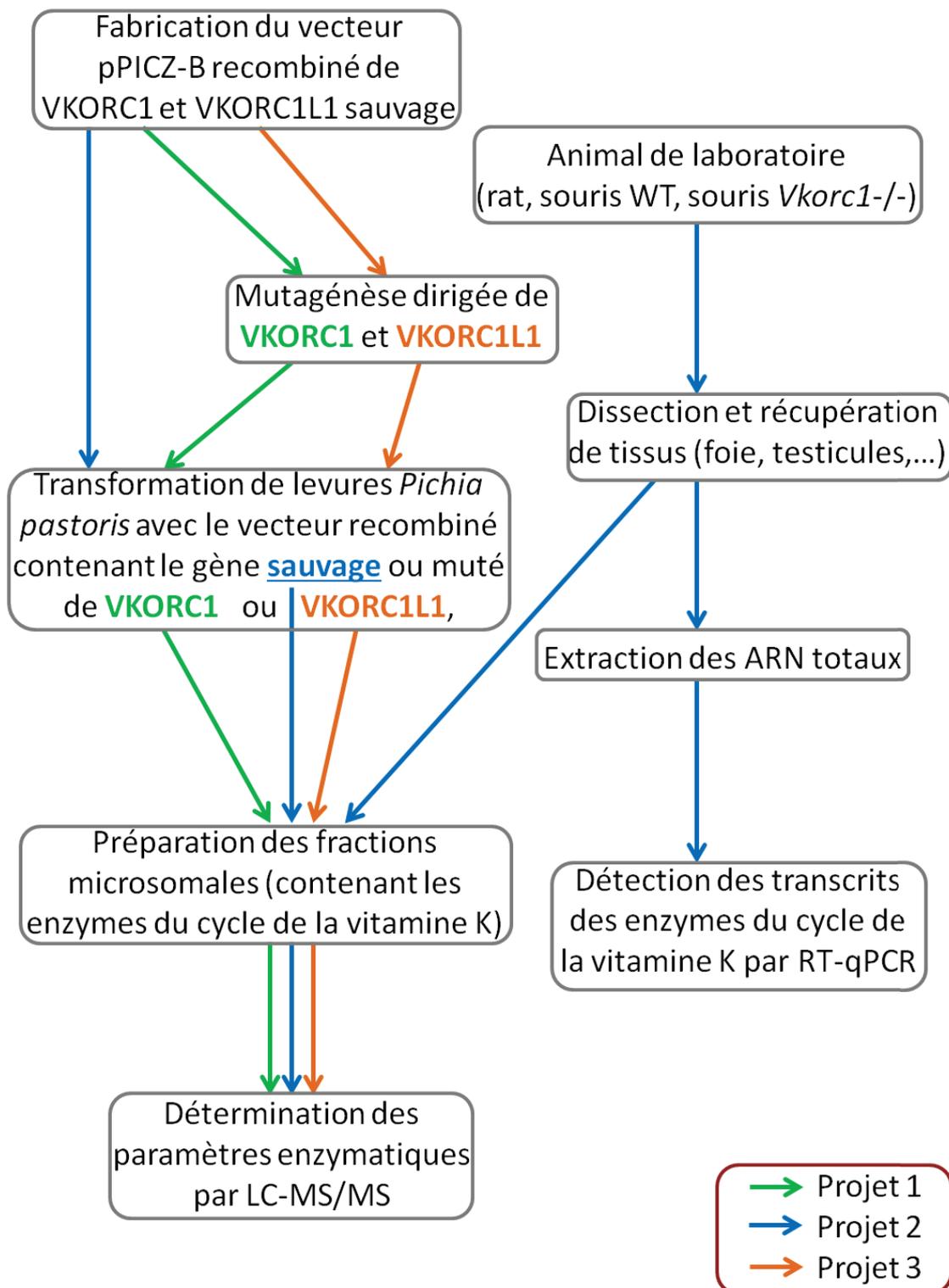
Ces AVK sont utilisés très largement à travers le monde. L'effet anticoagulant associé à ces traitements est dû à une inhibition de l'activité VKOR dans le foie limitant alors la gamma-carboxylation des PVKD hépatiques c'est-à-dire les facteurs de la coagulation. La matrix gla protéine (MGP) et l'ostéocalcine (OC) sont les deux PVKD extra-hépatiques les plus étudiées à ce jour. La première est décrite avec un rôle important dans l'inhibition de la calcification artérielle, quant à la seconde protéine, elle est décrite comme une hormone régulatrice de la synthèse de l'insuline. Cependant, des effets très limités sont observés au niveau de la calcification des vaisseaux sanguins ou dans le métabolisme énergétique chez l'homme même sous traitement au coumafène à très long terme (Stenova *et al.*, 2011 ; Villines *et al.*, 2009).

Le traitement au coumafène inhibant la coagulation chez ces patients, la question de savoir pourquoi ce traitement n'inhibe pas l'action des PVKD extra-hépatiques se posait. Deux types d'hypothèse pouvaient se confronter. Une hypothèse sur la pharmacocinétique du coumafène et de l'accès de cet AVK au cycle de la vitamine K dans des tissus non hépatiques pouvait être imaginée ; d'autre part, l'hypothèse d'une tolérance particulière des tissus extra-hépatiques pouvait être envisagée. Nous avons, dans le cadre de cette dernière hypothèse, cherché à comprendre le fonctionnement du cycle de la vitamine K dans des tissus non-hépatiques et plus particulièrement à évaluer les propriétés catalytiques d'une enzyme paralogue de VKORC1 puis à évaluer le rôle de cette protéine dans ces tissus. C'est pourquoi **le deuxième (principal) objectif de ce travail** fut dans un premier temps de déterminer la distribution transcriptionnelle dans différents tissus de l'enzyme VKORC1L1 comparativement à la distribution de VKORC1 puis dans un second temps de caractériser les propriétés catalytiques de la VKORC1L1 aussi bien dans le foie que dans une sélection de tissus extra-hépatiques.

Les gènes des enzymes de VKORC1 et de VKORC1L1 sont donc paralogues. Ayant établi chez le rat et l'homme que le pouvoir d'inhibition du coumafène sur VKORC1 et VKORC1L1 pouvait être différent, il nous a semblé pertinent de comprendre si les quelques acides aminés qui les différencient seraient responsables du phénotype résistant qui caractériserait la VKORC1L1.

En conséquence, **le troisième et dernier objectif de ce travail** fut de comparer les séquences de VKORC1 et de VKORC1L1 afin d'en relever les différences. Nous avons donc interverti les acides aminés de la VKORC1 par ceux correspondant dans la VKORC1L1 par mutagenèse dirigée, afin de vérifier si ces mutations rendait la VKORC1L1 sensible aux AVK et ainsi déterminer quels acides aminés sont importants dans la résistance aux AVK.

IV - STRATEGIE



La stratégie de recherche mise en place pour répondre aux 3 objectifs de cette thèse est présentée dans le schéma ci-dessus.

Le projet 1 (fléché en vert) correspond à l'étude du rôle causal des mutations de VKORC1 sur la résistance de cible aux AVK.

Le projet 2 (fléché en bleu) permet de suivre la stratégie élaborée pour étudier le rôle de VKORC1L1 dans le cycle de la vitamine K et d'évaluer sa résistance aux AVK.

Le projet 3 (fléché en orange) permet de suivre le protocole établi pour établir la nature des acides aminés impliqués dans la résistance de la VKORC1L1.

Pour répondre aux trois objectifs, une stratégie expérimentale commune a été suivie : l'expression de protéines recombinées en levure *Pichia pastoris* pour étudier les propriétés enzymatiques des protéines VKORC1 / VKORC1L1, sauvages ou mutées. Pour se faire, la séquence de la protéine sauvage est intégrée dans un plasmide d'expression, insertion que l'on vérifie par séquençage. Pour l'étude de l'effet d'une mutation dans la séquence protéique de la protéine d'intérêt, nous avons réalisé une mutagénèse dirigée, à nouveau vérifiée par séquençage.

Une transformation bactérienne permet dans un premier temps de cloner les plasmides que l'on extrait afin de recombiner les levures *P. pastoris* où la protéine d'intérêt sera exprimée. Pour rappel, les protéines VKORC1 et VKORC1L1 sont des protéines du réticulum endoplasmique. Après obtention d'une biomasse importante, les microsomes de levures (contenant les protéines d'intérêt néo-synthétisées) sont récupérés par ultracentrifugation. Ces microsomes serviront donc de support biologique à partir duquel nous déterminons les paramètres enzymatiques de la VKORC1 et de la VKORC1L1 après quantification du produit de la réaction par chromatographie liquide couplée avec de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

Pour confirmer les propriétés catalytiques de la VKORC1L1 observés *in vitro* grâce aux protéines recombinantes (projet 2), nous avons décidé de valider ces résultats par une approche *ex vivo*. Pour cela, nous avons dans un premier temps étudié la distribution des ARN de la VKORC1 et de la VKORC1L1 dans différents tissus, aussi bien chez le rat que chez la souris (méthodes utilisées : extraction d'ARN totaux, Reverse transcription puis RT-qPCR). Cette première approche a permis de sélectionner quelques tissus d'intérêt pour l'estimation de l'activité VKOR comme décrite ci-dessus, avec comme matériel biologique les microsomes extraits des différents tissus étudiés. Enfin, ce même mode opératoire a été suivi pour l'analyse de l'activité VKOR dans des souris dont l'expression du gène *Vkorc1* a été éteinte (*Vkorc1*^{-/-}).

V - MATERIELS ET METHODES

5.1 Matériels

5.1.1 Réactifs de biologie cellulaire

L'ensemble des réactifs entrant dans la composition des milieux de culture de levures et de bactéries (peptone, extrait de levure, Yeast Nitrogen Base, LB et LB Agar) provient de chez Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). La zéocine est fournie par Invitrogen (Cergy-Pontoise, France).

5.1.2 Réactifs biochimiques

Les réactifs entrant dans la composition des solutions tampons sont fournis par Sigma. La vitamine K1 et le coumafène proviennent de chez Sigma-Aldrich. L'acénocoumarol est synthétisé par la société American Custom Chemicals Corporation ; la fluindione par CacheSyn Inc.

Les vitamines K1 (Sigma) ont été oxydées en vitamine K 2,3-époxyde, selon le protocole de Tishler *et al* (1940). Sa pureté (supérieure à 99 %) a été évaluée par LC/MS.

5.1.3 Réactifs de biologie moléculaire

Les enzymes de restriction sont fournies par New England Biolabs (Hitchin, UK). La T4 DNA ligase provient de Gibco-BRL Life technologies (Cergy Pontoise, France). Le vecteur d'expression PICZB, la souche de levure *Pichia pastoris* SMD 1168, le kit de transformation des levures "Pichia EasyComp transformation kit" et les bactéries compétentes TOP 10 sont fournis par Invitrogen. Les kits de mini-préparation et de midi-préparation d'ADN plasmidique proviennent de QIAGEN (Courtaboeuf, France). Le kit utilisé pour la mutagenèse dirigée "QuickchangeTM site-directed mutagenesis kit" et La Pfu Turbo[®] DNA Polymérase sont fournis par Stratagene (La Jolla, CA). L'anticorps primaire polyclonal anti c-myc et l'anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline sont fournis par Sigma.

5.2 Méthodes expérimentales

5.2.1. Etude pharmacogénétique

Cette étude est réalisée en collaboration avec P. Beaune et MA Lorient de l'UMR S775 INSERM-Université Paris Descartes.

5.2.1.1 Recrutement des patients

L'identification de facteurs génétiques expliquant une part de la variabilité de la réponse aux AVK fait partie des activités de recherche et de routine de cette unité. En effet, dans de rares cas, le prescripteur est confronté à une résistance biologique aux AVK, notamment lors de la recherche de la dose à l'équilibre lors de l'instauration du traitement : malgré l'augmentation progressive et substantielle des posologies, l'INR n'augmente pas ou que très faiblement. Les doses à l'équilibre sont alors inhabituellement élevées, voire dans certains cas, il n'y a pas d'atteinte possible de l'équilibre malgré des doses exceptionnellement élevées. C'est pourquoi, depuis 2005, un large recrutement national a permis à nos partenaires de collecter des prélèvements sanguins de patients résistants en vue de rechercher des facteurs génétiques de résistance aux AVK. Dans la plupart des cas, une résistance acquise a été exclue par le clinicien (*cf. Supra*). Un éventuel défaut d'observance peut être formellement exclu par un dosage sérique de l'AVK en cours. Un consentement signé du patient est obligatoire pour la recherche des facteurs génétiques prédisposant à la résistance aux AVK. Il est demandé au clinicien de faire parvenir, en dehors de l'âge et du sexe du patient, l'AVK prescrit, la dose maximale utilisée et l'INR correspondant et si possible une cinétique (sur les jours ou semaines précédant la demande de génotypage) des INR avec les doses correspondantes.

5.2.1.2 Génotypage

5.2.1.2.1 Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique est obtenu :

- soit directement par extraction à partir de prélèvements sanguins effectués pour réaliser les bilans d'hémostase sans nécessité de tube supplémentaire. L'extraction est réalisée sur colonne Qiagen à partir du buffy-coat (couche de globules blancs en surface du culot globulaire) à l'aide du kit commercial « QiAamp DNA blood mini Kit » (Qiagen). La concentration finale d'ADN de chaque échantillon est mesurée par spectrométrie au Nanodrop[®] et la pureté est évaluée par les ratios d'absorbance A260/A280 et A260/A230. L'ADN purifié est ensuite stocké à -20°C.

- soit par extraction à partir de cellules buccales prélevées par chaque investigateur à l'aide de quatre brossettes buccales stériles « cytobrush » (Histobrush[®], Hardwood Product Company, USA). Celles-ci peuvent facilement être envoyées par courrier et conservées pendant au moins huit jours à température ambiante et plusieurs mois à -80°C. L'extraction de l'ADN à partir de brossettes est réalisée à l'aide d'un kit commercial « QiAamp[®] DNA kit » (Qiagen) suivant une procédure optimisée au sein du laboratoire et validée (Mulot *et al.*, 2005).

5.2.1.2.2 Génotypage de VKORC1

L'identification des mutations éventuellement présentes dans *VKORC1* se fait par séquençage des trois exons du gène et de 2000 paires de bases en amont du site d'initiation de la traduction du gène de *VKORC1*.

5.2.2. Expérimentation animale

Les rats mâles OFA - Sprague Dawley et les souris mâles C57BL/6 ont été fournis par le laboratoire Charles River (L'arbresles, France) et laissés en zone d'acclimatation pendant une période minimale de 5 jours. L'eau et la nourriture étaient disponibles *ad libitum*.

Les souris *Vkorc1^{-/-}* nous ont été gracieusement fournies par l'institut de transfusion médicale et d'immuno-hématologie de Francfort (Allemagne). Ces souris ont été maintenues vivantes pendant 9 semaines grâce à une administration de vitamine K1 hebdomadaire par gavage. La dose en vitamine K1 dépendait du poids de l'animal : Pour les nouveau-nés, la dose était de 50 µg de vitamine K1 par gramme du poids. Pour les souris adultes, la dose était de 5µg/g. Rats et souris ont été sacrifiés par décapitation. Rapidement, les différents tissus ont été retirés soit afin d'en extraire immédiatement les ARN totaux, soit pour en extraire les microsomes contenant les enzymes catalysant l'activité VKOR.

5.2.3. Culture cellulaire

Les cellules d'ostéosarcome de rat (ROS 17/2.8) ont généreusement été offertes par Merck&Co (New Jersey, USA) et ont été utilisées entre les passages 4 et 8. Les cellules ont été mises en culture dans des flasques de 75 cm² (Falcon, VWR international, Strasbourg, France) avec du DMEM (Gibco BRL, Cergy Pontoise, France) supplémenté avec 10% (v/v) de SVF décomplémenté (Perbio Science, Brébières, France) et 100 U/ml de pénicilline/streptomycine (Gibco BRL, Cergy Pontoise, France). Les cellules ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée et 5% de CO₂. Les cellules ont été repiquées deux fois par semaine. Une fois la confluence atteinte, les cellules sont récupérées puis mises en suspension soit dans du RNeasy Protect Cell Reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France) pour l'extraction d'ARN, soit dans du tampon HEPES-glycérol (50 mM d'HEPES pH 7,4 avec 20% de glycérol) pour la préparation de cellules par sonication pour en extraire les protéines et tester les caractéristiques enzymatiques de l'activité VKOR.

5.2.4. Etude de biologie moléculaire

5.2.4.1. Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc

Les ARN totaux ont été extraits à partir de 5 tissus différents (foie, testicules, poumons, cerveau et reins) : l'extraction se fait dans un premier temps dans du TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) puis en utilisant le kit SV Total RNA Isolation System de Promega (Charbonnières, France). Pour chaque tissu ou culture cellulaire, 3 extractions d'ARN ont été séparément réalisées. La concentration et la pureté des ARN sont déterminées grâce à un spectromètre (UV-160A, Shimadzu, Roucaire, France) mesurant à 260nm et 280nm.

Les ADN complémentaire ont été synthétisés à partir de 100 ng d'ARN total dans un volume final de 20 µL contenant 500 pmol d'oligo(dT)₁₈ and de 200U d'une reverse transcriptase (MMLV, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et selon les instructions du fournisseur.

5.2.4.2. PCR temps réel

Les PCR temps réel ont été réalisées avec le thermocycleur MX3000P de Stratagène (Amsterdam, Pays-Bas) en utilisant des amorces spécifiques pour la détection de *Vkorc1*, *Vkorc111*, *Ggcx* et *Nqo1*. Le gène *Gapdh* a été utilisé comme gène de ménage et amplifiés dans les mêmes conditions que celles instaurées pour les différents gènes cibles.

Dans un volume de 20 µl, 1 ng d'ADNc et 200 nM de chaque amorce sont ajoutés à un mix réactionnel contenant du 5X HOT BIOAmp Evagreen[®] qPCR Mix (Biofidal, Vaux-en-Velin, France) autorisant une amplification optimale de l'ADN. Cette amplification commence par l'activation de la HOT BIOAmp[®] DNA Polymerase à 95°C pendant 15 min. Suivent ensuite 40 cycles d'amplification (30 sec à 95°C – 40 sec à 60°C – 30 sec à 72°C). La spécificité de l'amplification est vérifiée après les 40 cycles grâce à la courbe de dissociation tracée en augmentant la température à un rythme régulier d'0,01°C par seconde de 60°C à 95°C.

Dans ces conditions, l'efficacité des amplifications des gènes de *Vkorc1* et de *Vkorc111* sont similaires (101% et 99%, respectivement), ce qui permet de comparer leur expression relative. Pour chaque échantillon, le Ct (correspondant au point de la courbe d'amplification qui coupe un seuil défini) est déterminé en duplicat dont on va calculer la moyenne. La détermination de la quantité du gène cible présent dans chaque tissu est normalisée en lui soustrayant le Ct du gène de ménage ($\Delta Ct = Ct \text{ cible} - Ct \text{ ménage}$) et sa concentration relative est déterminée grâce à la formule suivante : $2^{-\Delta Ct}$.

5.2.5. Etude biochimique

Afin de caractériser les propriétés catalytiques des enzymes VKORC1 d'homme, de rat et de souris et VKORC1L1 d'homme et de rat/souris et afin de déterminer les conséquences des mutations (les mutations de hVKORC1 et de hVKORC1L1) sur le fonctionnement de l'enzyme, les protéines recombinantes correspondantes et leurs mutants ont été exprimés dans la levure méthylothrophique *Pichia pastoris*. Ce système permet un fort taux d'expression de la protéine d'intérêt en présence de méthanol. La levure *P. pastoris* possède la capacité d'utiliser le méthanol comme seule source carbonée *via* l'alcool oxydase (AOX1),

première enzyme de la voie de métabolisation du méthanol chez *P. pastoris*. Son expression est contrôlée par le promoteur du gène *aox1*, fortement et exclusivement inductible par le méthanol. Les ADNc codant les protéines d'intérêt sont placés sous le contrôle de ce promoteur.

5.2.5.1 Constructions plasmidiques

L'ensemble des constructions plasmidiques a été construit sur le même schéma. La composition des séquences nucléotidiques a tout d'abord été optimisée par Genscript (Piscataway, NJ, USA) pour favoriser l'expression de la protéine correspondante en *Pichia Pastoris*. Les séquences nucléotidiques ainsi optimisées, additionnées en 5' d'un site EcoRI et en 3' d'une séquence codant la séquence protéique GGSGGSGGSE**QKLI**SEEDL (permettant l'addition d'un épitope c-myc (en gras) séparé de la protéine par un linker) suivie du site XbaI ont été synthétisées par Genscript. Ces séquences ont ensuite été sous-clonées dans les sites de restriction EcoRI et XbaI du vecteur pPICZB pour produire les vecteurs pPICZ-hVKORC1, pPICZ-hVKORC1L1.

5.2.5.2 Mutagenèse dirigée

Les mutants hVKORC1 et hVKORC1L1 ont été produits par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide du kit de mutagenèse dirigée "QuickchangeTM site-directed mutagenesis kit" suivant les indications du fournisseur. Une paire d'amorces sens et anti-sens comportant en leur milieu la mutation souhaitée est utilisée, ainsi que la matrice plasmidique non mutée. Les cycles de PCR (dénaturation, hybridation, élongation) sont réalisés dans un appareil de PCR Mastercycler (Eppendorf, Le Pecq, France) selon les recommandations du fournisseur. A l'issue de la réaction, la matrice non mutée comportant des nucléotides méthylés est digérée par l'enzyme de restriction *DpnI* qui clive spécifiquement en des sites méthylés pendant 3 h à 37°C et la matrice néoformée est utilisée pour transformer les bactéries compétentes.

5.2.5.3 Transformation des bactéries compétentes et préparation de l'ADN plasmidique

25 µL de bactéries compétentes (TOP 10) ont été décongelées dans la glace puis mises au contact de l'ADN plasmidique pendant 5 min dans la glace. Les cellules sont soumises ensuite à un choc thermique. Elles sont placées à 42°C pendant 40 sec dans un bain-marie,

puis refroidies pendant 5 min dans la glace. Les bactéries sont ensuite agitées à 37°C dans du milieu SOC (Invitrogen) avant d'être étalées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu LB Agar, contenant 100 µg/ml de zéocine. Les bactéries transformées croissent en une nuit à 37 °C et sont ensuite mises en culture dans du milieu Terrific-broth contenant 100 µg/mL de zéocine. L'ADN plasmidique sera ensuite préparé à partir de ces cultures au moyen du kit QIAprep® spin-miniprep pour la mini-préparation et du kit QIAGEN® plasmid midi pour la midi-préparation selon les indications du fournisseur. La séquence des plasmides obtenus est alors vérifiée par séquençage à l'aide de l'amorce AOX-sens par Biofidal (Vaulx-en-Velin, France).

5.2.5.4 Transformation des levures compétentes

La transformation des levures consiste en l'intégration du gène d'intérêt dans le génome de la levure par recombinaison au niveau de la séquence 3'-AOX (Figure 27).

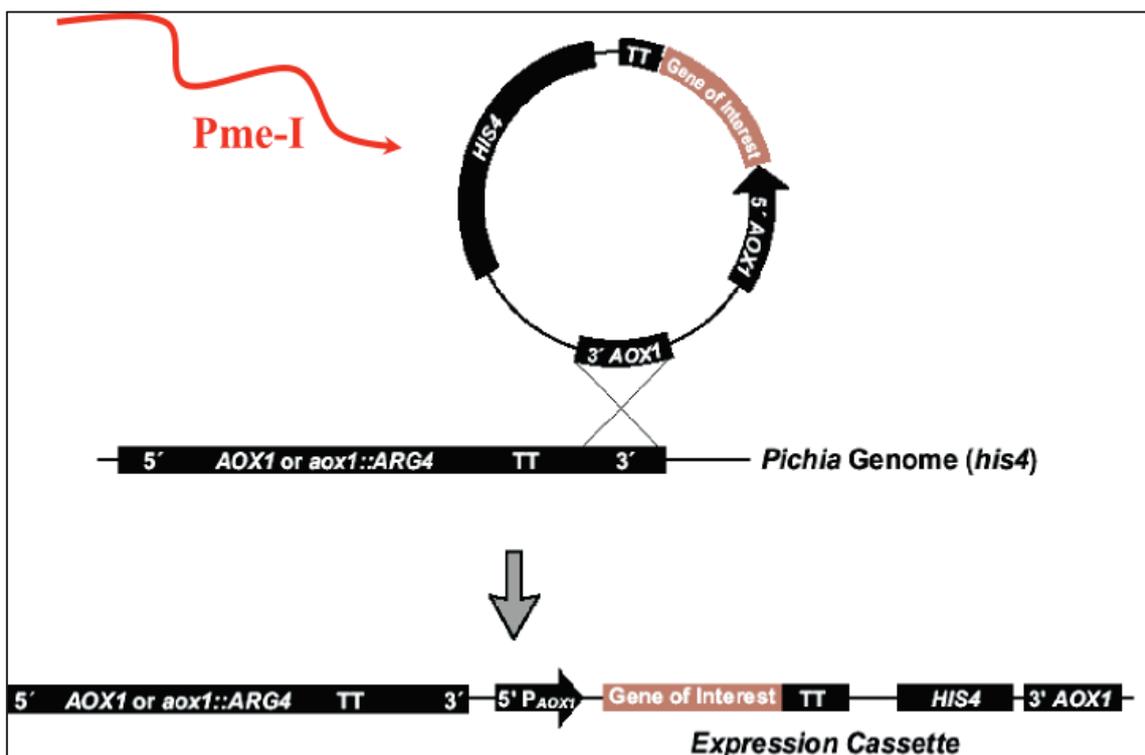


Figure 27 : Principe de la transformation des levures *Pichia pastoris*

Les levures compétentes sont transformées grâce au kit de transformation *Pichia EasyComp*TM (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Brièvement, les cellules sont

mises au contact de l'ADN plasmidique préalablement linéarisé par l'enzyme de restriction *PmeI* dans un tampon contenant du polyéthylène glycol pendant 1 h à 30°C. La transformation est réalisée en faisant subir un choc thermique aux levures en les plaçant à 42°C pendant 10 min. Les levures sont ensuite mises en suspension dans du milieu YPD (1% (p/v) extrait de levure, 2 % (p/v) peptone, 2 % (p/v) D-glucose) et placées sous agitation à 30°C pendant 2 à 3 h, puis elles sont collectées et remises en suspension dans une solution saline.

Les cellules sont étalées sur un milieu YPD-Agar (2 % (p/v) Agar) contenant 100 µg/mL de zéocine (Invitrogen) et incubées pendant 2 à 3 jours dans une étuve à 30°C. Trois ou quatre colonies résistantes sont mises en culture dans le milieu YPD comme décrit ci-dessus.

5.2.5.5 Expression des protéines recombinantes

La production de la VKORC1 ou de la VKORC1L1 se déroule en deux phases : une phase de croissance des levures utilisant le glycérol comme source carbonée et une phase d'induction du promoteur *aox1* où le glycérol est remplacé par du méthanol comme source de carbone. Les levures sont cultivées dans du milieu BMGY constitué de 1 % (p/v) d'extrait de levure, de 2 % (p/v) de peptone, de 0,1 M de phosphate (pH 6,0), de 1 % (v/v) de glycérol et de 1,34 % (p/v) de *Yeast Nitrogen Base* (YNB) pendant environ 48 h sous agitation à 30°C en ajoutant 2% de glycérol toutes les 4 h.

Les levures en croissance exponentielle (densité optique à 600 nm ≥ 6) sont centrifugées à 3000 g pendant 10 min à 4°C, puis elles sont reprises dans le milieu d'induction BMMY (milieu de culture dans lequel le méthanol remplace le glycérol). Les levures sont remises sous agitation à 30°C et la production de la protéine d'intérêt est induite par ajout de méthanol (1% (v/v)) 3 fois par jour (matin, midi et soir). Après 48 h d'induction, les levures sont collectées par centrifugation avant la préparation des fractions membranaires (Figure 28).

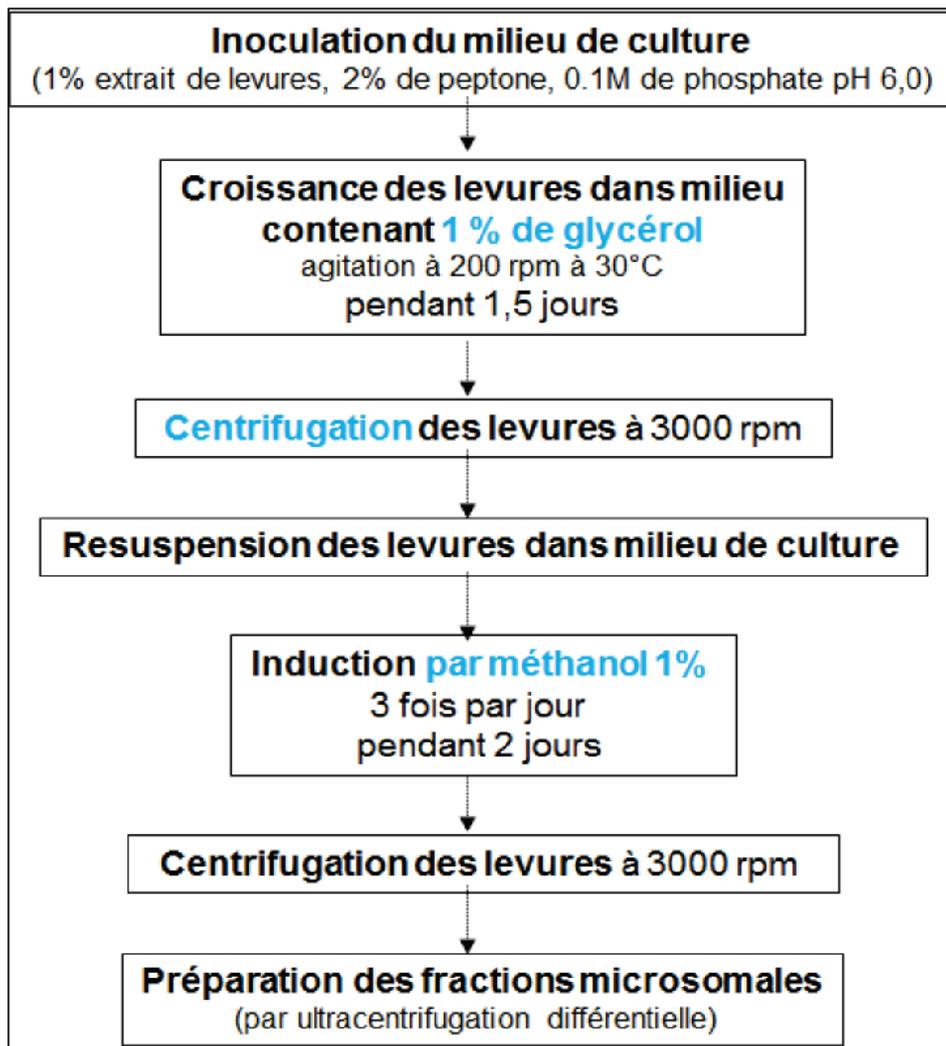


Figure 28 : Expression de protéines recombinantes par la levure *Pichia pastoris*

5.2.5.6 Préparation des fractions microsomales de levures

Les culots de levures sont remis en suspension dans un tampon de broyage 50 mM de phosphate de sodium (pH 7,4) contenant du KCl 1,15 % (w/v). Elles sont ensuite broyées par des billes de Zircon sous agitation constante à l'aide de l'agitateur Dispermat® LC30 (VMAGETZMANN, Germany) pendant 15 minutes à 3500 rpm. Le lysat est centrifugé à 10000 g durant 10 min à 4°C, ce qui permet l'élimination des débris cellulaires, des noyaux et des mitochondries. Le surnageant est centrifugé à 100 000 g pendant 1 h à 4°C à l'aide d'une centrifugeuse Avanti™ J-301 (Beckman, USA). Les microsomes (culot) sont ensuite repris et homogénéisés dans un tampon 50 mM HEPES (pH 7,4), contenant du glycérol 20% (v/v). Les microsomes sont aliquotés dans des tubes Eppendorf et conservés à -80 °C jusqu'à utilisation.

5.2.5.7 Dosage de protéines

La quantité de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976). Le principe de cette méthode est basé sur la fixation du Bleu Brillant de Coomassie G-250 (réactif Bio-Rad, Bio-Rad, Hercules, CA) sur les résidus basiques des protéines entraînant une variation du maximum d'absorbance de 465 à 595 nm (effet bathochrome). L'absorbance à 595 nm va donc être proportionnelle à la quantité de colorant liée et donc à la quantité de protéines dans l'échantillon. La concentration en protéines est calculée par rapport à une gamme d'albumine sérique bovine (BSA, fraction V, Sigma) de 0 à 10 mg/ml traitée dans les mêmes conditions que les échantillons.

5.2.5.8 Analyse de l'expression des protéines sauvages et de leurs mutants par immunoblot

Le Western Blot est réalisé après séparation, en fonction de leur masse moléculaire, des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions réductrices. Le Western Blot consiste à transférer les protéines présentes sur un gel d'électrophorèse sur une membrane de Polyvinylidène fluoride (PVDF) qui subira ensuite divers traitements immunochimiques. Le SDS-PAGE (5% - 12%) a été réalisé selon le protocole décrit par Laemmli.

Le transfert des protéines sur membrane PVDF a été réalisé selon le protocole décrit par Towbin *et al.* en 1979. Les protéines VKORC1 et ont ensuite été détectées par immunorévélation par utilisation d'un anticorps primaire anti-c-myc.

Brièvement, après saturation de la membrane par une solution de lait 5% diluée dans un tampon PBS, la membrane a été incubée à 4°C toute une nuit avec l'anticorps anti-c-myc (1/5000^{ème}) (Invitrogen). Après des rinçages successifs au PBS, la membrane a ensuite été mise en contact du 2^{ème} anticorps anti-IgG de souris conjugués à la phosphatase alcaline (1/10000^{ème}) (Sigma, St Quentin Fallavier, France) pendant 1h à température ambiante. La détection terminale a été réalisée avec une solution BCIP/NBT, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium, substrat de la phosphatase alcaline.

5.2.5.9 Détermination semi-quantitative de l'expression des protéines recombinantes

Afin de standardiser l'expression des protéines sauvages ou mutantes, 2 gammes différentes de protéines (de 1,25 à 50 µg) ont été déposées sur SDS-PAGE. Une de ces gammes correspondait systématiquement à une gamme de protéines microsomaux étalon (pour une même étude la même fraction microsomale était utilisée - par exemple pour l'étude sur la VKORC1 et ses mutants, la fraction microsomale étalon correspondait à celle contenant la VKORC1 sauvage). L'autre gamme correspondait à une gamme de protéines microsomaux contenant la protéine recombinante à quantifier. Après immunorévélation, l'intensité de chaque piste a été quantifiée par utilisation du logiciel Scion Image (logiciel en libre accès). La relation linéaire entre la quantité de protéines totales et l'intensité du signal détecté d'une part, et la comparaison des 2 gammes d'autre part a permis de calculer un facteur d'expression de l'enzyme à quantifier par rapport à notre étalon standard.

5.2.5.10 Activité enzymatique

L'incubation standard a été effectuée dans un tampon HEPES 200 mM (pH 7,4) contenant 150 mM de KCl, 1mM de dithiothréitol, en présence de 0,5 à 3 mg de protéines microsomaux contenant la protéine recombinante étudiée. La concentration de substrat, c'est-à-dire la vitamine $K_1 > O$, était de 200 µM pour une réaction standard dans un volume final de 1 mL. Après incubation pendant 30 min à 37°C, la réaction était arrêtée par ajout de 4 mL d'une solution d'isopropanol/hexane (1/1). Après centrifugation pendant 10 min à 3000 rpm, la phase organique était ensuite récupérée et évaporée à sec sous azote. Le résidu sec était immédiatement repris dans 200 µl d'isopropanol.

L'analyse de la vitamine K produite a été effectuée par LC/MS/MS (1100 Series LC/MSD ion Trap VL) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) (validé pour l'analyse de la vitamine K_1).

La séparation des produits a été réalisée par chromatographie inverse sur une colonne C8 (4.6mm × 150mm, 5µm) (Waters, Milford, MA, USA) maintenue à 45°C. La séparation a été assurée en condition isocratique par utilisation d'une phase mobile méthanol 0.1%-acide acétique (95/5). Le débit était de 1mL/min. La détection du produit a été réalisée par MS/MS avec une source APCI en mode positif avec fragmentation de l'ion initial (451) correspondant à la vitamine K_1 . Les critères d'identification de la vitamine K_1 était le temps de rétention (environ 6 min) et la production du fragment 187 à partir de l'ion 451.

5.2.5.11 Analyse des résultats

La détermination des constantes cinétiques K_M et V_{max} a été réalisée par mesure de l'activité après addition de concentrations croissantes de vitamine K>O (de 0 à 200 μ M). Les valeurs de K_M et V_{max} ont été évaluées à l'aide du logiciel d'ajustement non linéaire, SigmaPlot 9.0 (Erkraft, Allemagne) à partir de l'équation de Michaelis-Menten :

$$v = (V_{max} * S) / (K_M + S)$$

- ou v , représente la vitesse initiale,
 K_M , la constante de Michaelis-Menten,
 S , la concentration en substrat (mM) et
 V_{max} , la vitesse maximale de la réaction.

La détermination des constantes d'inhibition K_i a été réalisée par mesure de l'activité à concentrations croissantes en K>O (de 0 à 200 μ M) en présence de concentration variable d'inhibiteurs. Les valeurs de K_i ont été évaluées par régression non-linéaire à partir de l'équation d'inhibition non-compétitive :

$$v = (v_{max} / (1 + (I/K_i))) * (S / (K_M + S))$$

- ou v , représente la vitesse initiale,
 I , la concentration d'anticoagulant,
 K_M , la constante de Michaelis-Menten,
 S , la concentration en substrat (mM),
 V_{max} , la vitesse maximale de la réaction et K_i , la constante d'inhibition.

VI - RESULTATS

6.1. Caractérisation biochimique des mutations spontanées de hVKORC1 détectées chez des patients résistants aux AVK

Objectifs :

Alors qu'un nombre important de mutations potentiellement impliquées dans des cas de résistances aux AVK chez l'homme sont décrites, les études de Rost *et al.* (2004) restent à ce jour les seules ayant évalué les conséquences fonctionnelles des mutations du gène *Vkorc1* sur l'activité de l'enzyme. Or, de façon très approximative, l'ensemble des mutations détectées chez des patients résistants aux AVK ont été associées de façon certainement abusive au phénotype observé. Il manquait donc une étude rapportant les conséquences fonctionnelles de ces mutations sur l'activité de la VKORC1. C'est donc ce que nous avons décidé de réaliser en reprenant l'ensemble des mutations rapportées jusqu'à présent.

Méthodes :

Les protéines recombinantes de hVKORC1 de ses variants (26 mutations testées) ont été exprimées en levure *Pichia pastoris*. Leurs propriétés catalytiques et leurs réponses vis-à-vis des AVK a été évaluée par détermination des constantes catalytiques K_M et V_{max} et des constantes d'inhibition vis-à-vis des principaux AVK utilisés en médecine humaine en France.

Principaux résultats :

A l'exception du mutant V29L, l'ensemble des mutants (c'est-à-dire 25 sur 26) ont été exprimé correctement par la levure *Pichia pastoris*.

Sur les 25 mutations considérées dans notre étude :

- 10 entraînent une inactivation de la protéine VKORC1 (S52L, S52W, W59L, W59R, V66M, V66G, G71A, N77S, N77T et L128R). Ces mutations sont pour la plupart situées dans la boucle luminale, à l'exception de V29G située dans le TM1 et de L128R située dans le TM3.

- 9 n'entraînent aucune augmentation significative du Ki vis-à-vis des AVK, et pourtant sont toujours capables de catalyser la réaction VKOR (A26T, L27V, H28Q, D36Y, D36G, V45A, S56F, R58G et W59C). Ces mutations sont également pour la plupart situées dans la boucle luminale, à l'exception des mutations A26T, L27V et H28D situées dans le TM1.

- 6 seulement entraînent augmentation significative du Ki (A26P, A41S, V54L, H68Y, I123N et Y139H) confirmant leur implication dans la résistance aux AVK. La mutation A41S entraîne une augmentation du Ki uniquement avec la fluindione et la mutation H68Y uniquement avec les dérivés coumariniques. Les 4 autres mutations permettent à VKORC1 de résister indifféremment aux dérivés coumariniques et aux dérivés de l'indane-dione.

Ces résultats sont présentés dans l'article publié en 2012 dans le *Journal of Thrombosis and Haemostasis* et intitulé « **VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity** ».

ORIGINAL ARTICLE

VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity

A. HODROGE,* B. MATAGRIN,* C. MOREAU, à I. FOUREL,* A. HAMMED,* E. BENOIT* and V. LATTARD*

*USC 1233 INRA – Vetagro Sup, Veterinary School of Lyon, 69280 Marcy l'Étoile; Service de Biochimie, UF Pharmacogénétique et Oncologie Moléculaire, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris; and àINSERM UMR – S 775, Université Paris Descartes, Paris, France

To cite this article: Hodroge A, Matagrin B, Moreau C, Fourel I, Hamed A, Benoit E, Lattard V. VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 2535–43.

Summary. Background: The VKORC1 gene codes for the VKORC1 enzyme, which is responsible for the reduction of vitamin K epoxide into vitamin K. VKORC1 enzyme is the target of vitamin K antagonists (VKA). Twenty-eight rare single mutations in the VKORC1 coding sequence have been reported from resistant patients receiving unusually high doses of VKA to achieve therapeutic anticoagulation. Objectives: It has been suggested that these mutations are responsible for the resistant phenotype, while biochemical consequences of these mutations on the VKORC1 enzyme have not yet been evaluated. Therefore, the aim of this study was to investigate the causality of the VKORC1 mutations in the resistance phenotype. Methods: Wild-type VKORC1 and its spontaneous mutants were expressed in *Pichia pastoris* and susceptibility to VKA was assessed by the in vitro determination of kinetic and inhibition constants. Results and Conclusions: The in vitro analysis revealed that six mutations only (A26P, A41S, V54L, H68Y, I123N and Y139H) were associated with increase in K_m , suggesting their involvement in the resistance phenotype observed in patients. A41S and H68Y led to selective resistance, respectively, to indane-1,3-dione and 4-hydroxycoumarine derivatives. The other mutations did not increase the K_m . Furthermore, 10 mutations (S52L, S52W, W59L, W59R, V66M, V66G, G71A, N77S, N77T and L128R) led to an almost complete loss of activity. These results suggest the existence of other resistance mechanisms.

Keywords: anticoagulant resistance, catalytic properties, mutation, Vitamin K antagonists, VKORC1.

Introduction

Vitamin K antagonists (VKAs) are widely prescribed in the prevention and treatment of thromboembolic disorders. Warfarin, a derivative of 4-hydroxycoumarin, is the most used VKA worldwide and is prescribed to 2 million new patients in the USA each year. The number of dispensed outpatient prescriptions for warfarin increased by 45%, from 21 million in 1998 to nearly 31 million in 2004 [1]. In France, fluindione, an indane-1,3-dione derivative, is traditionally prescribed in more than 80% of patients. Thrombotic and hemorrhagic accidents associated with the use of these drugs represent the first cause of iatrogenic accidents, according to the EMIR study in 2007 (Adverse Effects of Drugs, Incidence and Risk) from AFSS-APS (Agence Française de Sécurité des Produits de Santé). Roughly one in five patients are hospitalized for bleeding within 6 months of starting the drugs and lethal cases account for 0.6% of the treated patients [1]. VKAs are difficult to use because of a narrow therapeutic index and a wide variability of dosage necessary to achieve stable anticoagulation. This variability is partly due to basic physiological parameters such as age and bodyweight, but also to co-occurring disorders, and drug and food interactions. Nonetheless, 30 to 50% of the dosage variability might be explained by genetic polymorphisms in CYP2C9 involved in VKA metabolism and by genetic polymorphisms in the promoter of VKORC1 [2–6]. Even if genotyping of VKORC1 and CYP2C9 has been suggested as a prerequisite to optimize dosage adjustment with VKAs [7,8], the correlation between genotype and dose requirement is complicated. Indeed, many allele combinations of CYP2C9 and VKORC1 are possible, resulting in the need for various doses of VKA.

The VKORC1 encodes the vitamin K epoxide reductase (VKORC1) [9,10]. VKAs exert their anticoagulant activity by inhibiting this enzyme in a non-competitive manner [11]. The function of VKORC1 is to regenerate vitamin K quinone and hydroquinone (K and KH₂) from vitamin K 2,3-epoxide (K > O), a byproduct of the vitamin K-dependent gamma carboxylation reaction (Fig. 1) [12]. Inhibition of VKORC1 by VKAs limits the amount of KH₂ available for the carboxylation

Correspondence: Virginie Lattard, USC 1233 INRA – Vetagro Sup, 69280 Marcy l'Étoile, France.
Tel.: + 33 4 78 44 24 11; fax: + 33 4 78 87 05 16.
Email: v.lattard@vetagro-sup.fr

Received 5 March 2012, accepted 1 October 2012

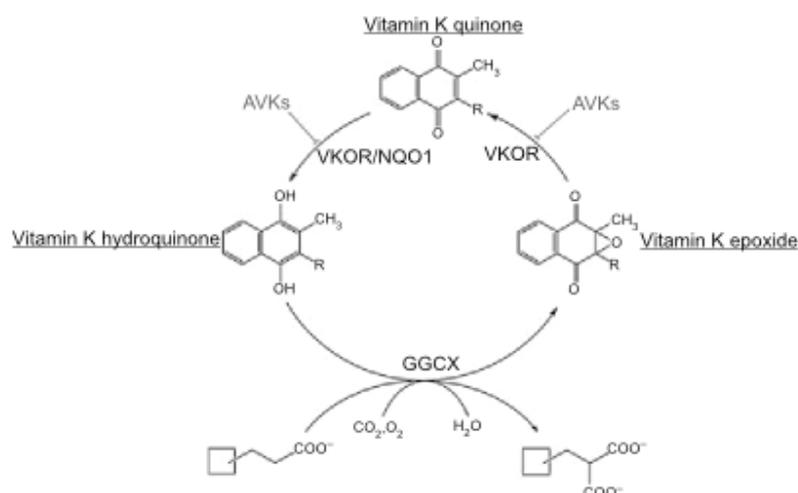


Fig. 1. The vitamin K cycle. GGCX, gamma-glutamyl-carboxylase; NQO1, NADPH quinone oxidoreductase 1; VKOR, vitamin K epoxide reductase.

reaction and results in partially carboxylated vitamin K-dependent blood clotting factors. The VKORC1 is a 163 amino acid integral membrane protein that contains a $C_{132}XXC_{135}$ redox motif located in the fourth transmembrane domain [13,14].

More than 26 missense mutations of the VKORC1 have been found to be associated with a substantially higher dosage requirement that cannot be explained by demographic or environmental factors (Table 1). These mutations are located either in the transmembrane domains TM 1, TM 3 and TM 4, or in the large intraluminal loop between TM 1 and TM 2 [15]. Detected in patients with total or partial resistance to VKAs, these mutations are considered as linked to this phenotype [10,16]. Nonetheless, biochemical and structural consequences of these mutations of VKORC1 still remain to be elucidated and additional study is warranted to know if genetic abnormalities of VKORC1 can explain VKA resistance. Therefore in order to characterize the relationship between genetic variation in VKORC1 and the VKA resistance phenotype, we conducted a systematic analysis of the functionality of the VKORC1 mutated enzymes expressed as membrane-bound proteins in *Pichia pastoris*.

Material and methods

Chemicals

K1 (Phylloquinone) was converted to K⁺ O according to Tishler et al. [17]. Purity was estimated by LC/MS and was higher than 99%.

Plasmid preparation

The coding sequence corresponding to the human VKORC1 fused with a c-myc tag in its 3rd extremity was optimized for heterologous expression in yeast (i.e. by exchanging rare codons in the target gene for codons that are more frequently

used in yeast) and synthesized by GenScript (Piscataway, NJ, USA). The synthesized nucleotide sequence included EcoRI and XbaI restriction sites at its 5th and 3rd extremities, respectively. This nucleotide sequence was subcloned into pPICZ-B (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and sequenced on both strands. Construction of amino acid substituted mutants of VKORC1 was carried out using pPICZ-VKORC1 as a template with the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Massy, France). Mutants were systematically checked by sequencing, and the various mutants were individually expressed in *P. pastoris*.

Heterologous expression and subcellular fractionation of recombinant yeast cells

Heterologous expressions of VKORC1 proteins in *Pichia pastoris* and microsomes preparations were performed as described previously [18].

Immunoblot analysis

Expression level quantification of VKORC1 proteins was determined by Western blotting. Microsomal proteins were separated on 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto Immobilon-P membranes and probed with anti-c-myc antibodies (Invitrogen). The resulting immunocomplexes were visualized using alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse immunoglobulins as secondary antibodies and a BCIP/NBT solution. Quantification of the stained bands was performed by densitometry using the Scion Image software. The relative intensity (RI) of the signal was correlated with the quantity of microsomal proteins, as shown in Fig. 2(A), and the relationship was linear from 0 to 10 I g for microsomal proteins containing WT-VKORC1 (Fig. 2B) or from 0 to 50 I g for microsomal proteins containing mutated VKORC1 that was weakly expressed.

Table 1 Genetic variations in the coding sequence of human VKORC1 detected in patients requiring a high dose of a vitamin K antagonist

Mutation	Position	Number of patients	Resistance to	Dose (mg day ⁻¹)	Stable anticoagulation	Ref
A26P	TM 1	1 (het)	W	20	No	[21]
			F	100	No	
A26T	TM 1	1 (het)	W	6	No	[23]
L27V	TM 1	1 (NI)	W	7	Yes	[31]
			F	60	No	
H28Q	TM 1	1 (het)	P	10	Yes	[23]
V29L	TM 1	2 (het)	W	14	?	[10,23]
			P	26	Yes	
A34P	LL	1 (het)	W	27	Yes	[28]
D36Y	LL	16 (het/hom)	W	14 ± 6	□	[3,21–23,32]
			F	45	No	
			A	7	No	
			P	10 ± 6	Yes	
D36G	LL	1 (het)	W	20	Yes	[23]
A41S	LL	1 (het)	W	16	?	[2]
V45A	LL	1 (het)	W	45	No	[10]
S52L	LL	1 (het)	P	9	No	[33]
S52W	LL	1 (het)	P	10	Yes	[23]
V54L	LL	2 (het)	W	21 ± 16	□	[21,22]
			F	60	No	
			A	8	No	
S56F	LL	1 (het)	P	15	No	[23]
R58G	LL	1 (het)	W	34	?	[10]
W59R	LL	3 (het)	A	9 ± 2	No	[33,34]
			P	9 ± 0	No	
W59C	LL	1 (het)	P	11	No	[23]
W59L	LL	1 (het)	P	15	No	[23]
V66M	LL	18 (het)	W	30 ± 7	Yes	[21–23,28,29]
			P	10 ± 1	□	
V66G	LL	1 (het)	P	8	Yes	[23]
H68Y	LL	1 (het)	–	–	–	[24]
G71A	LL	1 (het)	P	6	No	[23]
N77S	LL	1 (het)	P	9	No	[23]
N77Y	LL	1 (het)	W	25	Yes	[23]
I123N	TM 3	1 (het)	P	21	No	[23]
L128R	TM 3	16 (het)	W	44 ± 5	No	[4,10,21,22]
			F	80	No	
			A	13 ± 3	No	
			P	30	No	
Y139H	TM 4	1 (het)	P	9	No	[23]

High-dosage threshold values: phenprocoumon (P) 3.0 mg day⁻¹, acenocoumarol (A) 3.5 mg day⁻¹, warfarin (W) 7.1 mg day⁻¹, fluindione (F) 19.8 mg day⁻¹, for mean age patients [23].

TM, transmembrane domain; LL, luminal loop; het, heterozygous state; hom, homozygous state; □, depending on patient.

To evaluate the expression level of VKORC1 proteins, the expression of wild-type VKORC1 (WT-VKORC1) was designated as the basal expression. For the quantification of all the mutants, the same unique pool of yeast microsomes containing WT-VKORC1 was used. Therefore, its expression factor was by definition 1. The expression level of the mutated VKORC1 was evaluated by comparison with the expression of WT-VKORC1. For this purpose, various amounts (from 0 to 10 µg) of microsomal proteins containing WT-VKORC1 and various amounts (depending on the expression level) of microsomal proteins containing one of the mutated VKORC1 were analyzed on the same Western blot (Fig. 2C). Two linear relations ($RI = a \cdot \text{quantity of microsomes loaded}$) were obtained, the first one for microsomes containing WT-VKORC1 (characterized by a specific slope a^{WT}), the second

one for microsomes containing the mutated VKORC1 (characterized by a slope a^{mut}). Ratio a^{mut}/a^{WT} allowed us to determine the expression factor characterizing the expression level of the mutated VKORC1 in the microsomal fraction compared with the expression level of the WT-VKORC1.

Vitamin K epoxide reductase activity (VKOR) assays and kinetics

Analysis of VKOR activity and reaction products by liquid chromatography-mass spectrometry was performed as described previously [18]. K_m , V_{max} and K_i values were obtained from at least three separate experiments performed on three different batches of protein. The estimation of K_m and V_{max} values was achieved by the incubation of at least nine different

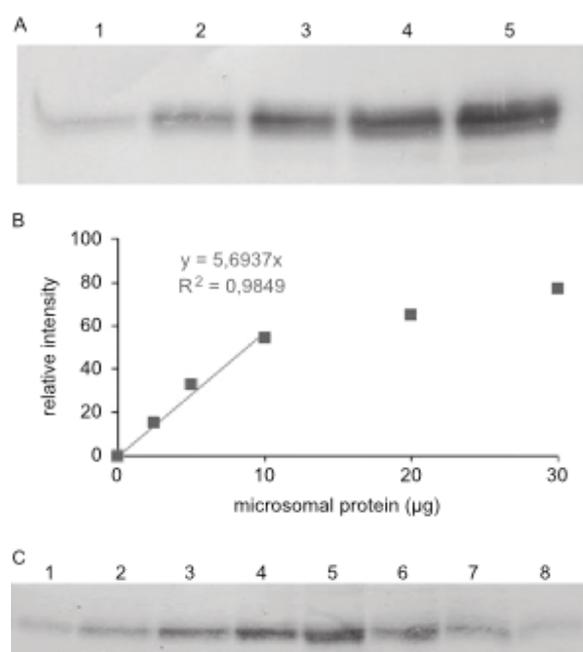


Fig. 2. Semi-quantitative analysis of hVKORC1 mutant by Western blotting. (A) Immunoblot analysis of microsomal proteins (lanes 1 to 5, respectively, 2.5, 5, 10, 20 and 30 µg) of recombinant yeast expressing WT-VKORC1. (B) Relationship between the amount of microsomal proteins containing WT-VKORC1 and the relative intensity of the signal detected. (C) Semi-quantitative analysis of VKORC1-A26P in the microsomal fraction. From lanes 1 to 4, the membrane fractions of recombinant yeast expressing WT-VKORC1 (lanes 1 to 4, respectively, 1.25, 2.5, 5 and 10 µg) were loaded; from lanes 5 to 8, the membrane fractions of recombinant yeast expressing VKORC1-A26P (lane 5s to 8, respectively 10, 5, 2.5, 1.25 µg) were loaded.

concentrations of $K > O$ (from 0.003 to 0.2 mM) to the standard reaction. Incubations were performed in duplicate. Data were fitted by nonlinear regression to the Michaelis-Menten model using the R-fit program [19].

In order to evaluate the inhibiting effect of warfarin, acenocoumarol or fludionone (Fig. 3) on VKOR activity, K_i were determined after addition of various concentrations of anticoagulant to the standard reaction in the presence of increasing amounts of $K > O$ (from 0.003 to 0.2 mM) using anticoagulant concentrations from about 0.05 to $20 \cdot K_i$. Data were fitted by nonlinear regression to the non-competitive inhibition model using the R-fit program [19].

Results

Expression of VKORC1 and its mutants

To assess the functional properties of the WT-VKORC1 and its 25 spontaneous mutants, these proteins were overexpressed as c-myc-fused proteins in *P. pastoris*. Depending on the mutation, the levels of expression of the recombinant protein in the microsomal fraction were different. For hVKORC1-V29L,

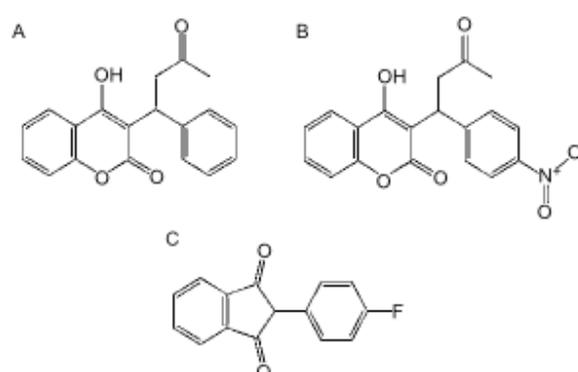


Fig. 3. Chemical structures of the VKA compounds used for the inhibition of the wild-type and mutated hVKORC1 expressed in *Pichia Pastoris*. (A) warfarin; (B) acenocoumarol; (C) fludionone.

absence of expression by the yeast was noticed. This absence of expression prevented more characterization of this mutated protein. All other mutated proteins were efficiently expressed in *Pichia pastoris* with the same expected molecular mass of approximately 20-kDa and the expression factor was comprised between 0.1 and 2 compared with the expression of WT-VKORC1.

The ability of each membrane protein to catalyze the reduction of $K > O$ to K was determined. Fig. 4 compares the VKOR activity of 25 mutated VKORC1 proteins after normalization of their expression at 200 I M of $K > O$. Ten mutations (S52L, S52W, W59L, W59R, V66M, V66G, G71A, N77S, N77T and L128R) led to an almost complete loss (> 98%) of VKOR activity towards $K > O$.

Consequences of the VKORC1 mutations on the VKOR activity

Among the 25 mutations characterized in this study, six mutations led to an increased K_m value. For mutations located in the transmembrane domains, only one mutation (i.e. A26P) located in TM1 led to an increase in the K_m value (3-fold) (Table 2). For mutations located in the luminal loop, the K_m of five mutations (D36G, A41S, V54L, R58G and W59C) were significantly higher than that of the WT. These increases varied between 2-fold for D36G and 9-fold for W59C (Table 3).

Among the 25 mutations, five mutations, all located in the luminal loop, led to modification of V_{max} values (Tables 2 and 3). V_{max} values of D36G, V45A and V54L were 3, 5 and 3.5-fold lower than that of the WT-VKORC1, respectively. Two mutations (A41S and S56F) located also in the luminal loop led to a 5-fold increase in the V_{max} value.

Consequences of the VKORC1 mutations on the susceptibility to VKA

To better understand involvement of the VKORC1 mutations in the VKA resistance phenotype, K_i of three different VKAs

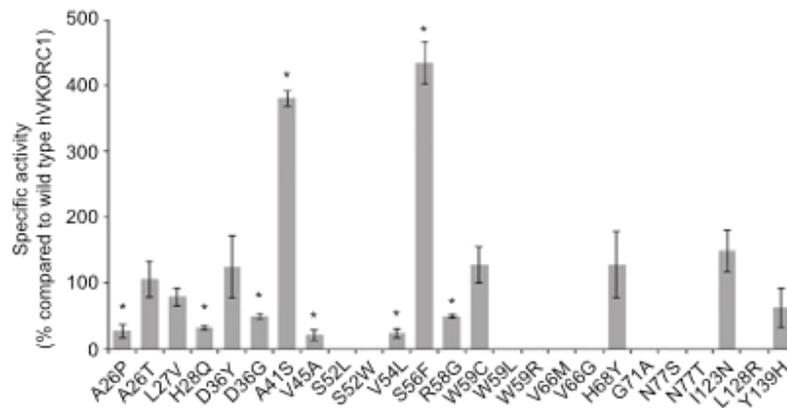


Fig. 4. Specific activity of WT-VKORC1 and its mutants. Enzyme activity was evaluated in the presence of 200 μ M of K¹¹O and 0.25 to 2 μ g L⁻¹ of microsomal proteins containing membrane WT or mutated VKORC1. Values are expressed as % of activity of WT-VKORC1. Each data point represents the mean \pm SD of three individual determinations and is representative of an experiment performed on two different batches of protein. * $P < 0.02$ compared with VKORC1.

Table 2 Apparent kinetic parameters towards K¹¹O of the mutated VKORC1 proteins with mutation located in transmembrane domains

VKORC1	K_m (μ M)	V_{max} (pmol min ⁻¹ mg ⁻¹ of total protein)	V_{max}/K_m (nL min ⁻¹ mg ⁻¹ total protein)	(% compared with WT)
WT	19.8 \pm 4.5	9.4 \pm 1.6	476	100
TM 1				
A26P	57.4 \pm 10.1 [*]	3.4 \pm 1.2	59	12
A26T	18.7 \pm 1.4	12.3 \pm 2.7	657	138
L27V	22.8 \pm 2.9	8.3 \pm 0.6	299	63
H28Q	29.8 \pm 4.6	9.1 \pm 1.6	306	64
TM 3				
I123N	27.0 \pm 2.1	14.2 \pm 1.6	522	110
L128R	ND	ND	ND	< 2
TM 4				
Y139H	9.2 \pm 3.0	5.5 \pm 2.3	598	126

V_{max} values determined at saturating concentration of K¹¹O were evaluated after normalization of the VKORC1 expression level by immunoprecipitation. Each data point represents the mean \pm SD of three individual determinations. * $P < 0.02$ compared with wild type (WT).

Table 3 Apparent kinetic parameters towards K¹¹O of the mutated VKORC1 proteins with mutation in the luminal loop

VKORC1	K_m (μ M)	V_{max} (pmol min ⁻¹ mg ⁻¹ of total protein)	V_{max}/K_m (nL min ⁻¹ mg ⁻¹ total protein)	(% compared with WT)
WT	19.8 \pm 7.7	9.4 \pm 1.6	476	100
D36Y	23.6 \pm 0.2	11.4 \pm 4.0	483	101
D36G	43.8 \pm 0.2 [*]	2.9 \pm 0.1 [*]	65	14
A41S	65.9 \pm 5.4 [*]	41.1 \pm 0.7 [*]	623	131
V45A	26.9 \pm 2.3	1.8 \pm 0.4 [*]	81	17
S52L	ND	ND	ND	< 2
S52W	ND	ND	ND	< 2
V54L	102.5 \pm 28.6 [*]	2.86 \pm 0.1 [*]	28	6
S56F	23.2 \pm 6.2	46.5 \pm 5.1 [*]	2004	421
R58G	71.0 \pm 10.9 [*]	4.4 \pm 1.3	62	13
W59R	ND	ND	ND	< 2
W59C	179.7 \pm 12.5 [*]	20.45 \pm 7.4	113	24
W59L	ND	ND	ND	< 1
V66M	ND	ND	ND	< 2
V66G	ND	ND	ND	< 1
H68Y	16.9 \pm 2.8	10.4 \pm 2.6	618	130
G71A	ND	ND	ND	< 2
N77S	ND	ND	ND	< 2
N77Y	ND	ND	ND	< 2

V_{max} values determined at saturating concentration of K¹¹O were evaluated after normalization of the VKORC1 expression level by immunoprecipitation. Each data point represents the mean \pm SD of three individual determinations. * $P < 0.02$ compared with wild type (WT).

were determined. VKAs inhibited the VKOR activity in a non-competitive manner for all the mutants we analysed (data not shown). K_i values obtained for the mutated VKORC1 are reported in Tables 4 and 5 for mutations located, respectively, in the transmembrane domains or luminal loop. Among the 25 mutations detected in patients clinically resistant to VKA, only six mutations led to increase in K_i . Four mutations (i.e. A26P, I123N, Y139H and V54L) led to resistance to both 4-hydroxycoumarine or indane-1,3-dione derivatives. The A41S mutation led to an increase in the K_i only towards fluindione ($\cdot 9$) and H68Y, only towards 4-hydroxycoumarine derivatives ($\cdot 4$ and $\cdot 6$ for warfarin and acenocoumarol, respectively).

Discussion

Spontaneous VKORC1 mutations were all described in patients with total or partial resistance to VKAs that cannot be explained by demographic or environmental factors (Table 1). Therefore, an association between phenotype and genotype was immediately suggested, but never demonstrated. Therefore in this study, we expressed 25 spontaneous mutants of VKORC1 and determined the functional consequences of the mutation on the recycling of vitamin K by the determination of K_m and V_{max} and on the susceptibility to VKA by the determination of K_i . Recombinant VKORC1 proteins were expressed as membrane bound proteins in *Pichia pastoris* as

previously performed to characterize spontaneous rVKORC1 mutations [18]. This expression system allowed us to obtain recombinant rVKORC1 with catalytic properties (i.e. K_m and K_i) similar to those of the native proteins [18]. On the other hand, these catalytic parameters determined from yeast or liver microsomes were demonstrated to correctly reflect the phenotype observed [11,18,20] in healthy animals of the same age and the same sex, in the presence of a standardized food. Consequently, the determination of the properties of VKORC1 proteins will be useful in the interpretation of the clinical data in humans.

All the spontaneous mutations of the VKORC1 gene were described in patients with moderate to severe resistance to VKAs. Surprisingly, these mutations are widely spread in the VKORC1 sequence and it seems unlikely that all of these residues are involved in VKA interaction. In our study, only six mutations (A26P, A41S, V54L, H68Y, I123N and Y139H) led to a significant increase in the K_i towards VKA (Fig. 5). The A26P mutation was described only from one heterozygote patient who was treated with up to 20 mg day⁻¹ warfarin or 100 mg day⁻¹ fluindione [21] without reaching a stable anticoagulation. Two patients heterozygous for the V54L mutation were described [21,22]. The stable anticoagulation was not reached for one of the patients despite the higher dose ($\cdot 3$) and the changes of VKA used [21], while for the other patient, a 5-fold dose of warfarin led to a stable anticoagulation [22]. I123N

Table 4 K_i values of the mutated VKORC1 proteins with mutation located in transmembrane domains towards various vitamin K antagonists

VKORC1	Warfarin (I M)	Acenocoumarol (I M)	Fluindione (I M)
WT	1.65 ± 0.79	0.33 ± 0.18	0.25 ± 0.14
TM 1			
A26P	18.43 ± 5.82 [†]	2.93 ± 1.25 [†]	> 5
A26T	2.13 ± 0.56	0.22 ± 0.02	0.43 ± 0.32
L27V	1.83 ± 0.62	0.52 ± 0.33	0.54 ± 0.08
H28Q	0.65 ± 0.42	0.26 ± 0.07	0.44 ± 0.30
TM 3			
I123N	4.01 ± 1.01 [†]	1.23 ± 0.33 [†]	1.54 ± 0.45 [†]
TM 4			
Y139H	5.91 ± 1.77 [†]	0.80 ± 0.24	1.01 ± 0.13 [†]

Inhibition parameters were assessed using anticoagulant concentrations from about 0.05 to 20 $\cdot K_i$.

Table 5 K_i values of the mutated VKORC1 proteins with mutation in the luminal loop towards various vitamin K antagonists

VKORC1	Warfarin (I M)	Acenocoumarol (I M)	Fluindione (I M)
WT	1.65 ± 0.79	0.33 ± 0.18	0.25 ± 0.14
D36Y	1.82 ± 0.70	0.99 ± 0.65	0.35 ± 0.08
D36G	0.74 ± 0.25	0.13 ± 0.03	0.95 ± 0.32
A41S	1.78 ± 0.02	0.44 ± 0.07	3.04 ± 0.45 [†]
V45A	1.10 ± 0.04	0.26 ± 0.13	0.17 ± 0.03
V54L	7.95 ± 1.32 [†]	3.90 ± 0.71 [†]	4.81 ± 0.68 [†]
S56F	1.05 ± 0.82	0.46 ± 0.17	0.42 ± 0.25
R58G	1.50 ± 0.36	0.30 ± 0.06	0.95 ± 0.29
W59C	1.16 ± 0.20	0.40 ± 0.14	0.18 ± 0.05
H68Y	6.21 ± 0.85 [†]	2.04 ± 0.98 [†]	0.65 ± 0.18

Inhibition parameters were assessed using anticoagulant concentrations from about 0.05 to 20 $\cdot K_i$.

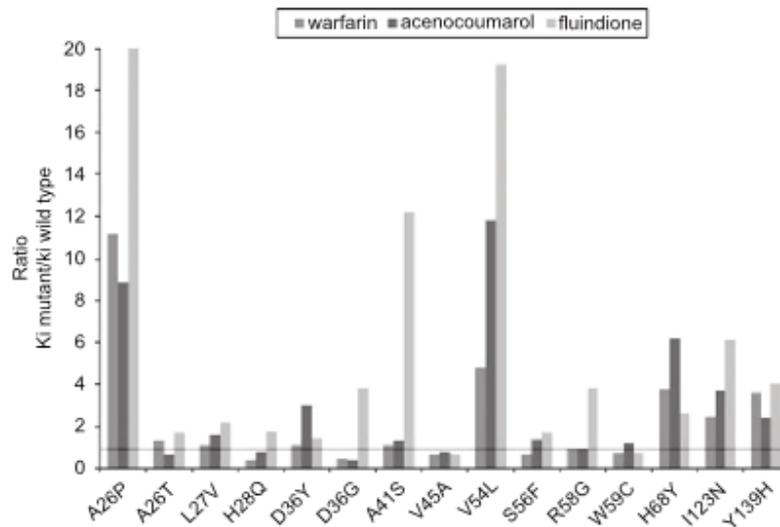


Fig. 5. Comparison of the inhibition effect of warfarin, acenocoumarol and flutidione using recombinant yeast microsomes expressing mutated VKORC1, comparative to WT-VKORC1.

and Y139H mutations were recently reported also from heterozygote patients treated with a high dose of phenprocoumon, a derivative of the 4-hydroxycoumarine (i.e. $\cdot 7$ and $\cdot 3$ for I123N and Y139H, respectively) [23] without reaching stable anticoagulation. In our study, A26P, V54L, I123N and Y139H mutations led to 11-, 5-, 3- and 4-fold increases in the K_i towards warfarin, respectively, suggesting the involvement of these mutations in the phenotype observed in the heterozygote patients carrying these mutations. Unfortunately, it is difficult to evaluate the relationship between the increase in the K_i and the increase in the dose of VKA necessary to reach stable anticoagulation. Indeed, despite the increase of the dose of VKA, a stable anticoagulation was not reached for most of the patients who were carriers of one of these four mutations, except for one patient described by Harrington et al. [22]. For this patient stable anticoagulation was reached with 35 mg day^{-1} warfarin (i.e. 5-fold the usual dose) [22].

In our study, K_i for warfarin increased 5-fold, which is consistent with the increase in the dose reported by Harrington et al., suggesting the importance of knowing the mutation and the increase in the K_i induced by the mutation for treatment based on VKAs. For A41S and H68Y mutations also associated with increase in K_i , no or few clinical data are available in the related literature [2,24] and comparison of our results with the clinical phenotype is thus impossible. Surprisingly, both mutations do not seem to lead to global resistance to VKA. A41S mutation leads to an increase in the K_i only towards flutidione, an indane-1,3-dione derivative. H68Y mutation leads to an increase in the K_i only towards 4-hydroxycoumarine derivatives. These results suggest that patients who are carriers of the A41S mutation must be treated with a normal dose of 4-hydroxycoumarine derivatives to obtain stable anticoagulation, while patients who are carriers of H68Y mutations must be treated with a normal dose of

flutidione. The demonstration of the causality of A26P, A41S, V54L, H68Y, I123N and Y139H point mutations in the resistance phenotype should be taken into account to direct the choice of the molecule and the dose to be used.

Among these six mutations, only the consequences of the Y139H mutation were predictable. Indeed, Y139 was proposed to be involved in the binding of VKAs [25] and the substitutions of Y139 by F, C or S lead to severe resistance to VKAs in rats [16,18,20]. The I123 located in TM3 [23], in front of the proposed T138-Y139-A140 binding site of VKA [25], could be involved in the binding of VKA by hydrophobic interaction. But it is more likely that its replacement by an N could modify the positioning of the VKA in the binding site. The A41, V54 and H68 are located in the luminal loop, suggesting the involvement of this luminal loop in the stabilization of VKAs. The involvement of the A26 in the binding of VKAs can be excluded because the substitution of this amino acid residue by T does not modify the K_i values in humans and rats [26]. P substitution at position 26 could drastically change the structure of the protein and therefore would be responsible for the increase in K_i and K_m .

In our study, the 19 VKORC1 mutations do not lead to an increase in K_i , while these mutations were described in patients resistant to VKAs. Among these 19 mutations, nine mutated proteins are able to catalyze the reduction of $K > O$ to K (i.e. A26T, L27V, H28Q, D36Y, D36G, V45A, S56F, R58G and W59C). Partial characterization of V45A and R58G was previously reported [10] and K_i determined herein are strictly coherent with this partial characterization. For these nine mutations, various hypotheses should be considered. (i) VKORC1 mutation is not causative for the resistance phenotype and the cause of the resistance was not found in the patient who is a carrier of this mutation. (ii) VKOR activity is not mediated by a single protein, but by a multienzyme complex

and our model, too simplified, does not mimic certain mechanisms of resistance such as VKORC1-calumenin interaction described as a possible mechanism of resistance [27].

Among the 19 mutations, 10 mutated proteins (i.e. S52L, S52W, W59L, W59R, V66M, V66G, G71A, N77S, N77T and L128R) are almost not able to catalyze the reduction of $K > O$ to K and three mutated proteins (i.e. D36G, V45A and R58G) catalyze the reduction of $K > O$ to K with an enzymatic efficiency (V_{max}/K_m) at least 85% lower than that of the WT. These mutations were all detected in heterozygote patients, suggesting that VKOR activity supported by a unique valid allele is sufficient to maintain a normal coagulation and thus a sufficient pool of gamma-carboxylated clotting factors II, VII, IX and X. Indeed, Harrington et al. showed that the V66M mutation in heterozygotes is not associated with an increase in the INR (International Normalized Ratio), an increase in the PIVKA (protein induced by vitamin K absence) or an increase in the plasma vitamin $K > O$ [28]. These inactivating mutations were all detected in patients requiring a high dose of VKA. Nevertheless, the link between an inactivating VKORC1 mutation and a clinical resistance to VKA is difficult to explain. These results might suggest the existence of other mechanisms of resistance still not identified in patients who are carriers of these mutations.

The VKORC1 mutations impairing partially or totally the VKOR activity are essentially located in a 42-aa segment in the luminal loop, suggesting its crucial role in the functioning of the enzyme. These mutations could modify the conformation of the VKORC1 or the internal electron transfer pathway. Indeed, it was suggested that the luminal loop containing C43 and C51 participates in the electron transfer from the redox partner to C132-135 of the CXXC active site [13,29,30]. In our experimental conditions, the redox partner is mimicked by the dithiothreitol molecule. Several studies described that dithiothreitol can directly reduce the active site of VKORC1 and hence activate the protein for catalysis even when C43 and 51 of VKORC1 are mutated [14,29]. Nevertheless, in our experimental conditions in the presence of VKORC1 protein located inside the membrane without any detergent, the substitution of C43 or 51 by A leads to a loss of activity (data not shown), similarly to what was observed by Rost et al. [30]. This result suggests that in our experimental conditions, the reduction of C43-51 by dithiothreitol might precede the reduction of C132-135. The characterization of the VKOR activity catalyzed by the recombinant hVKORC1 expressed in the microsomal fraction of yeasts thus could allow us to explore the reduction of vitamin $K > O$ to vitamin K, but also the internal electron transfer pathway from C43-51 to C132-135. In this case, because many mutations of the luminal loop lead to modification of the velocity of the VKORC1 contrary to the mutations located in the TM domains, the internal electron transfer could be the rate-limiting step of the VKORC1 cycle. It is also interesting to note that many mutations of the luminal loop also lead to an increase in the K_m values, suggesting the involvement of the luminal loop in the substrate interaction. According to the 3-D structure of the bacterial homologue of

VKORC1 from *Synechococcus* sp., this luminal loop would form a lid on the four-helix bundle where $K > O$ is located, shielding the substrate from the periplasmic space [13]. The mutations leading to a drastic or complete loss of activity of the enzyme are almost all located in this luminal loop. Because the luminal loop is likely to be involved in the internal electron transfer and in the substrate interaction by shielding the substrate from the periplasmic space, we can suggest that inactivating mutations disrupt either the internal electron transfer or the substrate binding. Further studies will be necessary in order to elucidate this question.

Addendum

A. Hodroge, B. Matagrín, C. Moreau, I. Fourel, A. Hammed and V. Lattard performed experiments; A. Hodroge, E. Benoit and V. Lattard designed the research, analyzed results and wrote the paper.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Agence Nationale pour la Recherche (RODENT 2009-CESA-008-03) and by DGER. The authors thank V. Siguret (Service d'Hématologie Biologique—Hôpital Européen Georges Pompidou) for helpful discussion.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors declare no competing financial interests.

References

- 1 Wysowski DK, Nourjah P, Swartz L. Bleeding complications with warfarin use: a prevalent adverse effect resulting in regulatory action. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1414–9.
- 2 Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, Blough DK, Thummel KE, Veenstra DL, Rettie AE. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 2005; 352: 2285–93.
- 3 D'Andrea G, D'Ambrosio R, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, Grandone E, Margaglione M. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 2005; 105: 645–9.
- 4 Bodin L, Horellou MH, Flaujac C, Lorient MA, Samama MM. A vitamin K epoxide reductase complex subunit-1 (VKORC1) mutation in a patient with vitamin K antagonist resistance. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1533–5.
- 5 Veenstra DL, You JH, Rieder MJ, Farin FM, Wilkerson HW, Blough DK, Cheng G, Rettie AE. Association of vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) variants with warfarin dose in Hong Kong Chinese patient population. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 687–91.
- 6 Sconce E, Khan T, Mason J, Noble F, Wynne H, Kamali F. Patients with unstable control have a poorer dietary intake of vitamin K compared to patients with stable control of anticoagulation. *Thromb Haemost* 2005; 93: 872–5.
- 7 van Schie RM, Wadelius MI, Kamali F, Daly AK, Manolopoulos VG, DeBoer A, Barallon R, Verhoef TI, Kirchheiner J, Haschke-Becher E, Briz M, Rosendaal FR, Redekop WK, Pirmohamed M, Maitland van der Zee AH. Genotype-guided dosing of coumarin derivatives: the

- European pharmacogenetics of anticoagulant therapy (EU-PACT) trial design. *Pharmacogenomics* 2009; 10: 1687–95.
- 8 Epstein RS. E ed of *Genotyping Warfarin Patients on Outcomes: Results From the National Community-Based Medco-Mayo Warfarin Effectiveness Study. Late-Breaking Trials IV*. Atlanta: Congrès de l'American College of Cardiology, 2010.
 - 9 Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Ståord DW. Identification for the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 2004; 427: 541–4.
 - 10 Rost S, Fregin A, Ivaskевич V, Conzelmann E, Hörtnagl K, Pelz HJ, Lapegard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EG, Müller CR, Strom TM, Oldenburg J. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004; 427: 537–41.
 - 11 Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Videmann B, Billeret M, Berny P, Benoit E. Warfarin resistance in a French strain of rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2005; 19: 379–85.
 - 12 Oldenburg J, Marinova M, Müller-Reible C, Watzka M. The vitamin K cycle. *Vitam Horm* 2008; 78: 35–62.
 - 13 Li W, Schulman S, Dutton RJ, Boyd D, Beckwith J, Rapoport TA. Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide. *Nature* 2010; 463: 507–12.
 - 14 Jin DY, Tie JK, Ståord DW. The conversion of vitamin K epoxide to vitamin K quinone and vitamin K quinone to vitamin K hydroquinone uses the same active site cysteines. *Biochemistry* 2007; 46: 7279–83.
 - 15 Goodstadt L, Ponting CP. Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 289–92.
 - 16 Pelz J, Rost S, Hunerberg M, Fregin A, Heiberg AC, Baert K, MacNicol AD, Prescott CV, Walker AS, Oldenburg J, Müller CR. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics* 2005; 170: 1839–47.
 - 17 Tishler M, Fieser L, Wendler N. Hydro, oxydo and other derivatives of vitamin K1 related compounds. *J Am Chem Soc* 1940; 62: 2866–71.
 - 18 Hodroge A, Longin-Sauvageon C, Fourel I, Benoit A, Lattard V. Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K. *Arch Biochem Biophys* 2011; 515: 14–20.
 - 19 Ihaka R, Gentleman R. A language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Stat.* 1996; 5: 299–314.
 - 20 Grandemange A, Kohn MH, Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Berny P, Benoit E. Consequences of the Y139F Vkorc1 mutation on resistance to AVKs: in vivo investigation in a 7th generation of congenic Y139F strain of rats. *Pharmacogenet Genomics* 2009; 19: 742–50.
 - 21 Bodin L, Perdu J, Diry M, Horellou MH, Lorient MA. Multiple genetic alterations in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 gene (VKORC1) can explain the high dose requirement during oral anticoagulation in humans. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1436–9.
 - 22 Harrington DJ, Gorska R, Wheeler R, Davidson S, Murden S, Morse C, Shearer MJ, Mumford AD. Pharmacodynamic resistance to warfarin is associated with nucleotide substitutions in VKORC1. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1663–70.
 - 23 Watzka M, Geisen C, Bevans CG, Stittinger K, Spohn G, Rost S, Seifried E, Müller CR, Oldenburg J. Thirteen novel VKORC1 mutations associated with oral anticoagulant resistance: insights into improved patient diagnosis and treatment. *J Thromb Haemost.* 2011; 9: 109–18.
 - 24 Osman A, Enström C, Arbrink K, Söderqvist P, Lindahl TL. Main haplotypes and mutational analysis of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) in a Swedish population: a retrospective analysis of case records. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1723–9.
 - 25 Oldenburg J, Bevans CG, Müller CR, Watzka M. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1): the key protein of the vitamin K cycle. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 347–53.
 - 26 Rost S, Pelz HJ, Menzel S, MacNicol AD, León V, Song KJ, Jäkel T, Oldenburg J, Müller CR. Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice—a response to 50 years of selection pressure by warfarin. *BMC Genet* 2009; 6: 10–4.
 - 27 Wallin R, Hutson SM, Cain D, Sweatt A, Wallin R. A molecular mechanism for genetic warfarin in the rat. *FASEB J.* 2001; 15: 2542–4.
 - 28 Harrington DJ, Siddiq S, Allford SL, Shearer MJ, Mumford AD. More on: endoplasmic reticulum loop VKORC1 substitutions cause warfarin resistance but do not diminish gamma-carboxylation of the vitamin K-dependent coagulation factors. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 1093–5.
 - 29 Rishavy MA, Usualieva A, Hallgren KW, Berkner KL. Novel insight into the mechanism of the vitamin K oxidoreductase (VKOR): electron relay through Cys43 and Cys51 reduces VKOR to allow vitamin K reduction and facilitation of vitamin K-dependent protein carboxylation. *J Biol Chem* 2011; 286: 7267–78.
 - 30 Rost S, Fregin A, Hunerberg M, Bevans CG, Müller CR, Oldenburg J. Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. *Thromb Haemost* 2005; 94: 780–6.
 - 31 Pooch K, Pruvot S, Gourmel C, Sollier CB, Drouet L. A new VKORC1 mutation leading to an isolated resistance to fluidione. *Br J Haematol* 2009; 145: 841–3.
 - 32 Loebstein R, Dvoskin I, Halkin H, Vesler M, Lubetsky A, Rechavi G, Amariglio N, Cohen Y, Ken-Dror G, Almog S, Gak E. A coding VKORC1 Asp36Tyr polymorphism predisposes to warfarin resistance. *Blood* 2007; 109: 2477–80.
 - 33 Schmeits PC, Hermans MH, van Geest-Daelderop JH, Poodt J, De Sauvage Nolting PR, Conemans JM. VKORC1 mutations in patients with partial resistance to phenprocoumon. *Br J Haematol* 2010; 148: 955–7.
 - 34 Wilms EB, Touw DJ, Conemans JM, Veldkamp R, Hermans M. A new VKORC1 allelic variant (p. Trp59Arg) in a patient with partial resistance to acenocoumarol and phenprocoumon. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1224–6.

6.2. Caractérisation des propriétés catalytiques de la VKORC1L1 et rôle de cette enzyme dans le recyclage de la vitamine K dans certains tissus extra-hépatiques

Objectifs :

Alors que des effets anticoagulants sont évidents suite à un traitement AVK, les perturbations au niveau de la calcification artérielle ou dans le métabolisme osseux sont très limitées aussi bien chez l'homme que chez les rongeurs. L'hypothèse que nous posons est la suivante : une autre enzyme permettrait de catalyser la réaction VKOR dans des tissus extra-hépatiques et ainsi de suppléer la VKORC1 lorsqu'elle est inhibée. Nous avons donc décidé de caractériser enzymatiquement une protéine peu étudiée, paralogue à la VKORC1 : la VKORC1L1.

Méthodes :

Dans un premier temps, nous avons comparé la distribution tissulaire des ARN de VKORC1L1 (parallèlement aux ARN de VKORC1) dans des tissus de rats, mais également dans les tissus chez des souris *Vkorc1^{-/-}* fournies par l'institut d'immuno-hématologie de l'université de Francfort. Les caractéristiques catalytiques des enzymes VKORC1 et VKORC1L1 ont ensuite été déterminées grâce à des protéines recombinantes exprimées en levure *Pichia pastoris*. Enfin, la réponse au coumafène de ces différents tissus a été étudiée par détermination des constantes catalytiques K_M et V_{max} et des constantes d'inhibition de l'activité VKOR. La proportion d'activité VKOR des deux enzymes a été déterminée par régression non linéaire grâce à la formule de Michaelis-Menten.

Principaux résultats :

- L'étude transcriptionnelle montre que contrairement à VKORC1 qui est principalement exprimée dans le foie, les ARN de VKORC1L1 se retrouvent de manière ubiquitaire dans tous les tissus testés. Toutefois, la proportion des transcrits de VKORC1 et de VKORC1L1 varie ; on retrouve, par exemple, plus d'ARN de VKORC1L1 que de VKORC1 dans les testicules.
- L'enzyme recombinante de VKORC1L1 humaine exprimée en levure a une constante d'inhibition 30 fois plus élevée que l'enzyme hVKORC1. La VKORC1L1 du rat présente un K_i encore plus élevé (50 fois plus grand que celui de rVKORC1).
- Dans le foie, l'activité VKOR est exclusivement catalysée par VKORC1, tandis que dans certains tissus extra-hépatiques la VKORC1L1 participe également à la réduction de la vitamine K époxyde. Ces mêmes tissus requièrent par ailleurs des doses plus élevées de coumafène pour obtenir une diminution de l'activité VKOR.

Ces résultats sont présentés dans l'article publié en 2013 dans le *Journal of Biological Chemistry* et intitulé « **VKORC1L1, an enzyme rescuing the VKOR activity in some extrahepatic tissues during anticoagulant therapy** ».

VKORC1L1, an Enzyme Rescuing the Vitamin K 2,3-Epoxyde Reductase Activity in Some Extrahepatic Tissues during Anticoagulation Therapy*

Received for publication, January 27, 2013, and in revised form, June 21, 2013. Published, JBC Papers in Press, August 8, 2013, DOI 10.1074/jbc.M113.457119

Abdesslem Hammed[‡], Benjamin Matagrín[‡], Gabriele Spohn[§], Caroline Prouillac[‡], Etienne Benoit[‡], and Virginie Lattard^{†1}

From the [†]Unité Sous Contrat (USC) 1233 Institut National de Recherche Agronomique (INRA)-Vetagro Sup, Veterinary School of Lyon, 69280 Marcy l'Étoile, France and the [§]German Red Cross Blood Service and Institute for Transfusion Medicine and Immunohematology, Goethe University, D-60528 Frankfurt, Germany

Background: Effective involvement of VKORC1L1 in vitamin K epoxide reductase activity, target of vitamin K antagonists (VKAs), is still unclear.

Results: VKORC1L1 is not inhibited by VKAs and catalyzes VKOR activity in extrahepatic tissues.

Conclusion: During long term anticoagulation the limited unwanted side effects of VKAs are due to VKORC1L1.

Significance: Potential pharmacotoxicologic effects of specific VKORC1L1 inhibitors should be assessed.

Vitamin K is involved in the γ -carboxylation of the vitamin K-dependent proteins, and vitamin K epoxide is a by-product of this reaction. Due to the limited intake of vitamin K, its regeneration is necessary and involves vitamin K 2,3-epoxide reductase (VKOR) activity. This activity is known to be supported by VKORC1 protein, but recently a second gene, VKORC1L1, appears to be able to support this activity when the encoded protein is expressed in HEK293T cells. Nevertheless, this protein was described as being responsible for driving the vitamin K-mediated antioxidant pathways. In this paper we precisely analyzed the catalytic properties of VKORC1L1 when expressed in *Pichia pastoris* and more particularly its susceptibility to vitamin K antagonists. Vitamin K antagonists are also inhibitors of VKORC1L1, but this enzyme appears to be 50-fold more resistant to vitamin K antagonists than VKORC1. The expression of *Vkorc1l1* mRNA was observed in all tissues assayed, i.e. in C57BL/6 wild type and VKORC1-deficient mouse liver, lung, and testis and rat liver, lung, brain, kidney, testis, and osteoblastic cells. The characterization of VKOR activity in extrahepatic tissues demonstrated that a part of the VKOR activity, more or less important according to the tissue, may be supported by VKORC1L1 enzyme especially in testis, lung, and osteoblasts. Therefore, the involvement of VKORC1L1 in VKOR activity partly explains the low susceptibility of some extrahepatic tissues to vitamin K antagonists and the lack of effects of vitamin K antagonists on the functionality of the vitamin K-dependent protein produced by extrahepatic tissues such as matrix Gla protein or osteocalcin.

Vitamin K-dependent γ -glutamyl carboxylase (GGCX)² converts glutamate to a carboxylated glutamate (Gla) of a lim-

ited number of protein called vitamin K-dependent proteins (VKDPs) (Fig. 1). These proteins correspond either to proteins involved in the coagulation process, coagulation factor II, VII, IX, and X and protein C, S, and Z synthesized in the liver or to proteins produced by extrahepatic tissues such as osteocalcin (OC) (1), matrix Gla protein (MGP) (2), periostin (3), Gas6 protein (4), and Gla-rich protein (5).

The extent of the γ -carboxylation is crucial for these proteins. γ -Carboxylated MGP is a major inhibitor of vascular calcification whereas the undercarboxylated form is inactive (6). On the other hand, undercarboxylated OC appears to act as a hormone produced and secreted by the bone and targeting the pancreas to increase insulin production (7, 8) whereas carboxylated OC accumulates in the bone and binds strongly and selectively to hydroxyapatite in an association in which the γ -carboxyglutamyl side chains interact directly with the mineral surface.

Whereas GGCX produces Gla residues in the substrate protein, the co-substrate of GGCX, vitamin K hydroquinone (vit KH₂), is oxygenated into vitamin K 2,3-epoxide (vit K₂O) (9) (Fig. 1). Because the dietary intake of vitamin K (vit K) is limited, vit K₂O must be recycled to vit KH₂ before it can be reused. In this way, one molecule of vit K can assume approximately 500 carboxylation reactions (10). This reaction is catalyzed by the vitamin K epoxide reductase (VKOR) activity. This activity is inhibited in a noncompetitive manner by vitamin K antagonists (VKAs) (11) (Fig. 1). In 2004, two groups simultaneously described the gene VKORC1 (12, 13), which encodes the VKORC1 protein. The recombinant VKORC1 protein expressed either in HEK293T cells (12) or in baculovirus (14) or in *Pichia pastoris* (15, 16) effectively catalyzes the VKOR activity and is inhibited by VKAs.

In vivo, VKAs actively inhibit VKORC1 in the liver and thus limit the γ -carboxylation of hepatic VKDPs, resulting in an

* This work was supported by Agence Nationale pour la Recherche Grant RODENT 2009-CESA-008-03 and by Direction Générale de l'Enseignement et de la Recherche (DGER).

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-0-4-78-44-24-11; Fax: 33-0-4-78-87-05-16; E-mail: virginie.lattard@vetagro-sup.fr.

² The abbreviations used are: GGCX, γ -glutamyl carboxylase; Gla, carboxylated glutamate; MGP, matrix Gla protein; OC, osteocalcin; vit K, vitamin K

VKA, vitamin K antagonist; VKDP, vitamin K-dependent protein; vit KH₂, vitamin K hydroquinone; vit K₂O, vitamin K 2,3-epoxide; VKOR, vitamin K epoxide reductase; VKORC1, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1; VKORC1L1, VKORC1-like 1.

VKORC1L1 Supports VKOR Activity in Extrahepatic Tissues

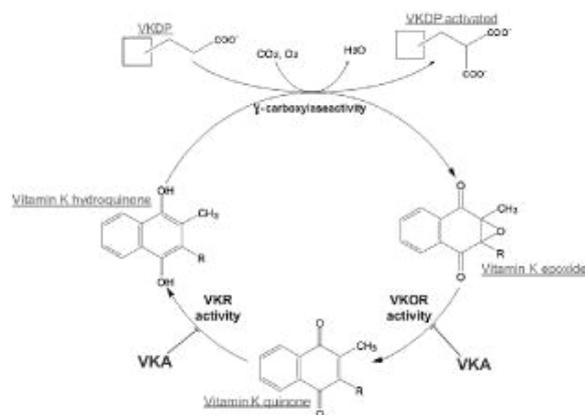


FIGURE 1. The vitamin K cycle.

intense anticoagulant effect. Surprisingly, limited side effects such as arterial calcifications or modifications in energetic metabolism were observed in human (17, 18) although these VKAs are used extensively worldwide. The number of dispensed outpatient prescriptions for warfarin increased by 45% from 21 million in 1998 to nearly 31 million in 2004 (19). Nevertheless, arterial calcifications were observed in human only after many years of VKA treatment (20, 21). In laboratory animals, ectopic calcifications were observed in mice $\text{ApoE}^{\text{X/X}}$ treated by warfarin (20). Similarly, OC depletion in bone was observed consecutively to the use of warfarin (22, 23). Nevertheless, the dose of warfarin used in both studies was completely disproportionate compared with the therapeutic dose used in human medicine. Indeed, the dose was, respectively, 60 mg/kg/day and 77 mg/kg/day whereas the human posology is 5 mg/human per day, which is about 0.1 mg/kg/day. In rats, a similar dosage, 0.08 mg/kg/day, is sufficient to obtain 50% mortality due to excessive bleeding if repeated for 90 days. As a consequence, extrahepatic tissues seem to present a low susceptibility to VKA compared with liver. Pharmacokinetics or limited entry in cells could be considered as an explanation of this phenomenon. A limited susceptibility of VKOR activity to VKAs could be another explanation.

Until 2011, VKORC1 protein was considered as the only protein supporting VKOR activity. Nevertheless, vertebrate genomes include two paralogous enzymes, VKORC1 and VKORC1-like 1 (VKORC1L1), likely resulting from a gene duplication of an early common VKOR ancestor. In 2011, Westhofen et al. demonstrated that the VKORC1L1 gene encodes a protein able to reduce vit K₁O to vit K when VKORC1L1 is expressed in HEK293T cells (24). Nevertheless, this VKOR activity was described to present a low enzymatic efficiency. Westhofen et al. suggested that this enzyme preferably reduced vit K to vit KH₂. Therefore, VKORC1L1 was proposed to be responsible for driving vitamin K-mediated intracellular antioxidant pathways critical to cell survival by generating vit KH₂ (24), a potent biological antioxidant, without considering its involvement in the β -carboxylation of VKDPs. The aim of this study was to determine whether VKORC1L1 may assume VKOR activity in extrahepatic tissues and thus rescue VKOR activity in the absence or inhibition of VKORC1 protein.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals—Male OFA Sprague-Dawley rats (9 weeks old) and male C57BL/6 mice were obtained from a commercial breeder (Charles River, L'Arbresles, France) and acclimated for a minimal period of 5 days. Food and water were available ad libitum. VKORC1 knock-out male mice (25) were obtained from the Institute of Transfusion Medicine and Immunohematology (Frankfurt, Germany). Mice were maintained alive for 9 weeks by daily oral administration of vit K₁. Depending on the weight of the mice, they received a dose between 50 mg/kg body weight (newborns) and 5 mg/kg body weight for the adult mice. Rats and mice were killed by decapitation. Liver, lung, kidney, brain, and testis were removed quickly and used immediately for RNA extraction.

Osteosarcoma Cell Culture—The rat osteosarcoma cell lines ROS 17/2.8 were a generous gift from Merck and were used between passages 4 and 8. Cells were grown in 75-cm² culture plates (Falcon, VWR International, Strasbourg, France) with DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Perbio Science, Brébières, France) and 100 units/ml penicillin/streptomycin (Invitrogen). The cultures were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Cells were subcultured twice a week. When grown to confluence, cells were harvested and resuspended in RNaprotect Cell Reagent (Qiagen) for RNA extraction or in HEPES-glycerol buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, containing 20% glycerol) for preparation of cell by sonication.

Total RNA Extraction and cDNA Synthesis—Total RNA was extracted from five different tissues (liver, testis, lung, brain, and kidney) first with TRIzol reagent (Invitrogen) and then by using the SV Total RNA Isolation System (Promega). For each tissue or cell culture, three separate RNA extractions were made. RNA concentration and purity were analyzed using a UV-160A spectrophotometer (Shimadzu, Roucaire, France), measuring spectral absorption at 260 and 280 nm. cDNA templates were synthesized from 100 ng of total RNA in a final volume of 20 μ l containing 500 pmol of oligo(dT)₁₈ and 200 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol.

Quantitative Real-time PCRs—Quantitative real time-PCRs were performed with the MX3000P qPCR Machine (Stratagene) using primers for *Vkorc1*, *Vkorc1L1*, *Ggcs*, or *Nqo1*. Primer sequences for *Vkorc1* amplification were 5'-TCCCCTCTCTCTCTCT-3' (forward) and 5'-CGTCCCCTCAAGCAACCTA-3' (reverse). Primer sequences for *Vkorc1L1* amplification were 5'-CGAGCCAAACAGTGTCTTTGGACTTA-3' (forward) and 5'-TGTGGTGACGCAGATGATGCAA-3' (reverse). *Gapdh* was used as a housekeeping gene. Sequences of the *Gapdh* primers were as follows: 5'-CAGAACATCATCCTGCATC-3' (forward) and 5'-CTGCTTACCACCTTCTTGA-3' (reverse). The housekeeping gene was amplified under the same conditions used for the amplification of the target genes. Briefly, in a final volume of 20 μ l, 5 ng of cDNA was added to an optimal amplification reaction mixture containing 5 \times HOT BIOAmp EvagreenA qPCR Mix (Biofidal, Vaux-en-Valin, France) and a 200 nM concentration of each primer. Thermal cycling was as follows: activation of the HOT

VKORC1L1 Supports VKOR Activity in Extrahepatic Tissues

BIOampADNA polymerase at 95 °C for 15 min and 40 cycles of amplification (95 °C for 30 s, 60 °C for 40 s, and 72 °C for 30 s). To determine the specificity of amplification, analysis of product melting was conducted after the 40 cycles of amplification: a melting curve was obtained by increasing the temperature at a rate of 0.01 °C/s from 60 to 95 °C. In these conditions, *Vkorc1* and *Vkorc1l1* amplification efficiencies were similar (respectively, 101 and 99%) and allowed the comparison of their relative expression. The point at which the PCR product is first detected above a fixed threshold, the thermal cycle threshold (C_t), was determined for each sample in duplicate, and the average C_t of duplicate sample was calculated. To determine the quantity of the target gene-specific transcripts present in different tissues relative to the control, their respective C_t values were normalized by subtracting the C_t value obtained from the *Gapdh* control ($rCt = C_t \text{ target} - C_t \text{ control}$), and the relative concentration was determined using 2^{-rCt} .

Plasmid Constructions—Human and rat VKORC1 and VKORC1L1 coding sequences fused with a c-myc tag via a flexible (GGG)₃ in its 3'-extremity was optimized for heterologous expression in yeast and synthesized by GenScript (Piscataway, NJ). Synthesized nucleotide sequences included *EcoRI* and *XbaI* restriction sites at their 5'- and 3'-extremities, respectively. These nucleotide sequences were subcloned into pPICZ-B (Invitrogen) and sequenced on both strands.

Heterologous Expression in *P. pastoris*—Heterologous expressions of VKORC1 and VKORC1L1 proteins were performed in *P. pastoris* as described previously (15, 16). pPICZ-VKORC1 or VKORC1L1 vectors were individually transformed into the *P. pastoris* SMD1168 yeast strain using the *P. pastoris* Easy Comp Transformation kit (Invitrogen). Transformants were selected on YPD plates (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) dextrose) containing 100 µg/ml zeocin (Invitrogen). The cells were grown in BMGY medium (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34% (w/v) yeast nitrogen base, and 1% (v/v) glycerol). Expression was induced by methanol (1% v/v) for 48 h at 30 °C in a rotary shaker (200 rpm). Yeast cells were collected by centrifugation (3000 × g for 10 min) and immediately frozen at -80 °C.

Subcellular Fractionation of Recombinant Yeast Cells—Yeast microsomes were prepared from thawed yeast cells by differential centrifugation. Briefly, yeast cells were resuspended in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 1.15% (w/v) KCl. Yeast cells were broken with zircon beads using Dispermat LC30 (VMA-GETZMANN) (15 min at 3500 rpm) continuously at 4 °C and further submitted to differential centrifugation. The 100,000 × g pellet corresponding to the membrane fraction was resuspended by Potter homogenization in Hepes glycerol buffer (50 mM Hepes, 20% glycerol, pH 7.4). Protein concentrations were evaluated by the method of Bradford using bovine serum albumin as a standard. Microsomes were frozen at -80 °C and used for kinetic analysis.

Immunoblot Analysis—Expression level quantification of VKORC1 and VKORC1L1 proteins in microsomal fractions was determined by Western blotting as described previously (16). Microsomal proteins were separated on 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto Immobilon-P membranes, and probed with anti-c-myc antibodies (Invitro-

gen). The resulting immunocomplexes were visualized using alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse immunoglobulins as secondary antibodies and a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium solution. Quantification of the stained bands was performed by densitometry using the Scion Image software. The relative intensity of the signal was correlated with the quantity of microsomal proteins. The relation was linear from 0 to 50 µg for microsomal proteins.

To evaluate the expression level of VKORC1 and VKORC1L1 proteins, the expression of wild type human VKORC1 was designated as the basal expression. For the quantification of rat VKORC1 or human VKORC1L1 or rat VKORC1L1, the same unique pool of yeast microsomes containing human VKORC1 was used. Therefore, its expression factor was by definition 1. The expression level of rat VKORC1 or human or rat VKORC1L1 was evaluated by comparison with the expression of human VKORC1. For this purpose, various amounts (from 0 to 20 µg) of microsomal proteins containing human VKORC1 and various amounts (depending on the expression level) of microsomal proteins containing rat VKORC1 or human or rat VKORC1L1 were analyzed on the same Western blot. Two linear relations (relative intensity vs quantity of microsomes loaded) were obtained, the first one for microsomes containing human VKORC1 (characterized by a specific slope a^{hVKORC1}), the second one for microsomes containing rat VKORC1 or human or rat VKORC1L1 (characterized by a slope a^{target}). The ratio $a^{\text{target}}/a^{\text{hVKORC1}}$ allowed us to determine the expression factor characterizing the expression level of rat VKORC1 or human or rat VKORC1L1 in the microsomal fraction compared with the expression level of the human VKORC1.

VKOR Activity Assays and Kinetics—Microsomal VKOR activity was assayed as described previously (15, 16). Briefly, standard reactions were performed in 200 mM Hepes buffer, pH 7.4, containing 150 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 0.25 to 2 µg/ml of total proteins containing membrane VKORC1. The reaction was started by the addition of vit K₂C₆O solution in 1% Triton X-100 and incubated at 37 °C for 30 min. In these conditions, the reaction was linear according to the time of incubation and the quantity of incubated proteins. After incubation at 37 °C for 30 min, the reaction was stopped by adding 4 ml of iced 1:1 isopropyl alcohol/hexane solution. After centrifugation at 5000 × g for 10 min, the hexane layer was removed and dried under nitrogen. The dry residue was immediately dissolved in 0.2 ml of isopropyl alcohol, and the reaction product was analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry.

The LC-APCI/MS/MS used was a 1100 Series LC/MSD ion Trap VL with an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) interface and a LCMS Chemstation software from Agilent Technologies (Palo Alto, CA). Chromatographic separation was performed using a SunFire reverse phase C8 column (4.6 mm × 150 mm, 5 µm; Waters) with a mobile phase of methanol, 0.1% acetic acid (95:5) in isocratic conditions. The column temperature was 45 °C. The flow rate in the LC column was 1 ml/min. The injection volume was 20 µl. The temperature of the autosampler tray was set to 5 °C, and the samples were protected from the daylight. Detection was by MS/MS with atmospheric pressure chemical ionization source in positive mode. Nebulizer pressure was set to 60 psi, dry gas temper-

VKORC1L1 Supports VKOR Activity in Extrahepatic Tissues

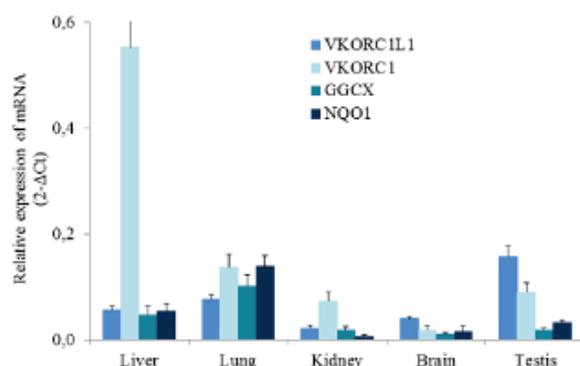


FIGURE 2. Analysis of expression of VKORC1, VKORC1L1, GGCX, and NQO1 mRNA in 9-week-old male OFA Sprague-Dawley rats. Total RNA (100 ng) isolated from liver, lung, kidney, brain, and testis was used to quantify by real-time PCR mRNA expression of the four enzymes involved in the vitamin K cycle. Each data point represents the mean of four animals \pm SD (error bars). Three separate determinations were made for each animal.

ature to 350 °C, dry gas flow to 5 liters/min, and vaporizer temperature to 400 °C. Capillary voltage was set to 4000 V, corona needle to 4000 nA, and CID to 1 V. Collision gas in the trap was helium with a pressure of 0.6×10^{-5} mbar. Identification criteria for vit K₁ are the retention time ($t_r \leq 4.1$ min) and the product ion 451 3 187 ($m/z (2) \leq 187$). Identification criteria for vit K₂ are the retention time ($t_r \leq 3.4$ min) and the product ion 467 3 307 ($m/z (2) \leq 307$). Linearity and accuracy were tested from 25 to 2000 ng/ml ($n \leq 20$). The response was linear throughout the concentration range tested with a coefficient of correlation (r^2) above 0.99. Accuracy was between 80 and 120% of the theoretical concentrations.

K_m , V_{max} , and K_i values were obtained from at least three separate experiments performed on two different batches of protein. The estimation of K_m and V_{max} values was achieved by the incubation of at least nine different concentrations of vit KCO (from 0.003 to 0.2 mM) to the standard reaction. Incubations were performed in duplicate. Data were fitted by nonlinear regression to the Michaelis-Menten model using the R-fit program.

To evaluate the inhibiting effect of warfarin on VKOR activity, K_i was determined after the addition of various concentrations of anticoagulant to the standard reaction in the presence of increasing amounts of vit KCO (from 0.003 to 0.2 mM) using anticoagulant concentrations from approximately 0.05 to 20 \times K_i . Data were fitted by nonlinear regression to the noncompetitive inhibition model $v \leq (V_{max}/(1 + (I/K_i))) * (S/(K_m + S))$ using the R-fit program.

RESULTS

Vkorc1 and Vkorc1l1 mRNA Distribution in Rat Tissues—The presence of mRNA for Vkorc1 or Vkorc1l1 was assessed by real-time PCR in various tissues (i.e. liver, lung kidney, brain, and testis) from 9-week-old male OFA Sprague-Dawley rats. Fig. 2 shows patterns of the expression of mRNA encoding both enzymes but also the other enzymes involved in the vitamin K cycle (i.e. GGCX and NQO1) in these tissues. The presence of Vkorc1, Vkorc1l1, Ggcx, and Nqo1 mRNA was systematically detected in all of the tissues screened in this study. As expected,

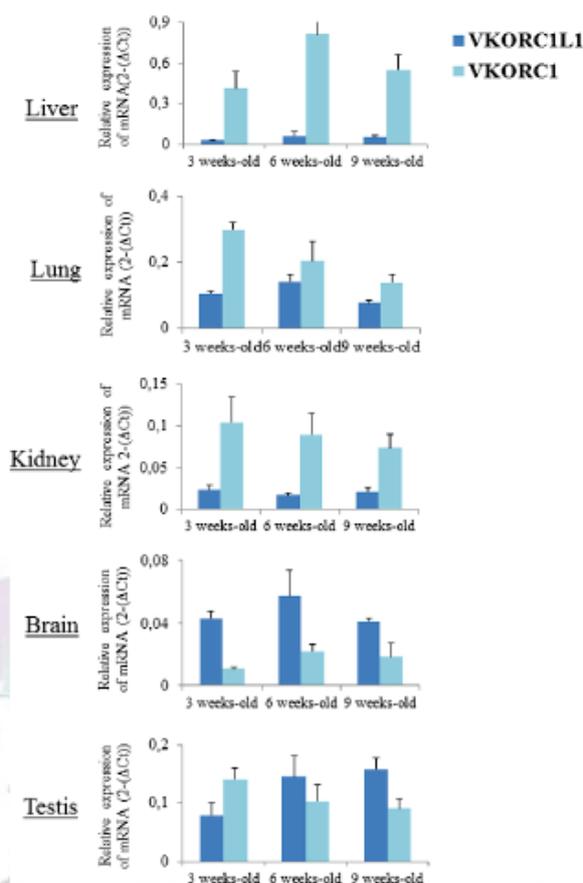


FIGURE 3. Evolution of VKORC1 and VKORC1L1 in different rat tissues as a function of age. Total RNA (100 ng) isolated from liver, lung, kidney, brain, and testis was used to quantify by real-time PCR mRNA expression of Vkorc1 and Vkorc1l1. Each data point represents the mean of four animals \pm SD (error bars). Three separate determinations were made for each animal.

Vkorc1 was strongly expressed in the liver. In the other tissues, its expression was much lower (i.e. 4- to 8-fold lower in the kidney/lung/testis and 30-fold lower in the brain). Vkorc1l1 was also detected in all the tissues. Nevertheless, the levels of Vkorc1l1 expression were much more uniform between tissues with variations from 1 to 7 and between. Because PCR efficiencies for Vkorc1 and Vkorc1l1 are identical, comparison of Vkorc1 and Vkorc1l1 expression levels was possible. In liver, expression of Vkorc1 mRNA was highly predominant (i.e. 10-fold higher) compared with Vkorc1l1 mRNA expression (Fig. 2). In lung and kidney, Vkorc1 was a little more expressed than Vkorc1l1, whereas in brain and testis Vkorc1 was a little less expressed than Vkorc1l1 (Fig. 2). Expression of VKORC1 and VKORC1L1 mRNA was almost not influenced by the age (Fig. 3).

Vkorc1 and Vkorc1l1 mRNA Distribution in Rat Osteosarcoma Cell Lines ROS 17/2.8—Because OC, a crucial VKDP involved in bone metabolism and glucose homeostasis, is secreted by osteoblasts, the expression of the enzymes involved in vitamin K cycle was explored in cells with phenotype of

VKORC1L1 Supports VKOR Activity in Extrahepatic Tissues

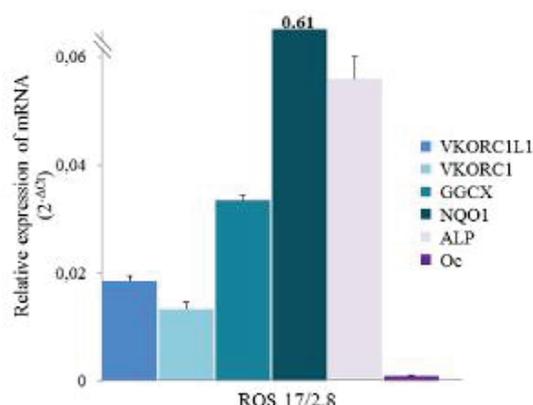


FIGURE 4. Analysis of expression of VKORC1, VKORC1L1, GGCX, and NQO1 in osteoblastic cells ROS 17/2.8 cells. ROS cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 100 units/ml penicillin/streptomycin. Total RNA isolated from ROS cells was used to quantify by real-time PCR mRNA expression for the four enzymes involved in the vitamin K cycle and for OC and alkaline phosphatase (ALP). Each data point represents the mean of four different cultures of ROS 17/2.8 cells \pm S.D. (error bars). Three separate determinations were made for each culture.

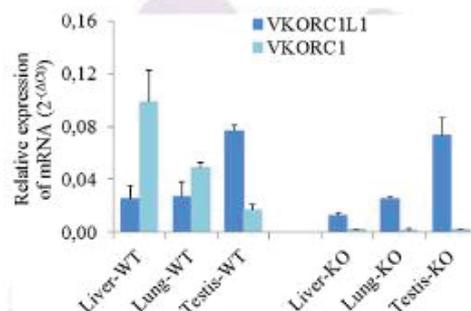


FIGURE 5. Analysis of VKORC1L1 expression in different tissues of adult male VKORC1-deficient mice compared with wild type mice. Total RNA (100 ng) isolated from liver, lung, kidney, brain, and testis was used to quantify by real-time PCR mRNA expression of *Vkorc1* and *Vkorc1l1* enzymes involved in the vitamin K cycle. Each data point represents the mean of three animals \pm S.D. (error bars). Three separate determinations were made for each animal.

osteoblast-like, ROS 17/2.8. This phenotype was confirmed by the detection of mRNA encoding the alkaline phosphatase and OC (Fig. 4). In these cells, the presence of mRNA for all of the enzymes involved in the vitamin K cycle (i.e. VKORC1, VKORC1-L1, GGCX, and NQO1) was detected whatever the number of passages was (from 4 to 8) (Fig. 4). *Vkorc1l1* mRNA were little more expressed than *Vkorc1* mRNA, as described in rat testis.

VKORC1L1 mRNA Expression Is Not Modified in VKORC1-deficient Animals—Expression of *Vkorc1l1* mRNA was assessed in VKORC1 knock-out mice compared with wild type mice (Fig. 5). In wild type mice, *Vkorc1* and *Vkorc1l1* were expressed in liver, lung, and testis, and their distribution was similar to that described above for rats. In liver, expression of *Vkorc1* mRNA was highly predominant (i.e. 5-fold higher) compared with *Vkorc1l1*. In lung, *Vkorc1* was a little more expressed than *Vkorc1l1*. In testis *Vkorc1* was less expressed than *Vkorc1l1*. In VKORC1-deficient mice, *Vkorc1l1* expres-

TABLE 1

Apparent kinetic parameters toward vit K_1 -O and inhibition constants toward warfarin obtained for yeast microsomes expressing recombinant VKORC1 or VKORC1L1 proteins

To determine the VKOR activity, standard reactions were performed in 200 μ M Hepes buffer, pH 7.4, containing 150 mM KCl and 0.25–2 g liter⁻¹ microsomal proteins expressing membrane wild type or mutant VKORC1. The V_{max} values determined at saturating concentration of vitamin K epoxide substrate were evaluated after normalization of the recombinant protein expression level by immunoblotting as described under "Experimental Procedures." Each data point represents the mean \pm S.D. of three individual determinations.

Protein	K_m		V_{max}		K_i
	μ M	μ M	μ mol min ⁻¹ mg ⁻¹ total protein	nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ total protein	
hVKORC1	21.5 \pm 4.2	7.4 \pm 0.5	344	1.8 \pm 0.2	
hVKORC1L1	24.1 \pm 3.0	20.7 \pm 0.9	859	52.0 \pm 3.0	
rVKORC1	19.6 \pm 1.6	266.7 \pm 8.8	13607	0.6 \pm 0.04	
rVKORC1L1	35.0 \pm 3.0	16.8 \pm 0.5	480	32.6 \pm 1.9	

sion was unchanged compared with wild type mice, whereas *Vkorc1* mRNA was effectively not expressed.

VKORC1L1, an Enzyme Highly Resistant to Vitamin K Antagonists—To assess the functional properties of VKORC1L1 enzymes, human and rat VKORC1L1 proteins were overexpressed in *P. pastoris*, as described for human and rat VKORC1 (15, 16). All of the recombinant proteins were efficiently expressed in microsomes of *P. pastoris* with the same expected molecular mass of \approx 20-kDa. Depending on the expressed protein, the levels of expression in the microsomal fraction were different. Because recombinant human and rat VKORC1 and VKORC1L1 proteins were expressed as c-myc-fused proteins, quantification of each recombinant protein in membrane fractions was performed by Western blotting using anti-c-myc antibodies compared with the expression of recombinant human VKORC1, as described under "Experimental Procedures" (16). Depending on the expressed protein, the expression factor comprised between 0.3 to 2.5 compared with the expression of recombinant human VKORC1 in yeast microsomes.

As shown previously, VKORC1L1 proteins were able to reduce vit KCO in vit KH2 (24). The reaction rates of recombinant human and rat VKORC1L1 toward vit K_1 -O followed the Michaelis-Menten model, allowing the determination of kinetic parameters (Table 1). V_{max} values indicated in this table are V_{max} calculated after normalization of the expression by immunoblot analysis. The K_m values of recombinant VKORC1L1 enzymes were similar to those of the recombinant VKORC1 enzymes. Except for the recombinant rat VKORC1, the V_{max} values of all of the recombinant enzymes (i.e. hVKORC1, hVKORC1L1, and rVKORC1L1) were also similar (Table 1).

For human and rat VKORC1L1 proteins, susceptibility to VKA was determined using warfarin, a VKA largely used in human medicine. Warfarin was able to inhibit the VKOR activity catalyzed by VKORC1L1 enzymes, but with concentration much stronger than those used to inhibit the VKORC1-dependent activity (Fig. 6). Modeling of the data using noncompetitive equation gave a correct fit (Fig. 6), as described for VKORC1 enzymes (15, 16), allowing the determination of K_i parameters (Table 1). VKORC1L1 enzymes were 30–50-fold more resistant to the action of warfarin than VKORC1 enzymes.

VKORC1L1 Supports VKOR Activity in Extrahepatic Tissues

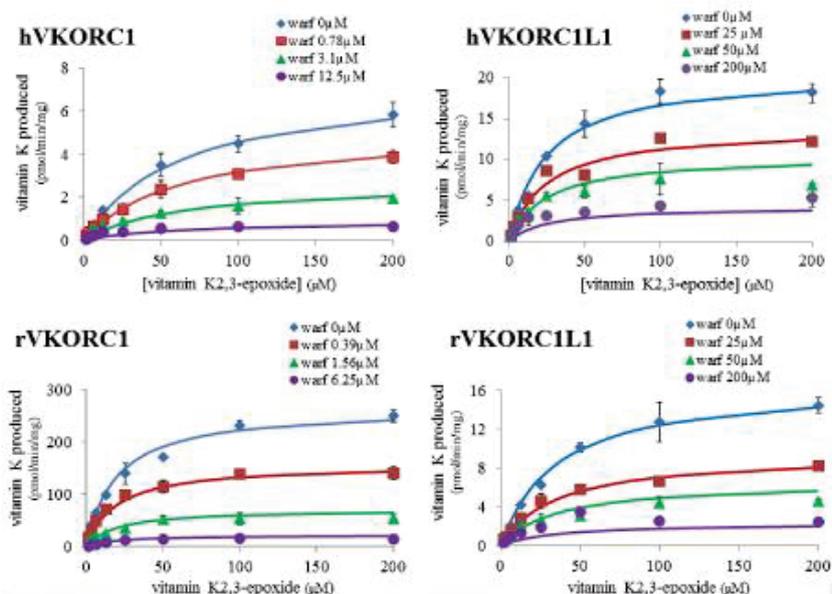


FIGURE 6. Inhibition by warfarin of VKOR activity catalyzed by human or rat wild type recombinant VKORC1 or VKORC1L1. VKOR activity versus vit K₂C₃O (from 0 to 200 µM) was determined in the presence of four different concentrations of warfarin incubated with microsomes from recombinant yeast expressing human or rat wild type VKORC1 or VKORC1L1. Each data point represents the mean ± S.D. (error bars) of two determinations.

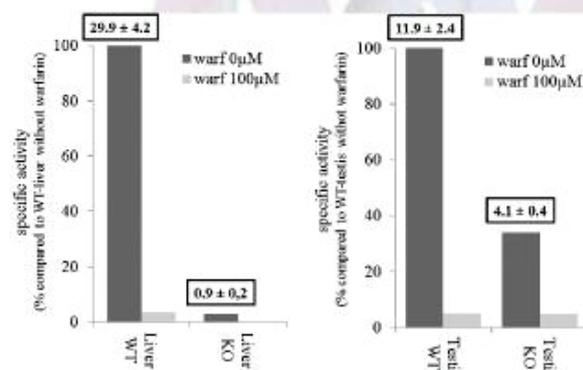


FIGURE 7. Analysis of VKOR activity in liver and testis of male VKORC1-deficient mice compared with wild type mice. VKOR activity was evaluated in the presence of 200 µM of K₂C₃O in the presence of 0 or 100 µM warfarin. Results are expressed as percentages of activity compared with wild type mice liver or testis. Above bars are indicated the specific activities (pmol min⁻¹ mg⁻¹ of total protein) determined in the corresponding tissue.

VKORC1L1, an Enzyme Catalyzing VKOR Activity in Some Tissues—Because *Vkorc1l1* transcripts were significantly detected in testis and not detected in liver of VKORC1-deficient mice, VKOR activity was evaluated in both tissues using a saturating concentration of vit K₂C₃O (Fig. 7). VKOR activity in VKORC1-deficient mice liver microsomes was almost undetectable (i.e. 0.9 pmol min⁻¹ mg⁻¹ of total proteins) and represented only 2.9% of VKOR activity measured in liver of wild type mice. On the contrary, VKOR activity in VKORC1-deficient mice testis microsomes was clearly detected (i.e. 4.1 pmol min⁻¹ mg⁻¹ of total proteins) and represented 35% of the total activity measured in testis of wild type mice (Fig. 7). This activity was almost totally inhibited by 100 µM warfarin.

Susceptibility to Vitamin K Antagonists Depends on the Tissue—Because transcripts corresponding to VKORC1 and VKORC1L1 were detected in rat liver, lung, kidney, brain, and testis, the presence of VKOR activity was assessed in these organs using a saturating concentration of vit K₂C₃O (Fig. 8). VKOR activity was detected in all of the tissues, with the highest activity detected in liver, then in testis, kidney, brain, and lung. However and surprisingly, VKOR activity in testis was only 2-fold lower compared with liver. Comparative susceptibility to VKA of the VKOR activity detected in these different tissues was assessed using warfarin. In the presence of 0.78 µM warfarin, the percentage of residual VKOR activity was different between tissues. In liver, 0.78 µM warfarin inhibited 70% of the total VKOR activity whereas in testis, the same concentration of warfarin inhibited only 30% of the total VKOR activity, suggesting a different susceptibility to VKA among tissues. To explore this hypothesis further, VKOR activity in the different tissues was evaluated with increasing concentrations of vit K₂C₃O (from 0 to 200 µM) in the presence of different concentrations of warfarin. Figs. 6 and 7 show the results obtained, respectively, in liver and testis. In liver, 0, 0.20, 0.78, and 6.25 µM warfarin was used to inhibit the VKOR activity (Fig. 9). The experimental results obtained in liver were perfectly fitted by nonlinear regression using the noncompetitive inhibition model and the K_m and K_i parameters determined for recombinant rat VKORC1 (i.e. 19.6 and 0.6 µM). In testis, 0, 0.78, 6.25, and 25 µM warfarin was used to inhibit the VKOR activity (Fig. 10). As described in liver, warfarin inhibited the VKOR activity in a noncompetitive manner. Nevertheless, it was not possible to fit by nonlinear regression the experimental results obtained in testis using the noncompetitive model and the K_m and K_i parameters determined for recombinant rat VKORC1, corre-

VKORC1L1 Supports VKOR Activity in Extrahepatic Tissues

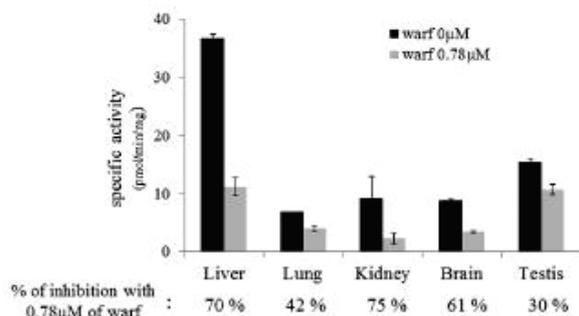


FIGURE 8. Analysis of VKOR activity in different tissues of male OFA Sprague-Dawley rats. VKOR activity was evaluated in the presence of 200 μ M vit K₂C₂O with 0 or 0.78 μ M warfarin. Each bar represents the mean \pm SD (error bars) of three individual determinations. Percentages of inhibition of the VKOR activity with 0.78 μ M warfarin are indicated below each tissue tested.

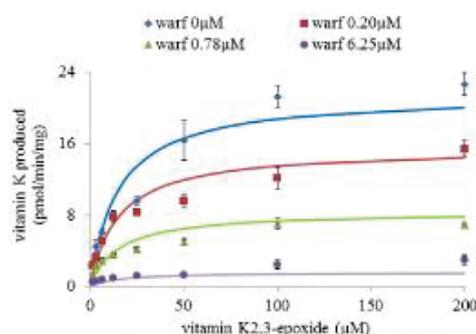


FIGURE 9. Inhibition by warfarin of VKOR activity in liver of male OFA Sprague-Dawley rats. VKOR activity versus vit K₂C₂O (from 0 to 200 μ M) was determined in the presence of four different concentrations of warfarin incubated with rat liver microsomes. Each data point represents the mean \pm SD (error bars) of two determinations. The experimental results were fitted by nonlinear regression using the noncompetitive inhibition model, and the K_m and K_i parameters were determined for recombinant rat VKORC1 (i.e. 19.6 and 0.6 μ M).

sponding to an exclusive expression of VKORC1 (Fig. 10A). In the same way, it was not possible to fit these experimental results considering an exclusive expression of VKORC1L1 (Fig. 10B). The only way to fit the experimental results perfectly was to consider in testis a mixed expression of VKORC1 and VKORC1L1 and to optimize the percentage of the VKOR activity catalyzed by VKORC1 and the percentage of the VKOR activity catalyzed by VKORC1L1. The best fit was obtained in testis for a ratio of 45% of the VKOR activity supported by VKORC1 and 55% supported by VKORC1L1 (Fig. 10C). Table 2 presents the percentages of the VKOR activity supported by VKORC1 and VKORC1L1 in testis, but also in the other tissues considered in this study (i.e. lung, kidney, and brain) and in ROS 17/2.8 cells.

DISCUSSION

VKORC1L1 Also Supports VKOR Activity—VKORC1 and VKORC1L1 were described to be able to catalyze the VKOR activity that corresponds to the reduction of vit KCO generated during the γ -carboxylation of VKDPs, in vit K (12, 13, 24). Therefore, in this study, we expressed human and rat

VKORC1L1 as c-myc-fused proteins in the same expression system which previously allowed us to characterize completely the rat and human VKORC1 and all their spontaneous mutants (15, 16). It was thus possible to compare the catalytic efficiencies (V_{max}/K_m) of VKORC1L1 proteins with those of VKORC1 proteins. Rat VKORC1L1 catalyzes the reduction of vit KCO in vit K with a catalytic efficiency 30-fold lower than that of rat VKORC1 whereas human VKORC1L1 is able to catalyze this reaction with a catalytic efficiency 2-fold higher than that of human VKORC1, suggesting an important role of VKORC1L1 in human.

VKORC1L1 Is an Enzyme Resistant to VKA—VKOR activity is specifically inhibited by VKA such as warfarin. VKORC1 protein was demonstrated to be strongly inhibited by VKA. On the other hand, the susceptibility of VKORC1L1 enzyme to these molecules was not clearly characterized. In this study, the reduction of vit KCO in vit K catalyzed by human or rat VKORC1L1 was shown to be widely less susceptible to VKA than that catalyzed by VKORC1 proteins. Indeed, 30–50-fold more anticoagulants are necessary to inhibit VKORC1L1 compared with VKORC1. Despite this particular property of VKORC1L1 compared with VKORC1, its involvement in the recycling of vitamin K was never considered. In the following, the natural resistance of VKORC1L1 to VKA is used to estimate the involvement of VKORC1L1 in VKOR activity in the different tissues.

VKORC1L1 Does Not Support VKOR Activity in the Liver—In liver our results demonstrate the quasi-exclusive participation of VKORC1 in the VKOR activity. Indeed, expression of *Vkorc1l1* mRNA in the liver is negligible compared with that of *Vkorc1* mRNA (j 10-fold lower). Moreover, inhibition of the VKOR activity in liver by warfarin perfectly follows a noncompetitive inhibition model involving the exclusive participation of VKORC1. Finally, in VKORC1-deficient mice liver, VKOR activity is almost undetectable. These results are in agreement with the phenotype described for *Vkorc1^{+/+}* mice. Homozygous *Vkorc1^{+/+}* mice die in 2–20 days after birth by extensive bleeding due to a total deficiency of the γ -carboxylation of the clotting factors in liver (25), confirming the exclusive involvement of VKORC1 in the liver.

VKORC1L1 Is Involved in VKOR Activity in Extrahepatic Tissues—Unlike the VKDPs involved in the coagulation process, which are synthesized in the liver, the VKDPs involved in the other physiological processes are produced by extrahepatic tissues. It is thus necessary to differentiate the VKOR activity detected in liver and the VKOR activity detected in extrahepatic tissues. In this study, we show clearly that VKOR activity is systematically detected in extrahepatic tissues. In lung where the presence of MGP was described previously (26–28) and in kidney where the presence of the urinary prothrombin fragment 1 was described (29, 30), VKOR activity is, respectively, 5- and 4-fold lower than that of liver. In testis where MGP is also expressed (data not shown), this activity is only 2-fold lower compared with liver. In osteosarcoma cell lines which are known to produce OC, another VKDP, VKOR activity was also detected in this study.

In the extrahepatic tissues considered herein (i.e. lung, kidney, testis, brain, osteoblastic cells) expression of *Vkorc1*

VKORC1L1 Supports VKOR Activity in Extrahepatic Tissues

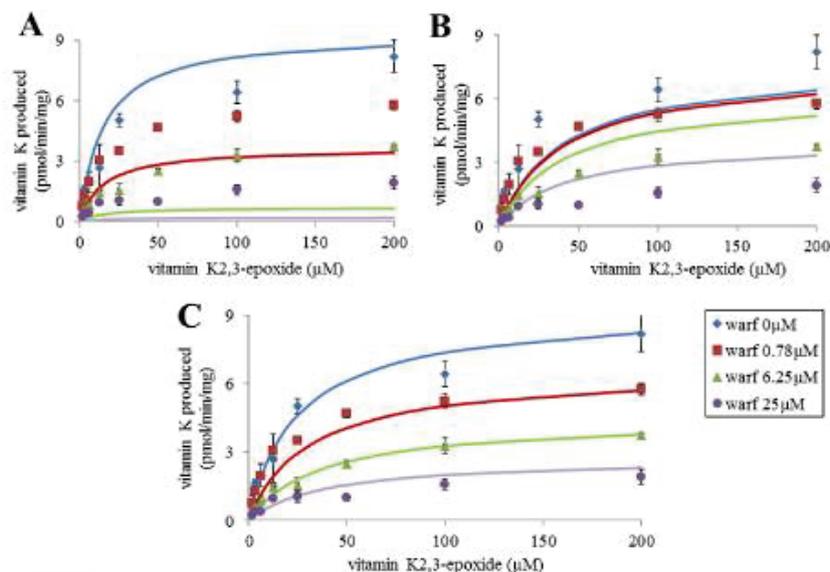


FIGURE 10. Inhibition by warfarin of VKOR activity in testis of OFA Sprague-Dawley rats. VKOR activity versus vit K_{2,3}O (from 0 to 200 μM) was determined in the presence of four different concentrations of warfarin incubated with rat liver microsomes. Each data point represents the mean ± S.D. (error bars) of two determinations. A, the experimental results were fitted by nonlinear regression using the noncompetitive inhibition model, and the K_m and K_i parameters were determined for recombinant rat VKORC1 (i.e. 19.6 and 0.6 μM). B, the experimental results were fitted by nonlinear regression using the noncompetitive inhibition model, and the K_m and K_i parameters were determined for recombinant rat VKORC1L1 (i.e. 35 and 33 μM). C, the experimental results were fitted considering a mixed expression of VKORC1 and VKORC1L1 in testis by nonlinear regression using the noncompetitive inhibition model, the catalytic parameters of recombinant rVKORC1 and rVKORC1L1. The best fit was obtained in testis for a ratio of 45% of the VKOR activity supported by VKORC1 and 55% supported by VKORC1L1.

TABLE 2

VKOR activity supported by VKORC1L1 enzyme in different tissues of male OFA Sprague-Dawley rats

Percentages of the VKOR activity catalyzed by VKORC1 or VKORC1L1 were evaluated by inhibition of the VKOR activity by warfarin at varying concentrations of vit K_{2,3}O and by modeling of the experimental results by nonlinear regression using the noncompetitive inhibition equation, the respective K_m and K_i values determined for recombinant VKORC1 and VKORC1L1 proteins and considering a mixed expression of VKORC1 and VKORC1L1 in the tissue.

VKOR activity	Liver					ROS 17/2.8	
	%	%	%	%	%	%	
Supported by VKORC1L1	4	22	1	9	55	69	
Supported by VKORC1	96	78	99	91	45	32	

mRNA is systematically much lower than that detected in liver. On the other hand, expression of *Vkorc1l1* mRNA is equivalent, even superior to that detected in the liver. As a consequence, expression of *Vkorc1l1* mRNA in some tissues such as testis is more elevated than that of *Vkorc1* mRNA. Antibodies against VKORC1L1 being unavailable, the effective expression of VKORC1L1 protein was evaluated by the characterization of the VKOR activity in these extrahepatic tissues. In testis of VKORC1-deficient mice, VKOR activity is still detected despite the knock-out of the *Vkorc1* gene. This demonstrates the involvement of another enzyme, certainly VKORC1L1, able to catalyze the reduction of vit K_{2,3}O to vit K₁. In mouse testis this enzyme catalyzes 35% of the total VKOR activity detected in wild type mice testis and seems to be inhibited by high concentration of warfarin. In rat tissues, to evaluate the part of the VKOR activity catalyzed by VKORC1L1, an inhibition profile of the VKOR activity by warfarin was performed. In rat testis,

inhibition of VKOR activity by warfarin follows a noncompetitive inhibition model (V_{max} different but K_m similar) as obtained for liver. Nevertheless, and contrary to the liver, the modeling of the results by nonlinear regression using the noncompetitive inhibition equation and the VKORC1 kinetic parameters was absolutely not possible. The same modeling using the VKORC1L1 kinetic parameters was also not possible. Only a noncompetitive inhibition model with a mixed expression of VKORC1 and VKORC1L1 allowed us to fit the data perfectly and thus, estimate the parts of the VKOR activity supported by VKORC1 enzyme (45%) and by VKORC1L1 enzyme (55%). A similar approach was realized for the other tissues or cells. In lung and osteoblastic cells ROS 17/2.8, VKOR activity is also a mixed activity supported by VKORC1 (i.e. respectively, 78 and 32% in lung and ROS 17/2.8 cells) and VKORC1L1 (i.e. respectively, 22 and 68% in lung and ROS 17/2.8 cells).

Differences in phenotypes were observed between *Vkorc1^{+/+}* mice (25) and *Ggcx^{+/+}* mice (31), despite the central positions of VKORC1 and GGX in the vitamin K cycle. *Ggcx* knock-out leads to massive embryonic lethality (31), whereas *Vkorc1* knock-out does not (25). Spohn et al. suggested that these differences in phenotype may be due to a complete deficiency of the α -carboxylation in *Ggcx^{+/+}* animals, whereas a partial α -carboxylation of VKDP not involved in coagulation, but involved in other physiological processes, would be rescued by another pathway in *Vkorc1^{+/+}* animals (25). In this study, we clearly demonstrated that VKORC1L1 is able to support VKOR activity and may constitute an alternative pathway to VKORC1 in some tissues in *Vkorc1^{+/+}* animals.

Warfarin Resistance of Extrahepatic Tissues May Be Explained by VKORC1L1—During long term anticoagulation therapy, effects on VKDPs involved in coagulation process are observed whereas effects on VKDPs produced in extrahepatic tissues are not apparent or quite difficult to observe. Indeed, to induce arterial calcification by warfarin in rats, excessive doses of anticoagulants widely superior to the therapeutic doses were used in the various studies previously published (20, 32, 33). Price et al. (33) had to treat rats twice a day with 150 mg/kg warfarin (4000-fold higher than the therapeutic dose used in human medicine) to induce rapid calcification of the elastic lamellae in the media of major arteries and in aortic heart valves. In other soft tissues known to also express MGP at a high rate, no calcification was observed in the different studies. When rats were treated with a warfarin dose given once every 24 h, a complete absence of artery calcification was noted (22, 23, 34, 35). Some of these studies described a depletion of OC in bone consecutively to the inhibition of γ -carboxylation of this VKDP (22, 23, 35, 36). Nevertheless, these various experiments were performed in rats receiving a vitamin K-depleted diet, and undercarboxylated OC in plasma and OC in bone are considered as very good markers of the deficiency in vit K. It is thus very difficult to interpret these experiences. Finally, the only in vivo study easily interpretable and close to human therapeutic conditions is the study performed on healthy nonhuman primates by Binkley et al. (37). In this study, adult male rhesus monkeys received 1.5 mg/day menadione in the diet and 0.15 mg/kg/day warfarin (i.e. corresponding approximately to 2-fold the dose routinely used in human) during a 30-month period. The International Normalized Ratio of these animals increased from 0.7 to 2.5–3.5. On the other hand, long term warfarin anticoagulation almost did not affect serum OC. Circulating undercarboxylated OC was described to be able to stimulate secretion of insulin and to increase tissues susceptibility to insulin (7, 8) and to influence male fertility (38). During long term anticoagulation therapy in human, modifications of glucose homeostasis or fertility were not reported.

In this study, we demonstrate that when VKORC1L1 is expressed in a tissue, a higher concentration of anticoagulant is needed in this tissue to obtain the same inhibition than that observed in liver where only VKORC1 is expressed. Therefore, we postulate that during a long term anticoagulation therapy, vit K in some extrahepatic tissues such as testis is still recycled by VKORC1L1, avoiding unwanted side effects by allowing the synthesis of VKDP not involved in the coagulation process, but involved in other physiological processes such as OC, MGP, or Gas6.

REFERENCES

- Price, P. A., Poser, J. W., and Raman, N. (1976) Primary structure of the γ -carboxylglutamic acid-containing protein from bovine bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 3374–3375
- Price, P. A., Urist, M. R., and Otawara, Y. (1983) Matrix Glaprotein, a new γ -carboxylglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 765–771
- Coutu, D. L., Wu, J. H., Monette, A., Rivard, G. E., Blostein, M. D., and Galipeau, J. (2008) Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells. *J. Biol. Chem.* 283, 17991–18001
- Nakano, T., Kawamoto, K., Kishino, J., Nomura, K., Higashino, K., and Arita, H. (1997) Requirement of γ -carboxylglutamic acid residues for the biological activity of Gas6: contribution of endogenous Gas6 to the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Biochem. J.* 323, 387–392
- Viegas, C. S., Simes, D. C., Laizé, V., Williamson, M. K., Price, P. A., and Cancela, M. L. (2008) Gla-rich protein (GRP), a new vitamin K-dependent protein identified from sturgeon cartilage and highly conserved in vertebrates. *J. Biol. Chem.* 283, 36655–36664
- Schurgers, L. J., Teunissen, K. J., Knapen, M. H., Kwaijtaal, M., van Dieet, R., Appels, A., Reutelingsperger, C. P., Cleutjens, J. P., and Vermeer, C. (2005) Novel conformation-specific antibodies against matrix γ -carboxylglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1629–1633
- Lee, N. K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J. D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P. J., McKee, M. D., Jung, D. Y., Zhang, Z., Kim, J. K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P., and Karsenty, G. (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130, 456–469
- Ferron, M., Hinoi, E., Karsenty, G., and Ducy, P. (2008) Osteocalcin differentially regulates β -cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 5266–5270
- Oldenburg, J., Marinova, M., Müller-Reible, C., and Watzka, M. (2008) The vitamin K cycle. *Vitam. Horm.* 78, 35–62
- Chatrou, M. L., Reutelingsperger, C. P., and Schurgers, L. J. (2011) Role of vitamin K-dependent proteins in the arterial vessel wall. *Hamostaseologie* 31, 251–257
- Lasseur, R., Longin-Sauvageon, C., Videmann, B., Billeret, M., Berny, P., and Benoit, E. (2005) Warfarin resistance in a French strain of rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19, 379–385
- Rost, S., Fregin, A., and Ivaskevicius, V. (2004) Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427, 537–541
- Li, T., Chang, C. Y., Jin, D. Y., Lin, P. J., Khvorov, A., and Stafford, D. W. (2004) Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427, 541–544
- Chu, P. H., Huang, T. Y., Williams, J., and Stafford, D. W. (2006) Purified vitamin K epoxide reductase alone is sufficient for conversion of vitamin K epoxide to vitamin K and vitamin K to vitamin KH₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 19308–19313
- Hodroge, A., Longin-Sauvageon, C., Fourel, I., Benoit, E., and Lattard, V. (2011) Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Arch. Biochem. Biophys.* 515, 14–20
- Hodroge, A., Matagrín, B., Moreau, C., Fourel, I., Hamed, A., Benoit, E., and Lattard, V. (2012) VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity. *J. Thromb. Haemost.* 10, 2535–2543
- Stanova, E., Steno, B., Killinger, Z., Baqi, L., and Payer, J. (2011) Effect of long-term oral anticoagulant therapy on bone mineral density and bone turnover markers: a prospective 12 month study. *Bratisl. Lek. Listy.* 112, 71–76
- Villines, T. C., O'Malley, P. G., Feuerstein, I. M., Thomas, S., and Taylor, A. J. (2009) Does prolonged warfarin exposure potentiate coronary calcification in humans? Results of the warfarin and coronary calcification study. *Calcif. Tissue Int.* 85, 494–500
- Wysowski, D. K., Nourjah, P., and Swartz, L. (2007) Bleeding complications with warfarin use: a prevalent adverse effect resulting in regulatory action. *Arch. Intern. Med.* 167, 1414–1419
- Schurgers, L. J., Joosen, I. A., and Lauffer, E. M. (2012) Vitamin K-antagonists accelerate atherosclerotic calcification and induce a vulnerable plaque phenotype. *PLoS One* 7, e43229
- Knapen, M. H., Schurgers, L. J., Shearer, M. J., Newman, P., Theuvsissen, E., and Vermeer, C. (2012) Association of vitamin K status with adiponectin and body composition in healthy subjects: undercarboxylated osteocalcin is not associated with fat mass and body weight. *Br. J. Nutr.* 108, 1017–1024
- Price, P. A., and Williamson, M. K. (1981) Effects of warfarin on bone: studies on the vitamin K-dependent protein of rat bone. *J. Biol. Chem.* 256,

VKORC1L1 Supports VKOR Activity in Extrahepatic Tissues

- 12754–12759
23. Price, P. A., Williamson, M. K., Haba, T., Dell, R. B., and Jee, W. S. (1982) Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 7734–7738
 24. Westhofen, P., Watzka, M., Marinova, M., Hass, M., Kirfel, G., Müller, J., Bevans, C. G., Müller, C. R., and Oldenburg, J. (2011) Human vitamin K 2,3-epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) mediates vitamin K-dependent intracellular antioxidant function. *J. Biol. Chem.* 286, 15085–15094
 25. Spohn, G., Kleinridders, A., and Wunderlich, F. T. (2009) VKORC1 deficiency in mice causes early postnatal lethality due to severe bleeding. *Thromb. Haemost.* 101, 1044–1050
 26. Rannels, S. R., Cancela, L. L., Wolpert, E. B., and Price, P. A. (1993) Matrix Gla protein mRNA expression in cultured type II pneumocytes. *Am. J. Physiol.* 265, L270–L278
 27. Gilbert, K. A., and Rannels, S. R. (2004) Matrix GLA protein modulates branching morphogenesis in fetal rat lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 286, L1179–1187
 28. Cadevid, J. C., DiVietro, M. L., Torres, E. A., Fumo, P., and Eiger, G. (2011) Warfarin-induced pulmonary metastatic calcification and calciphylaxis in a patient with end-stage renal disease. *Chest* 139, 1503–1506
 29. Stapleton, A. M., Timme, T. L., and Ryall, R. L. (1998) Gene expression of prothrombin in the human kidney and its potential relevance to kidney stone disease. *Br. J. Urol.* 81, 666–671; discussion 671–672
 30. Grover, P. K., Dogra, S. C., Davidson, B. P., Stapleton, A. M., and Ryall, R. L. (2000) The prothrombin gene is expressed in the rat kidney: implications for urolithiasis research. *Eur. J. Biochem.* 267, 61–67
 31. Zhu, A., Sun, H., and Raymond, R. M. (2007) Fatal hemorrhage in mice lacking γ -glutamyl carboxylase. *Blood* 109, 5270–5275
 32. Schurgers, L. J., Spronk, H. M., Soute, B. A., Schiffers, P. M., DeMey, J. G., and Vermeer, C. (2007) Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. *Blood* 109, 2823–2831
 33. Price, P. A., Faus, S. A., and Williamson, M. K. (1998) Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1400–1407
 34. Price, P. A., Williamson, M. K., and Lothringer, J. W. (1981) Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *J. Biol. Chem.* 256, 12760–12766
 35. Price, P. A., and Kaneda, Y. (1987) Vitamin K counteracts the effect of warfarin in liver but not in bone. *Thromb. Res.* 46, 121–131
 36. Hara, K., Kobayashi, M., and Akiyama, Y. (2005) Comparison of inhibitory effects of warfarin on γ -carboxylation between bone and liver in rats. *J. Bone Miner. Metab.* 23, 366–372
 37. Binkley, N., Krueger, D., Engelke, J., and Suttie, J. (2007) Vitamin K deficiency from long-term warfarin anticoagulation does not alter skeletal status in male rhesus monkeys. *J. Bone Miner. Res.* 22, 695–700
 38. Oury, F., Sumara, G., and Sumara, O. (2011) Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* 144, 796–809



6.3. Détermination des acides aminés de VKORC1L1 important dans son phénotype de résistance aux AVK

Objectifs :

Le phénotype résistant de l'enzyme VKORC1L1 vis-à-vis du coumafène a été prouvé, tandis que la protéine VKORC1 est sensible à l'action de cet AVK. Pourtant, ces deux protéines présentent une homologie de leur séquence nucléotidique de 60%. Nous avons donc décidé de déterminer quels acides aminés sont impliqués dans la résistance aux AVK afin d'apporter des éléments de réponse quant à ce mécanisme de résistance.

Méthodes :

L'alignement des séquences peptidiques de VKORC1 et de VKORC1L1 a permis de localiser les résidus différents entre ces deux protéines paralogues. Afin de caractériser l'importance d'un résidu dans le phénotype résistant aux AVK observé avec VKORC1L1, nous le substituons par l'acide aminé de la VKORC1 (par mutagenèse dirigée), avant d'exprimer ce mutant par la levure *Pichia pastoris* pour finalement déterminer son activité VKOR et sa constante d'inhibition aux AVK que nous comparons à celles de la VKORC1L1 non mutée.

Principaux résultats :

- La comparaison des résultats obtenus pour l'inhibition de l'activité VKOR par différents inhibiteurs avec comme enzyme la VKORC1 vs la VKORC1L1 confirment ce qui a été observé avec le coumafène, c'est-à-dire que VKORC1L1 résiste plus à l'action des inhibiteurs par rapport à VKORC1.

- L'alignement des séquences de VKORC1L1 chez plusieurs espèces révèle une forte homologie : 85% - 100%.

L'alignement des séquences de VKORC1L1 avec celles de VKORC1 présentent environ 50% d'homologie. De plus, deux domaines peptidiques apparaissent strictement conservés entre ces deux enzymes. Le premier domaine est proche des cystéines Cys-43(+7) et Cys-51(+7). Le second inclue les Cys-132(+7) et C-135(+7) du domaine CXXC.

- La mutagenèse dirigée en alanine des Cys-43(+7) et Cys-51(+7), tout comme des Cys-132(+7) et Cys-135(+7) (du motif CXXC), dans la séquence de VKORC1L1 conduit à une perte totale de son activité VKOR, par rapport à l'activité de la VKORC1L1 non mutée.

- L'alignement des séquences révèle que la VKORC1L1 présente uniquement 2 résidus nucléophiles à proximité du motif CXXC (Glu-130(+7) et Tyr-139(+7)), tandis que la VKORC1 en présente trois (Tyr-129, Asp-130 et Tyr-139).

La substitution du Glu en position 130(+7) dans la séquence de VKORC1L1 par le résidu correspond chez VKORC1 (Asp) conduit à une diminution de l'activité VKOR et l'efficacité enzymatique de ce mutant est diminuée et proche de l'efficacité de la VKORC1 « sauvage ». De même, ce variant présente une perte significative du pouvoir de résistance par rapport à la VKORC1L1 non mutée.

Chez VKORC1 la mutation Tyr139Phe rend l'enzyme plus résistante aux AVK. Nous obtenons le même résultat lorsque nous mutons ce même acide aminé (Y139(+7)F) chez la VKORC1L1.

Toutes les mutations effectuées sur la VKORC1L1 (en substituant un acide aminé par celui correspondant dans la VKORC1) ont permis d'obtenir des constantes catalytiques, pour ces mutants, similaires à ce qui est observé pour la VKORC1 « sauvage ».

- La même expérience a été réalisée en substituant un acide aminé de VKORC1 par celui qui lui correspond dans la séquence de VKORC1L1. Cependant, nous n'avons pas pu obtenir des constantes catalytiques, pour ces mutants de VKORC1, équivalentes à celles de la VKORC1L1 « sauvage ».

Identification of Key Functional Residues in the Active Site of Vitamin K Epoxide Reductase-like Protein (VKORC1L1)

Benjamin Matagrín,
Abdesslem Hamed,
Arnaud Michaux,
Ahmed Hodroge,
Etienne Benoit and
Virginie Lattard

USC 1233 INRA-Vetagro Sup, Veterinary
School of Lyon, France

Corresponding author:
Dr. Virginie Lattard

 virginie.lattard@vetagro-sup.fr

USC 1233 INRA-Vetagro Sup, Veterinary
School of Lyon, 69280 Marcy l'Etoile, France.

Tel: 0478872727

Citation: Matagrín B, Hamed A, Michaux A, et al. Identification of Key Functional Residues in the Active Site of Vitamin K Epoxide Reductase-like Protein (VKORC1L1). *Biochem Mol Biol J.* 2016, 2:3.

Abstract

Background/Purpose: Vitamin K is involved in the gamma-carboxylation of the vitamin K dependent proteins. Due to the limited intake of vitamin K, its regeneration is necessary and involves the vitamin K 2,3-epoxide reductase (VKOR) activity. This activity is catalyzed by VKORC1 and/or VKORC1L1 proteins. Warfarin is able to inhibit both enzymes, but VKORC1L1 appears to be 30-fold more resistant to warfarin than VKORC1.

Methods: To predict functional peptide regions or amino acid residues important for VKOR activity or resistance to vitamin K antagonists (VKA) of human VKORC1L1, we conducted a multiple alignment of VKORC1L1 and VKORC1 sequences. The role of conserved amino acid residues between VKORC1 and VKORC1L1, but also the role of conserved amino-acid residues in VKORC1L1 but not in VKORC1 were challenged by systematic engineering of point mutations combined with *in vitro* functional assays.

Findings: Interestingly, engineering mutants at position 130 allowed us to obtain a VKORC1L1 as susceptible to VKA as wild type VKORC1. Our results also suggested the involvement of Cys-43(+7), Cys-51(+7), Cys-132(+7) and Cys-135(+7), in the transfer of the redox power to vitamin K epoxide.

Conclusion: Altogether, this study provides novel insight into VKORC1L1 active site functional domains. Glu-130 is a key residue governing the natural resistance of VKORC1L1 to VKAs.

Keywords: Vitamin K; Protein; VKOR

Received: May 28, 2016; Accepted: September 17, 2016; Published: September 22, 2016

Introduction

The vitamin K epoxide reductase (VKOR) activity has been described since the early 70s' [1]. This VKOR activity allows the reduction of vitamin K epoxide in order to regenerate vitamin K quinone. This activity is a key step of the vitamin cycle and is the target of vitamin K antagonist (VKA). The *VKORC1* gene has only been identified in 2004 [2,3]. This gene encodes for a 163 amino acid protein with, probably, four transmembrane domains and a luminal loop. This protein contains also a C₁₃₂-XXC₁₃₅ redox motif, as previously hypothesized by Silverman [4]. This motif is located in the fourth transmembrane domain.

VKA actively inhibit VKORC1 in the liver and thus limit the gamma-carboxylation of hepatic VKD proteins resulting in an intense anticoagulant effect. VKA are extensively used worldwide for prevention and treatment of thromboembolic disorders. Many missense mutations have been detected in *VKORC1* gene in humans and rats and are sometimes associated to a VKA resistance phenotype [5-7].

Until 2011, VKORC1 was considered as the only protein able to catalyze the VKOR activity. Nevertheless, Westhofen et al. [8] described that a paralogous enzyme of *VKORC1*, the *VKORC1L1*, could also reduce vitamin K₂O to vitamin K₂ when expressed in HEK293T cells. Resulting from a gene duplication of an early

common VKOR ancestor, there is 50% of homology between this protein and VKORC1 [9]. The VKORC1L1 gene encodes for a 176 amino acids protein with almost the same structure than VKORC1. However, this VKOR activity was described with a low enzymatic efficiency and then they propose that VKORC1L1 is responsible for driving the vitamin K mediated intracellular antioxidant pathway critical to cell survival by generating vitamin KH_2 [8].

In another hand, Hammed et al. [10] emphasized two main differences between VKORC1L1 and VKORC1. VKORC1L1-catalyzed VKOR activity is 30-fold more resistant to warfarin than that catalyzed by VKORC1. The tissue distributions of the corresponding mRNA are quite different. Liver expression of *Vkorc1L1* mRNA is very low in comparison to *Vkorc1*. On the contrary, in other tissues such as lung or testis, the expression of these two genes is similar. These data argue for the fact that VKORC1L1 does not interfere with the coagulation process which is supported by the liver. On the contrary, these data argue for the fact that VKORC1L1, being resistant to VKA, could protect extra-hepatic tissues against the effects of VKAs. These results provide an interesting explanation for the low or even the absence of clinical consequences on the gamma carboxylation of vitamin K-dependent proteins (VKDP) produced by extra-hepatic tissues such as matrix Gla protein (MGP) [11], osteocalcin (OC) [12] or Gas 6 [13]. Indeed, the absence of gamma carboxylation of MGP should create ectopic mineralization [14] and the absence of gamma carboxylation of osteocalcin should have consequences on energetic metabolism [15,16].

Unlike VKORC1 proteins, which have been subjected to extensive investigation, our understanding of the mechanism of action of VKORC1L1 is limited. As the contrast between the susceptibility to VKAs of VKORC1 and VKORC1L1 appears to be an important determinant for the biological function of the VKORC1L1 protein, the objective of this paper is to analyze the structural basis of the natural resistance of VKORC1L1 to VKAs in the absence of 3D-structures of VKORC1L1 proteins. To highlight important residues for VKORC1L1 function, sequences alignments were first performed between VKORC1 proteins and VKORC1L1 proteins. Finally, using site directed mutagenesis, we analyzed the functional implications of these highlighted amino acid residues. Our results suggest the central function of Glu-130₍₋₂₇₎ amino acid residue in the natural resistance to VKAs of VKORC1L1 compared with VKORC1.

Methods

Plasmid constructions

Human VKORC1 and VKORC1L1 coding sequences fused with a c-myc tag *via* a flexible (GGG)₃ in its 3'-extremity was optimized for heterologous expression in yeast and synthesized by GenScript (Piscataway, NJ, USA). Synthesized nucleotide sequences included EcoRI and XbaI restriction sites at their 5'- and 3'-extremities, respectively. These nucleotide sequences were subcloned into pPICZ-B (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and sequenced on both strands. Construction of amino acid substituted mutants of VKORC1 or VKORC1L1 was carried out using pPICZ-VKORC1 or pPICZ-VKORC1L1 as template, respectively, with the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Mutants were

systematically checked by sequencing, and the various mutants were individually expressed in *P. pastoris*.

Heterologous expression in *Pichia pastoris*

Heterologous expressions of VKORC1 and VKORC1L1 proteins were performed in *Pichia pastoris* as described previously [5,17]. pPICZ-VKORC1 or VKORC1L1 vectors were individually transformed into the *P. pastoris* SMD1168 yeast strain using the *P. pastoris* Easy Comp Transformation kit (Invitrogen). Transformants were selected on YPD plates (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) dextrose) containing 100 µg/ml Zeocin (Invitrogen). The cells were grown in BMGY medium (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 1.34% (w/v) yeast nitrogen base, and 1% (v/v) glycerol). Expression was induced by methanol (1%, v/v) for 48 h at 30°C in a rotary shaker (200 rpm). Yeast cells were collected by centrifugation (3000 g-10 min) and immediately frozen at -20°C.

Subcellular fractionation of recombinant yeast cells

Yeast microsomes were prepared from thawed yeast cells by differential centrifugation. Briefly, yeast cells were resuspended in 50 mM Phosphate Buffer (pH 7.4) containing 1.15% (w/v) of KCl. Yeast cells were broken with Zircon beads using Dispermat[®] LC30 (VMA-GETZMANN, Germany) (15 min-3500 rpm) a continuously at 4°C and further submitted to differential centrifugation. The 100,000 g pellet corresponding to the membrane fraction was resuspended by Potter homogenization in HEPES glycerol buffer (50 mM HEPES, 20% glycerol, pH 7.4). Protein concentrations were evaluated by the method of Bradford using bovin serum albumin as a standard. Microsomes were frozen at -80°C and used for kinetic analysis.

Immunoblot analysis

Expression level quantification of VKORC1 and VKORC1L1 proteins in microsomal fractions were determined by western blotting as described previously [6]. Microsomal proteins were separated on 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto Immobilon-P membranes and probed with anti-c-myc antibodies (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The resulting immunocomplexes were visualized using alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse immunoglobulins as secondary antibodies and a BCIP/NBT solution. Quantification of the stained bands was performed by densitometry using the Scion Image software. The relative intensity (RI) of the signal was correlated to the quantity of microsomal proteins. The relation was linear from 0 to 50 µg for microsomal proteins.

To evaluate the expression level of VKORC1 and VKORC1L1 proteins, the expression of wild type human VKORC1 was designated as the basal expression. For the quantification of wild type or mutant VKORC1 or VKORC1L1, the same unique pool of yeast microsomes containing human VKORC1 was used. Therefore, its expression factor was by definition 1. The expression level of VKORC1 or VKORC1L1 proteins was evaluated by comparison to the expression of human VKORC1. For this purpose, various amounts (from 0 to 20 µg) of microsomal proteins containing human VKORC1 and various amounts (depending on the

expression level) of microsomal proteins containing VKORC1 or VKORC1L1 proteins were analyzed on the same western blot. Two linear relations ($RI = a \times \text{quantity of microsomes loaded}$) were obtained, the first one for microsomes containing human VKORC1 (characterized by a specific slope a^{VKORC1}), the second one for microsomes containing VKORC1 or VKORC-1L1 proteins (characterized by a slope a_{target}). Ratio $a^{VKORC1}/a_{\text{target}}$ allowed us to determine the expression factor characterizing the expression level of VKORC1 or VKORC1L1 proteins in the microsomal fraction compared with the expression level of the human VKORC1.

Vitamin K epoxide reductase activity (VKOR) assays and kinetics

Microsomal vitamin K epoxide reductase (VKOR) activity was assayed as described previously [5,17]. Briefly, standard reactions were performed in 200 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 150 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 0.25 to 2 g.L⁻¹ of total proteins containing membrane VKORC1. The reaction was started by the addition of vitamin K₃>O solution in 1% Triton X-100 and incubated at 37°C for 30 min. In these conditions, the reaction was linear according to the time of incubation and the quantity of incubated proteins. After incubation at 37°C for 30 min, the reaction was stopped by adding of 4 mL of iced 1:1 isopropanol/hexane solution. After centrifugation at 5000 g for 10 min, the hexane layer was removed and dried under nitrogen. The dry residue was immediately dissolved in 0.2 mL of isopropanol and reaction product was analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry.

The LC-APCI/MS/MS used was a 1100 Series LC/MSD ion Trap VL with an Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) interface and a LCMS Chemstation software from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Chromatographic separation was performed using a SunFire reverse phase C8 column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm, Waters, Milford, MA, USA) with a mobile phase of methanol, 0.1% acetic acid (95:5) in isocratic conditions. The column temperature was 45°C. The flow rate in the LC column was 1 ml/min. The injection volume was 20 μl. The temperature of the autosampler tray was set to 5°C and the samples were protected from the daylight. Detection was by MS/MS with APCI source in positive mode. Nebulizer pressure was set to 60psi, dry gas temperature to 350°C, dry gas flow to 5 L/min, and vaporizer temperature to 400°C. Capillary voltage was set to 4000V, corona needle to 4000 nA, and CID to 1V. Collision gas in the trap was helium with a pressure of 0.6 × 10⁻⁴ mbar. Identification criteria for vitamin K₃ are the retention time ($t_r = 4.1$ min) and the product ion 451 ≥ 187 ($m/z(+)=187$). Identification criteria for vitamin K₃>O are the retention time ($t_r = 3.4$ min) and the product ion 467 ≥ 307 ($m/z(+)=307$). Linearity and accuracy were tested from 25 to 2000 ng/ml (n=20). The response was linear throughout the concentration range tested with a coefficient of correlation (r^2) above 0.99. Accuracy was between 80 and 120% of the theoretical concentrations.

K_m , V_{max} and K_i values were obtained from at least three separate experiments performed on two different batches of protein. The estimation of K_m and V_{max} values was achieved by the incubation of at least 9 different concentrations of vit K>O (from 0.003 to

0.2 mM) to the standard reaction. Incubations were performed in duplicate. Data were fitted by nonlinear regression to the Michaelis-Menten model using the R-fit program. In order to evaluate the inhibiting effect of warfarin on VKOR activity, K_i were determined after addition of various concentrations of anticoagulant to the standard reaction in the presence of increasing amounts of vit K>O (from 0.003 to 0.2 mM) using anticoagulant concentrations from about 0.05 to 20 × K_i . Data were fitted by non-linear regression to the non-competitive inhibition model $v = (V_{max}/(1+(i/K_i))) * (S/(K_m+S))$ using the R-fit program.

Results

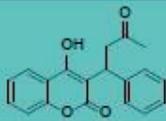
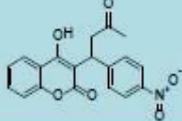
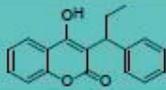
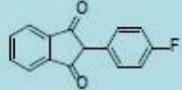
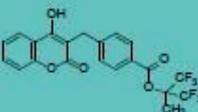
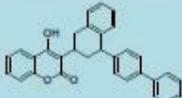
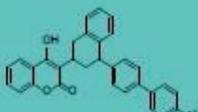
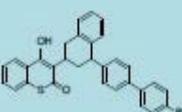
Comparative inhibition of VKOR activity catalysed by VKORC1 or VKORC1L1

The susceptibility of wild type VKORC1L1 to various VKAs used either in human medicine or as rodenticide was evaluated comparatively to that of wild type VKORC1. Results are presented in Table 1. While VKORC1 was inhibited by all the VKAs used in this study with K_i lower than 0.5 μM (except for warfarin and phenprocoumon), VKORC1L1 was particularly resistant to some VKAs with K_i systematically higher than 0.5 μM. More exactly, VKORC1L1 was roughly 30-fold more resistant to warfarin, a 4-hydroxycoumarin-derivative and the most VKA used worldwide, than VKORC1 (52 μM vs 1.7 μM). In the same way, fludionone, an indandione derivative largely used in France was completely ineffective to inhibit VKORC1L1 with a K_i 80-fold higher than that obtained for VKORC1 (21.3 μM vs 0.25 μM). Acenocoumarol and phenprocoumon were more effective to inhibit VKORC1L1 than warfarin and fludionone, but K_i obtained (i.e., 2.7 and 5.4 μM, respectively) were still largely higher than those obtained for VKORC1 (i.e., 0.3 and 0.7 μM, respectively). VKORC1L1 was also resistant to tecarfarin, a new VKA developed to avoid the CYP-450-dependent metabolism pathway [16]. K_i towards tecarfarin obtained with VKORC1L1 was 30-fold higher than that obtained with VKORC1 (2.4 vs 0.08 μM). The most potent VKAs, such as difenacoum, brodifacoum and difethialone, which possess very low K_i towards VKORC1, were also assayed in this study. These VKAs are used as rodenticide due to their good efficiency even on resistant strains of rats. Even towards these very effective VKAs, VKORC1L1 was approximately 7-fold more resistant than VKORC1, (Difenacoum 0.7 μM vs 0.1 μM, Brodifacoum 0.6 μM vs 0.15 μM, Difethialone 0.9 μM vs 0.2 μM).

VKORC1 and VKORC1L1 alignment

To gain insight into potential functional domains or amino acid residues of VKORC1L1 involved in VKOR activity and/or resistance to VKAs in the absence of 3D-structure of VKORC1L1 proteins, we performed a multiple alignment of 20 selected VKORC1L1 sequences plus 26 VKORC1 sequences, taken as an outgroup (Figures 1 and 2). VKORC1L1 proteins contain 176 amino acid residues, while VKORC1 proteins contain 163 amino acid residues. The sizes of the N-terminal and the C-terminal domains are longer in the VKORC1L1 group compared with the 26 VKORC1 proteins. The sequence comparison highlighted i) a very strong identity between VKORC1L1 sequences (between 85 % and 100 % according to the species considered) and ii) a limited degree of

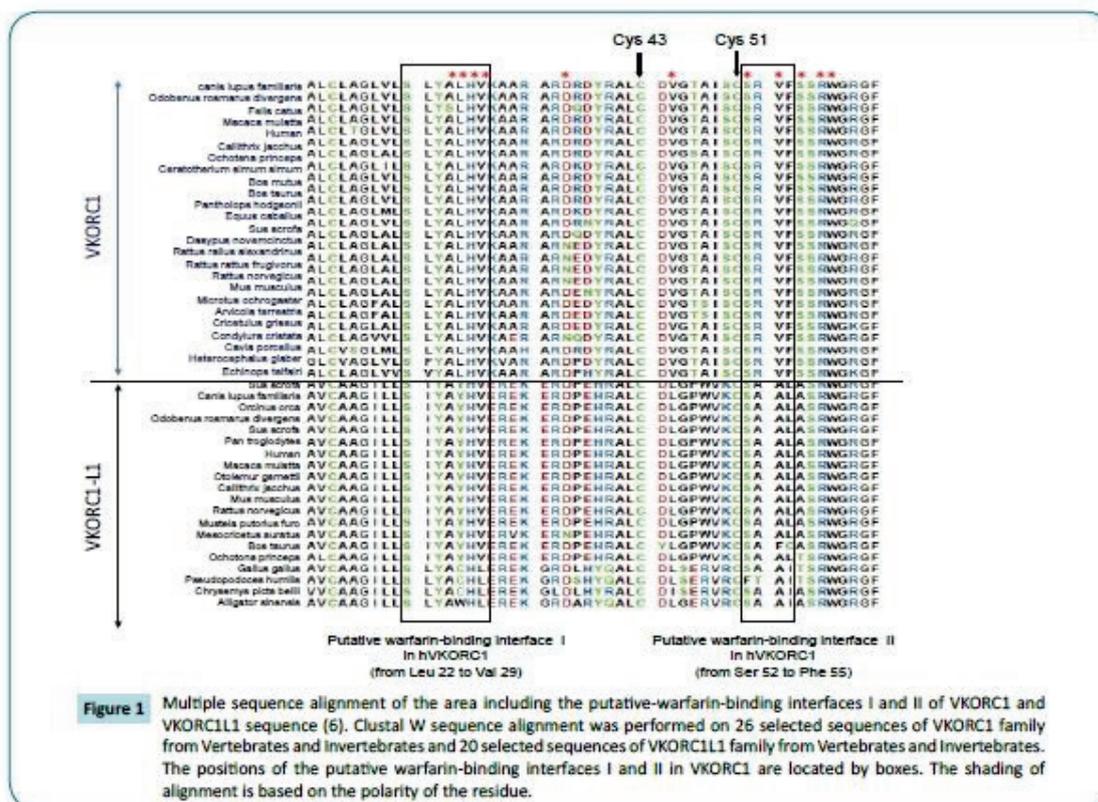
Table 1 K_i values of human VKORC1 and human VKORC1L1 proteins towards various VKA. Inhibition parameters were assessed using anticoagulant concentrations from about 0.05 to $20 \times K_i$.

Molecule	Chemical structure	K_i hVKORC1 (μ M)	K_i hVKORC1L1 (μ M)	K_i hVKORC1L1 / K_i hVKORC1
Warfarin		1.65 ± 0.79	52.0 ± 3.0	32
Acenocoumarol		0.33 ± 0.18	2.69 ± 0.8	8
Phenprocoumon		0.72 ± 0.31	5.36 ± 1.6	7
Fluindione		0.25 ± 0.14	21.3 ± 1.3	85
Tecarfarine		0.08 ± 0.01	2.40 ± 0.40	30
Difenacoum		0.12 ± 0.03	0.71 ± 0.09	6
Brodifacoum		0.15 ± 0.02	0.57 ± 0.08	4
Difethialone		0.18 ± 0.03	0.87 ± 0.16	5

identity between VKORC1L1 sequences and VKORC1 sequences (~50% of identity) with two remarkable conserved peptide domains with an identity higher than 75%. More precisely, 47 amino acid positions are identical, both in the VKORC1 outgroup and in the VKORC1L1 family. Among these conserved positions, 9

are located in the first conserved motif and 17 are located in the second conserved motif; the others are distributed all along the alignment.

The first conserved domain from amino acid 64 to amino acid 72



of VKORC1L1 sequences (i.e., the "SRWGRGFGL" motif) is strictly conserved between VKORC1L1 and VKORC1 sequences (Figure 1). Nevertheless, none of these residues were described to be of importance in VKORC1. Close to the first domain are found the Cys-43 and Cys-51 strictly conserved in VKORC1 proteins and proposed as important residues in VKORC1 proteins. These Cys are also strictly conserved in VKORC1L1 proteins in position 50 and 58, respectively (Figure 1).

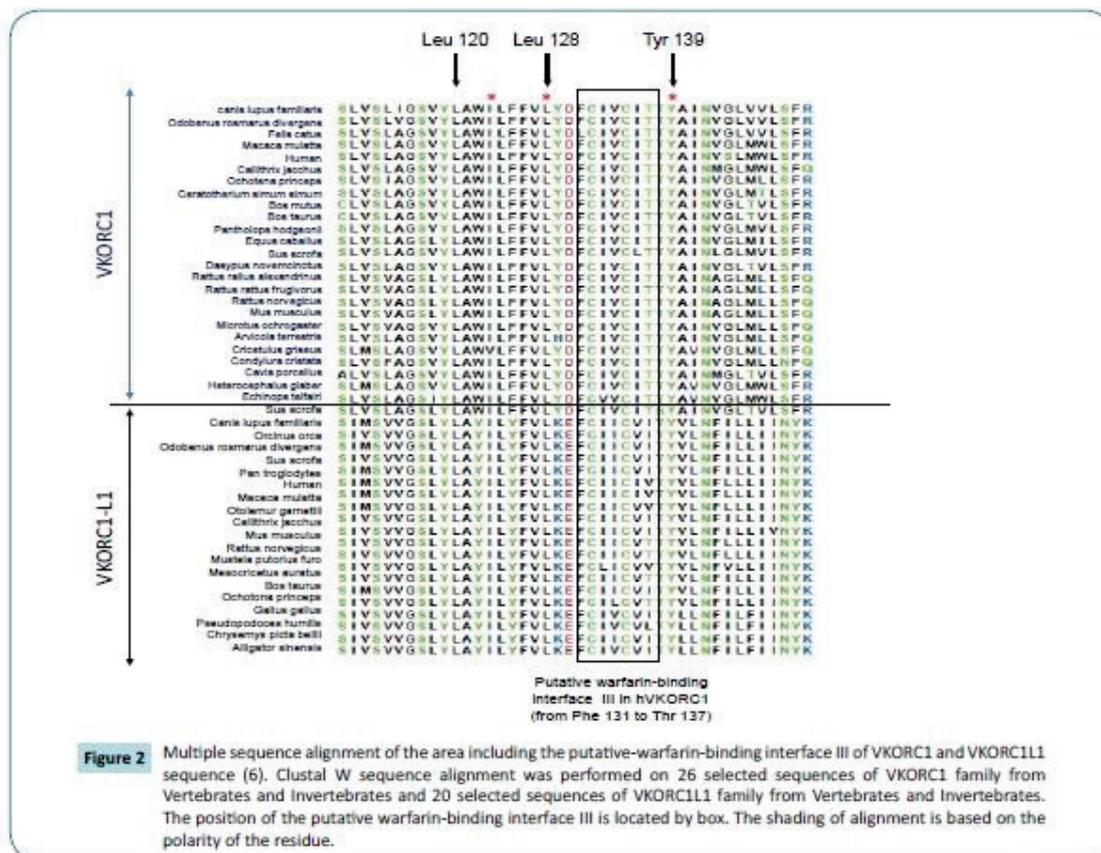
The second conserved domain between VKORC1 and VKORC1L1 proteins contain amino acid 123 to amino acid 146 in VKORC1L1 (i.e., corresponding to the residues 116 to 139 in VKORC1). This domain is highly conserved with 75% of identity between VKORC1L1 sequences and VKORC1 sequences (Figure 2). This second domain contains the "CXXC" motif proposed as catalytic site in the VKORC1 proteins. This "CXXC" motif is also present in VKORC1L1 proteins from amino acid position 139 to 142 (Figure 2). Close to this domain are found the main amino acid positions of VKORC1 leading to severe resistance to VKA (i.e., amino acid position 120, 128 and 139). Leu-120, Leu-128 and Tyr-139 strictly conserved between VKORC1 proteins are also strictly conserved between VKORC1L1 in position 127, 135 and 146, respectively (Figure 2). On the other hand, because the hypothetical catalytic mechanism proposed by Silverman [3] for VKORC1 implies the involvement of nucleophilic amino acid residues close to the

catalytic site, the conservation of nucleophilic amino acid residues between VKORC1 and VKORC1L1 proteins inside the second conserved domain was analyzed. In VKORC1, three nucleophilic residues close to the catalytic site are found in position 129 (i.e., Tyr), 130 (i.e., Asp) and 139 (i.e., Tyr). In VKORC1L1 proteins, the first nucleophilic amino acid is not conserved and is replaced by a basic amino acid found in position 136 (i.e., Lys) but totally conserved between VKORC1L1 proteins. The two other nucleophilic residues close to the catalytic site conserved between VKORC1 are also conserved in VKORC1L1 proteins and correspond to Tyr-146 and Glu-137.

The presence of 7 additional amino acids in the first 20 amino acids of VKORC1L1 leads to a gap of the numbering of amino acid residues between VKORC1 and VKORC1L1 sequences. To facilitate the understanding of the results, we decide to number amino acids of VKORC1L1 by the number of the corresponding amino acid in VKORC1 and to add to this number (+7) in index.

Analysis of the importance of the "CXXC" motif in the function of VKORC1L1

To address the functional contribution of the "CXXC" motif in the vitamin K epoxide reductase activity catalyzed by VKORC1L1, we conducted a systematic site-directed mutagenesis approach.



Individual cysteines were subjected to non-conservative substitutions to generate 2 mutants VKORC1L1-C132₍₊₇₎A and VKORC1L1-C135₍₊₇₎A. Wild-type and mutant VKORC1L1 enzymes were expressed at a similar level in *Pichia pastoris* (data not shown) and tested for *in vitro* vitamin K epoxide reductase activity using K₁>0 as substrate. Activity of the recombinant enzymes determined in the presence of 200 μM of K₁>0 was normalized to the amount of expressed protein, and values are presented in Figure 3. The recombinant wild type VKORC1L1 exhibited high activity up to 20 pmol·min⁻¹·mg protein, although it was undetectable in mock-transformed yeasts. On the other hand, replacement of each cysteine of the “CXXC” motif completely abolished the *in vitro* enzyme activity (i.e. less than 2% of the recombinant VKORC1L1 activity), emphasizing the prevalent function of the “CXXC” motif for the vitamin K epoxide reductase activity of VKORC1L1.

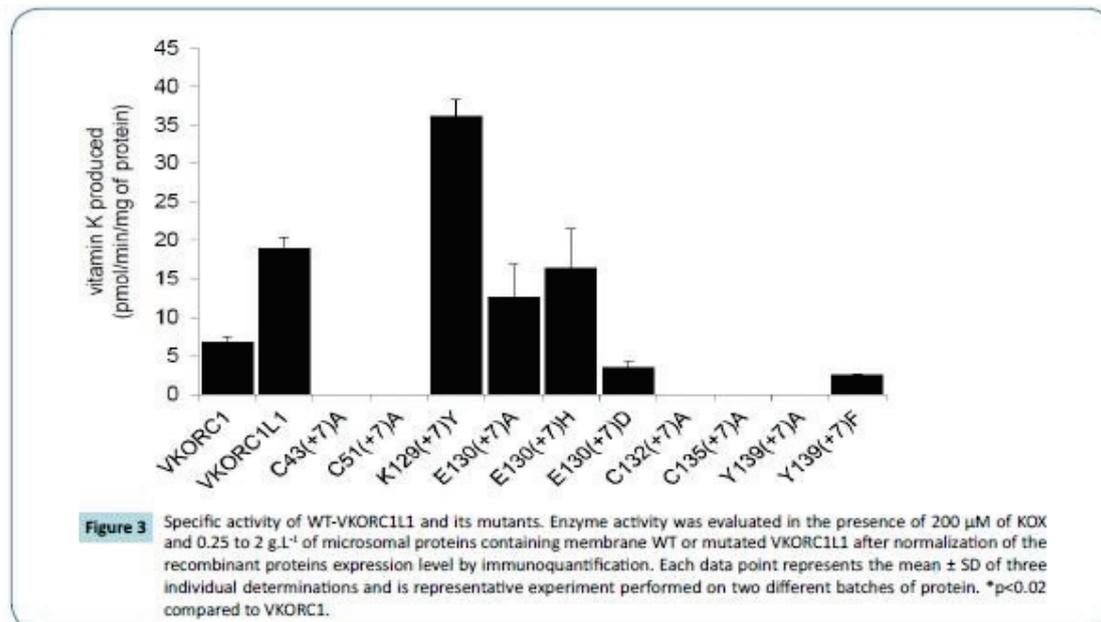
Analysis of the importance of Cys-43₍₊₇₎ and Cys-51₍₊₇₎ in the function of VKORC1L1

To further investigate the importance of conserved Cys-43₍₊₇₎ and Cys-51₍₊₇₎ in the VKOR activity catalyzed by VKORC1L1, we analyzed the catalytic effects of non-conservative mutation of

these residues into Ala. Upon expression, VKORC1L1-C43₍₊₇₎A and VKORC1L1-C51₍₊₇₎A mutants were expressed at similar or higher levels than that of the wild-type enzyme (data not shown). Interestingly, replacement of Cys-43₍₊₇₎ or Cys-51₍₊₇₎ of VKORC1L1 by Ala abolished the *in vitro* VKOR activity (i.e. less than 2% of the recombinant VKORC1L1 activity) in the presence of saturating concentration of K₁>0, suggesting the major role of both Cys in the function of VKORC1L1.

Analysis of the importance of the nucleophilic amino acid residues surrounding the “CXXC” motif of VKORC1L1

In the next series of experiments, we explored the specific function of Lys-129₍₊₇₎, Glu-130₍₊₇₎ and Tyr-139₍₊₇₎ amino acid residues surrounding the “CXXC” motif. To address the importance of these invariant amino acids in VKOR activity, a series of mutants exhibiting non-conservative and/or conservative substitutions at each position were engineered to generate 6 mutants VKORC1L1-K129₍₊₇₎Y, VKORC1L1-E130₍₊₇₎A, -E130₍₊₇₎H, -E130₍₊₇₎D, VKORC1L1-Y139₍₊₇₎A and -Y139₍₊₇₎F. The recombinant proteins were produced in yeast *P. pastoris*. Immunoblot analysis indicated



that these mutants were all produced and their expression factor was comprised between 0.3 to 2 compared with the expression of recombinant wild type VKORC1 protein used as a standard (data not shown).

To evaluate the consequences of the mutations on the enzyme function, we analyzed the activity of mutated VKORC1L1 proteins (Figure 3). VKORC1L1-K129₍₊₇₎Y exhibited up to 200% vitamin K epoxide reductase activity in the presence of 200 μ M of K_2O compared with wild-type VKORC1L1 enzyme; VKORC1L1-E130₍₊₇₎A and VKORC1L1-E130₍₊₇₎H exhibited up to 67 and 86% vitamin K epoxide reductase activity. The non-conservative mutation of Tyr-139₍₊₇₎ in Ala abolished the VKOR activity suggesting the important role of this residue in VKOR activity (Figure 3). On the contrary, the replacement of Tyr-139₍₊₇₎ by Phe, another aromatic amino acid residue led to a mutant that exhibited up to 14% vitamin K epoxide reductase activity, indicating that Phe and Tyr residues are to some extent interchangeable at this position. Kinetic parameters and susceptibility to VKA were thus determined for active mutated VKORC1L1 proteins and are presented in Tables 2 and 3, respectively.

Discussion

Even if VKORC1L1 was initially proposed to be responsible for driving the vitamin K mediated intracellular antioxidation pathway [8], its crucial role in the gammacarboxylation of extrahepatic VKDP is becoming increasingly obvious. In the absence of VKA treatment, involvement of VKORC1L1 in the gammacarboxylation of extrahepatic VKDP is at least as important as VKORC1. On the other hand, during long-term anticoagulation therapy with warfarin, VKORC1L1, which is 30-fold more resistant

to warfarin than VKORC1 [10], is certainly the only enzyme supporting the VKOR activity in extrahepatic tissues and thus, the gammacarboxylation of extrahepatic VKDPs. Warfarin was the first molecule developed as VKA. Since then, numerous vitamin K-antagonists molecules were developed. While these molecules are all much more potent to inhibit VKORC1 than warfarin, their ability to inhibit VKORC1L1 is still unknown. This question is of major interest if we consider that some of these molecules are also used in human medicine during long-term anticoagulation and that their use could naturally inhibit the coagulation process, but also other extrahepatic VKDP-dependent physiological processes not inhibited by the use of warfarin.

To address this question, recombinant VKORC1L1 was expressed in *P. pastoris* and VKOR activity was characterized by a DTT-driven VKOR assay, as previously described [5,10]. This experimental approach is a direct approach based on the measurement of the VKORC1 reaction product, the vitamin K. The results obtained by this method, and particularly the resistance factors to VKAs obtained by this method, were successfully confronted to results obtained by *ex vivo* and *in vivo* assays [17,18-20]. This experimental approach was recently challenged by other indirect approaches designed as cell-based VKOR assays [6,7,21] based on the measurement of the gamma-carboxylation of overexpressed clotting factors by the constitutive GGX in the presence of vitamin K hydroquinone produced by the overexpressed VKORC1. Since the results obtained by the different developed cell-based VKOR assays are conflicting between them, we chose intentionally to use the DTT-driven VKOR approach, as previously used [10] to characterize the VKOR activity of VKORC1L1.

Seven molecules, known to inhibit VKORC1, were tested in this study as inhibitor of VKORC1L1. These molecules are either

Table 2 Apparent kinetic parameters towards K₁>0 of human VKORC1, VKORC1L1 and mutated VKORC1L1 proteins. V_{max} values determined at saturating concentration of K₁>0 were evaluated after normalization of the recombinant proteins expression level by immunodetection. Each data point represents the mean ± SD of three individual determinations. * p<0.02 compared to WT.

Protein	K _m (μM)	V _{max} (pmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	V _{max} /K _m (nL·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)
hVKORC1	21.5 ± 4.2	7.1 ± 0.5	330
hVKORC1L1	24.1 ± 3.0	20.7 ± 0.9	859
K129 ₍₊₇₎ _Y	22.2 ± 11.8	39.2 ± 5.1	1766
E130 ₍₊₇₎ _A	29.8 ± 8.9	13.1 ± 4.4	440
E130 ₍₊₇₎ _H	31.1 ± 8.3	19.0 ± 5.1	611
E130 ₍₊₇₎ _D	19.1 ± 5.7	3.8 ± 0.7	199
Y139 ₍₊₇₎ _A	—	—	—
Y139 ₍₊₇₎ _F	25.1 ± 1.2	2.7 ± 0.1	108

Table 3 K_i values of human VKORC1, VKORC1L1 and mutated VKORC1L1 proteins towards warfarin. Inhibition parameters were assessed using anticoagulant concentrations from about 0.05 to 20×K_i.

Protein	K _i (μM)
hVKORC1	1.65 ± 0.79
hVKORC1L1	52.0 ± 0.79
K129 ₍₊₇₎ _Y	12.3 ± 1.9
E130 ₍₊₇₎ _A	3.2 ± 1.1
E130 ₍₊₇₎ _H	3.6 ± 1.1
E130 ₍₊₇₎ _D	3.2 ± 0.8
Y139 ₍₊₇₎ _A	—
Y139 ₍₊₇₎ _F	>300

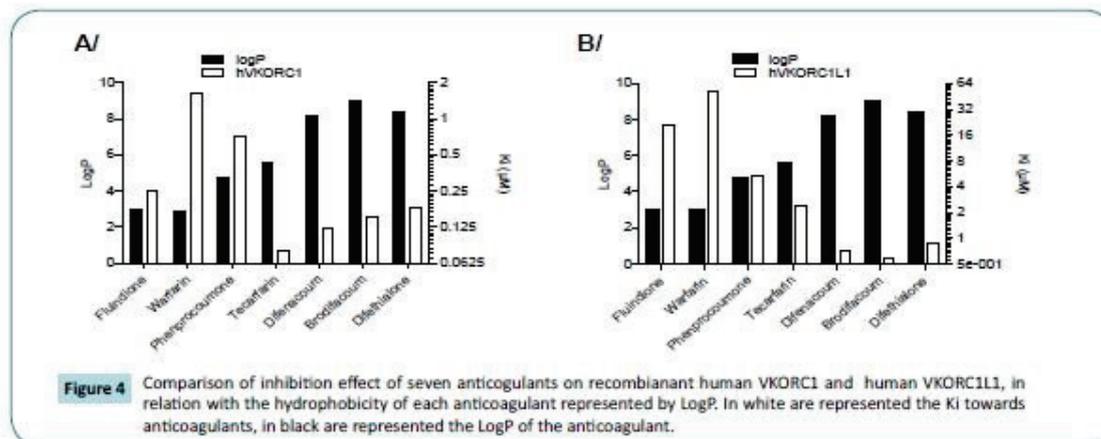
4-hydroxycoumarin or 4-hydroxy-1-thiocoumarin or indanedione derivatives. Whatever the structure of the molecule is, K_i obtained for VKORC1L1 systematically increases as compared to human VKORC1, as it was already observed with warfarin [10]. Hydrophobicity and length of lateral chain of the molecules seems to favor the interaction of anticoagulant with VKORC1L1 (Table 1) and (Figure 4), as previously described for VKORC1 [17,19]. Contrary to human VKORC1, 4-hydroxycoumarin structures seems to interact with VKORC1L1 more efficiently than indanedione structures. Among these molecules, four are used (i.e., acenocoumarol, phenprocoumon, flumidione) [22] or developed to be used (i.e., tecarfarin) [18,23] in human medicine and three are used as rodenticides (i.e., difenacoum, brodifacoum, difethialone) [24]. All these molecules are able to inhibit human VKORC1L1 in a non-competitive manner, as observed for human VKORC1 [5]. Nevertheless, all the molecules used in human medicine (i.e., acenocoumarol, phenprocoumon, flumidione, tecarfarin) are very bad inhibitors of VKORC1L1 (with K_i higher than 2 μM) while they are able to efficiently inhibit human VKORC1 (i.e., with K_i<0.7 μM). It is thus likely that the use of these molecules during long-term anticoagulation therapy allow VKORC1L1 to still support the VKOR activity in extrahepatic tissues, as previously described for warfarin [10]. The other molecules (i.e., difenacoum, brodifacoum, difethialone) with K_i less than 1 μM are probably able to inhibit VKORC1L1 in extrahepatic tissues

and, thus inhibit or at least decrease the gammacarboxylation of extrahepatic VKDP. The use of some of these molecules during long-term anticoagulation could lead to serious unwanted side effects due to the undercarboxylation of extrahepatic VKDP such as OC [12], MGP [11], Gas 6 [13]. Fortunately, these molecules are never used in human medicine and are exclusively used for the pest control management.

To pinpoint potential amino acid residues of VKORC1L1 involved in catalysis and/or substrate recognition or responsible for the natural resistance to VKAs of VKORC1L1 in the absence of 3D-structure of VKORC1L1 proteins, we carried out a multiple sequences alignment analysis between VKORC1 and VKORC1L1 proteins. This study allowed us to highlight 1) conserved amino acid residues between VKORC1 and VKORC1L1 potentially involved in catalysis (i.e., Cys-43₍₊₇₎, Cys-51₍₊₇₎, Asp/Glu-130₍₊₇₎, Cys-132₍₊₇₎, Cys-135₍₊₇₎, Tyr-139₍₊₇₎) and/or substrate binding and 2) conserved amino acid residues in VKORC1L1 (i.e., Lys-129₍₊₇₎), but not in VKORC1 (i.e., Tyr-129) that may cause a different susceptibility to VKAs between enzymes. Our analysis was centered on the area surrounding the presumed VKORC1 catalytic site [25,26], in which mutations leading to the most severe resistances to VKA have been detected [3,17,27]. This area was also proposed as putative-warfarin binding site [7,28]. These highlighted residues were subjected to systematic site-directed mutagenesis and we assessed the functional consequences of these mutations.

The Cys-132₍₊₇₎ and Cys-135₍₊₇₎ are totally conserved between VKORC1L1 sequences. These cysteines were also previously shown to be evolutionarily conserved in all known VKORC1 sequences [29]. In VKORC1L1, both cysteines are also in a "CXXC" motif (Figure 2). This motif was shown to be implicated in redox reactions in VKORC1 [30,31] but also in other redox proteins [32]. Recently, from two crystal structures of bacterial homologs captured in different reaction states, the second cysteines of the motif was proposed to link covalently to the C1 of the quinone ring of vit K1>0 [33]. In agreement with these results, mutations of cysteines 132 and 135 in alanine in hVKORC1 lead to an inactivation of the enzyme. In hVKORC1L1, the replacement of Cys-132₍₊₇₎ and Cys-135₍₊₇₎ of the "CXXC" motif by Ala, a non-conservative amino acid residue, totally abolished the VKOR activity. These results suggest the involvement of Cys-132(+7) and Cys-135(+7) in the transfer of the redox power from VKORC1L1 to vitamin K epoxide, as already proposed for VKORC1 [30].

Besides Cys-132 and Cys-135, two other cysteines Cys-43 and Cys-51 are strictly conserved in VKORC1 proteins of vertebrates, *Drosophila*, plants, bacteria and archaea. In VKORC1L1 proteins, both cysteines are also strictly conserved. In bacterial VKOR homologues, both cysteines are present in the predicted luminal loop separating α-helices 1 and 2. These loop cysteines were proposed to reduce the CXXC motif [31,33]. For VKORC1 proteins, there is still a debate between Cys-43 and Cys-51 being involved in the internal electron transfer. Indeed substitutions of Cys-43 or/and Cys-51 by non-conservative residues lead to contradictory results [30,34-36]. To address the functional contribution of both residues in VKORC1L1, Cys-43₍₊₇₎ or Cys-51₍₊₇₎ were replaced by Ala, a non-conservative residue. These mutations totally abolished activity of recombinant VKORC1L1 enzyme, suggesting a crucial



role of these conserved residues in the internal electron transfer from the redox protein partner to the internal catalytic site, as suggested recently by Tie et al. [37].

A theoretical reaction mechanism for converting vitamin K₂O to K by VKOR enzymes was proposed by Silverman based on a chemical model study [38]. This mechanism was revisited later by a quantum chemical study [39]. The theoretical model implied the CXXC catalytic site and one nearby acidic amino acid residue involved in the protonation of the epoxide oxygen. Nevertheless, this proposed reaction mechanism was never experimentally confirmed even for VKORC1 enzymes. In hVKORC1L1, only two acidic amino acid residues Glu-130₍₁₂₇₎ and Tyr-139₍₁₃₇₎ are located close to the CXXC catalytic site. Both residues are totally conserved between VKORC1L1 proteins. To explore their respective role in the reaction mechanism of VKORC1L1, non-conservative and conservative mutations of these residues were performed.

The non-conservative substitution of Tyr-139₍₁₃₇₎ by Ala in hVKORC1L1 totally abolished VKORC1L1 activity, while the conservative substitution of Tyr-139₍₁₃₇₎ by Phe partially restored VKORC1L1 activity with a K_m similar to wild type VKORC1L1. These results highlight the importance of an aromatic residue at this position. The Tyr-139₍₁₃₇₎ may be involved in the substrate binding via stacking interaction. Nevertheless, the replacement of this residue by Phe at position 139₍₁₃₇₎ dramatically impaired the V_{max} and thus the catalytic efficiency. The Tyr-139₍₁₃₇₎ of VKORC1L1 might be involved in the protonation of the reaction intermediate produced by catalysis, as was proposed for VKORC1 [40]. Finally, even if VKORC1L1 is naturally 30-fold more resistant to VKAs than VKORC1, the replacement of Tyr-139₍₁₃₇₎ by Phe leads also, as described for VKORC1 [27,41], to an increase of K_i of VKORC1L1 towards VKAs. This result suggests a similarity of VKA-binding sites between VKORC1 and VKORC1L1 and the involvement of Tyr-139₍₁₃₇₎ in the binding of VKA by VKORC1L1 as proposed for VKORC1 [28].

The non-conservative substitutions of Glu-130₍₁₂₇₎ by Ala or His in hVKORC1L1 did not modify the VKOR activity. These results are

thus not in favor of the involvement of Glu-130₍₁₂₇₎ in the reaction mechanism of hVKORC1L1 and more precisely in the protonation of the epoxide oxygen. Nevertheless, while the substitution of Glu-130₍₁₂₇₎ by Ala or His does not modify VKOR activity, the replacement of the same Glu-130₍₁₂₇₎ by Asp drastically decreases VKOR activity with an activity lower than 20% compared with that of the wild type enzyme. Therefore the catalytic efficiency of this mutant is extremely decreased while the enzyme-substrate interaction is unchanged (K_m similar to that of the wild type enzyme). This loss of activity is very surprising because in VKORC1 proteins an Asp is present at this corresponding position. The weak activity of VKORC1L1-E130₍₁₂₇₎D is potentially due to a modification of the steric hindrance of the CXXC catalytic site, leading to a change in the positioning of the substrate in the catalytic site. In view of these surprising results, we then evaluated the susceptibility of the VKORC1L1-E130₍₁₂₇₎A, -E130₍₁₂₇₎H, -E130₍₁₂₇₎D to VKAs. Indeed, the domain surrounding the CXXC motif from Phe-131 to Thr-137 was recently proposed as putative warfarin-binding site for VKORC1 [27]. While VKORC1L1 is naturally very resistant to VKA (30-fold than VKORC1 towards warfarin), the simple substitution of Glu-130₍₁₂₇₎ by Ala, His or Asp (i.e., the corresponding amino acid found in VKORC1) drastically modified susceptibility to VKAs. Their susceptibility to VKAs becomes similar to that of VKORC1. These results suggest that the natural resistance to VKA of VKORC1L1 is partially due to the steric hindrance of VKA interaction site by the lateral chain of Glu-130₍₁₂₇₎. Nevertheless, the replacement of Asp-130 by Glu in VKORC1 does not modify the susceptibility of VKORC1 to VKA (data not shown), suggesting structural properties different between VKORC1 and VKORC1L1.

Conclusion

In conclusion, this structure-function study allowed us, 1) to demonstrate the importance of Cys-132₍₁₃₀₎ and Cys-135₍₁₃₃₎, but also of Cys-43₍₄₁₎ and Cys-51₍₄₉₎ in the transfer of the redox power from VKORC1L1 to vitamin K epoxide, 2) to compare the susceptibility to all VKAs of VKORC1 and VKORC1L1, 3) to demonstrate the implication of Tyr-139₍₁₃₇₎ in the interaction of VKORC1L1 with

warfarin, 4) to associate the natural resistance of VKORC1L1 to VKA with the steric hindrance of VKA interaction site by the lateral chain of Glu-130_(s7). Interestingly, a single mutation is able to modify drastically the susceptibility of VKORC1L1 to VKAs.

Acknowledgment

This work was supported by grants from Agence Nationale pour la Recherche (RODENT 2009-CESA-008-03) and by DGER.

References

- Bell RG, Matschiner JT (1970) Vitamin K activity of phyloquinone oxide. *Arch Biochem Biophys* 141: 473-476.
- Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, et al. (2004) Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427: 541-544.
- Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V (2004) Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427: 537-541.
- Silverman RB (1980) A model for a molecular mechanism of anticoagulant activity of 3-substituted 4-hydroxycoumarins. *J Am Chem Soc* 102: 5421-5423.
- Hodroge A, Matagrín B, Moreau C, Fourel I, Hamed A, et al. (2012) VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity. *J Thromb Haemost* 10: 2535-2543.
- Tie JK, Jin DY, Tie K, Stafford DW (2013) Evaluation of warfarin resistance using transcription activator-like effector nucleases-mediated vitamin K epoxide reductase knockout HEK293 cells. *J Thromb Haemost* 11: 1556-1564.
- Czogalla KJ, Biswas A, Wendeln AC, Westhofen P, Müller CR, et al. (2013) Human VKORC1 mutations cause variable degrees of 4-hydroxycoumarin resistance and affect putative warfarin binding interfaces. *Blood* 122: 2743-2750.
- Westhofen P, Watzka M, Marinova M, Hass M, Kirfel G, et al. (2011) Human vitamin K 2,3-epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) mediates vitamin K-dependent intracellular antioxidant function. *J Biol Chem* 286: 15085-15094.
- Oldenburg J, Watzka M, Bevans CG (2015) VKORC1 and VKORC1L1: why do vertebrates have two vitamin K₂,3-epoxide reductases? *Nutrients* 7: 6250-6280.
- Hamed A, Matagrín B, Spohn G, Prouillac C, Benoit E, et al. (2013) VKORC1L1, an enzyme rescuing the VKOR activity in some extrahepatic tissues during anticoagulation therapy. *J Biol Chem* 288: 28733-28742.
- Price PA, Urist MR, Otawara Y (1983) Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun* 117: 765-771.
- Price PA, Poser JW, Raman N (1976) Primary structure of the gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 3374-3375.
- Nakano T, Kawamoto K, Kishino J, Nomura K, Higashino K, et al. (1997) Requirement of gamma-carboxyglutamic acid residues for the biological activity of Gas6: contribution of endogenous Gas6 to the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Biochem J* 323: 387-392.
- Schurgers LJ, Teunissen KJ, Knapen MH, Kwaijtaal M, Van Diest R, et al. (2005) Novel conformation-specific antibodies against gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1629-1633.
- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, et al. (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130: 456-469.
- Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P (2008) Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5266-5270.
- Hodroge A, Longin-Sauvageon C, Fourel I, Benoit E, Lattard V (2011) Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Arch Biochem Biophys* 515: 14-20.
- Ellis DJ, Usman MH, Milner PG, Canafax DM, Ezekowitz MD (2009) The first evaluation of a novel vitamin K antagonist, tecarfarin (ATI-5923) in patients with atrial fibrillation. *Circulation* 120: 1029-1035.
- Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Videmann B, Billeret M, Berny P, et al. (2005) Warfarin resistance in a French strain of rats. *J Biochem Mol Toxicol* 19: 379-385.
- Grandemange A, Kohn MH, Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Berny P, et al. (2009) Consequences of the Y139F Vkorc1 mutation on resistance to AVKs: *in vivo* investigation in a 7th generation of congenic Y139F strain of rats. *Pharmacogenet Genomics* 19: 742-750.
- Fregin A, Czogalla KJ, Gansler J, Rost S, Taverna M, et al. (2013) A new cell culture-based assay quantifies vitamin K₂,3-epoxide reductase complex subunit 1 function and reveals warfarin resistance phenotypes not shown by the dithiothreitol-driven VKOR assay. *J Thromb Haemost* 11: 872-880.
- Le Heuzey JY, Ammentorp B, Darius H, De Caterina R, Schilling RJ, et al. (2014) Differences among western European countries in anticoagulation management of atrial fibrillation in Europe. *Thromb Haemost* 111: 833-841.
- Bavisotto LM, Ellis DJ, Milner PG, Combs DL, Irwin I, et al. (2011) Tecarfarin, a novel vitamin K reductase antagonist, is not affected by CYP2C9 and CYP3A4 inhibition following concomitant administration of fluconazole in healthy participants. *J Clin Pharmacol* 51: 561-574.
- Fourel I, Hugnet C, Goy-Thollot I, Berny P (2010) Validation of a new liquid chromatography-tandem mass spectrometry ion-trap technique for the simultaneous determination of thirteen anticoagulant rodenticides, drugs, or natural products. *J Anal Toxicol* 34: 95-102.
- Wajih N, Sane DC, Hutson SM, Wallin R (2005) Engineering of a recombinant vitamin K-dependent gamma-carboxylation system with enhanced gamma-carboxyglutamic acid forming capacity: evidence for a functional CXXC redox center in the system. *J Biol Chem* 280: 10540-10547.
- Tie JK, Nicchitta C, Von Heijne G, Stafford DW (2005) Membrane topology mapping of vitamin K epoxide reductase by *in vitro* translation/cotranslocation. *J Biol Chem* 280: 16410-16416.
- Watzka M, Geisen C, Bevans CG, Sittlinger K, Spohn G, et al. (2011) Thirteen novel VKORC1 mutations associated with oral anticoagulant resistance: insights into improved patient diagnosis and treatment. *J Thromb Haemost* 9: 109-118.
- Oldenburg J, Bevans CG, Muller CR, Watzka M (2006) Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1): the key protein of the vitamin K cycle. *Antioxid Redox Signal* 8: 347-353.
- Goodstadt L, Ponting CP (2004) Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *Trends Biochem Sci* 29: 289-292.
- Jin DY, Tie JK, Stafford DW (2007) A topological study of the human gamma-glutamyl carboxylase. *Biochemistry* 46: 7279-7283.
- Li W, Schulman S, Dutton RJ, Boyd D, Beckwith J, et al. (2010) Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase. *Nature* 463: 507-512.

- 32 Holmgren A (1985) Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 54: 237-271.
- 33 Liu S, Cheng W, Fowle Grider R, Shen G, Li W (2014) Structures of an intramembrane vitamin K epoxide reductase homolog reveal control mechanisms for electron transfer. *Nat Commun* 5: 3110.
- 34 Rost S, Fregin A, Hünerberg M, Bevans CG, Müller CR, et al. (2005) Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. *Thromb Haemost* 94: 780-786.
- 35 Rishavy MA, Usabalieva A, Hallgren KW, Berkner KL (2011) Novel insight into the mechanism of the vitamin K oxidoreductase (VKOR): electron relay through Cys43 and Cys51 reduces to allow vitamin K reduction and facilitation of vitamin K-dependent protein carboxylation. *J Biol Chem* 286: 7267-7278.
- 36 Tie JK, Jin DY, Stafford DW (2012) Human vitamin K epoxide reductase and its bacterial homologue have different membrane topologies and reaction mechanisms. *J Biol Chem* 287: 33945-33955.
- 37 Tie JK, Jin DY, Stafford DW (2014) Conserved loop cysteines of vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) are involved in its active site regeneration. *J Biol Chem* 289: 9396-9407.
- 38 Silverman RB (1981) Chemical model studies for the mechanism of vitamin K epoxide reductase. *J Am Chem Soc* 103: 5939-5941.
- 39 Davis CH, Deerfield D, Wymore T, Stafford DW, Pedersen LG (2007) A quantum chemical study of the mechanism of action of vitamin K epoxide reductase. *J Mol Graph Model* 26: 401-408.
- 40 Matagrín B, Hodroge A, Montagut-Romans A, Andru J, Fourel I, et al. (2013) New insights into the catalytic mechanism of vitamin K epoxide reductase (VKORC1)-the catalytic properties of the major mutations of rVKORC1 explains the biological cost associated to mutations. *FEBS Open Bio* 3: 144-150.
- 41 Pelz HJ, Rost S, Hünerberg M, Fregin A, Heiberg AC, et al. (2005) The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics* 170: 1839-1847.

VII - DISCUSSION

Le travail présenté dans ce mémoire traite du rôle causal des mutations de VKORC1 sur la résistance de cible aux AVK. Alors que l'idée générale stipulait que l'inefficacité des traitements anti-vitaminiques devrait être due aux modifications génétiques de la VKORC1 lorsque celles-ci étaient retrouvées chez des patients résistants, nous avons montré que le génotype ne pouvait pas toujours expliquer les résistances observées. C'est donc pour cela que nous avons décidé de continuer notre recherche afin d'en savoir plus sur d'autres mécanismes de la résistance aux AVK. Nous nous sommes concentrés sur l'étude des caractéristiques de la VKORC1L1 ce qui nous a permis de découvrir que cette enzyme catalyse l'activité VKOR et nécessite des doses d'AVK significativement bien plus élevée que celle utilisées pour inhiber la VKORC1.

Résistance observée chez l'homme et propriétés catalytiques de VKORC1

Nous avons considéré une série importante de mutations spontanées observées chez des patients nécessitant une posologie augmentée d'au moins deux fois par rapport à la valeur usuelle de 5 mg de coumafène par individu par jour. Ces mutations ont été, soit décrites dans la littérature, soit découvertes au cours d'une collaboration avec le groupe de Marie Anne Lorient de l'hôpital Georges Pompidou.

Nous avons déterminé les constantes d'inhibition vis-à-vis du coumafène, molécule essentiellement utilisée chez les personnes âgées, de l'acénocoumarol et de la fluindione. Même si cette dernière molécule est surtout utilisée en France, il nous a semblé intéressant de l'utiliser dans cette étude. En effet, sa différence structurale par rapport aux deux autres molécules utilisées peut résulter en des différences d'inhibition.

Dans cette série de mutations, notre modèle n'a finalement permis d'établir une relation de causalité entre le génotype et le phénotype « résistant » que pour 6 mutations seulement. Il est donc clair que pour ces 6 mutations, la capacité à les repérer avant le début du traitement aurait une influence sur la mise en place du traitement par les AVK, que l'on débiterait alors directement à des posologies plus fortes que normalement. En plus d'une diminution du risque de complication, ceci entraînerait un gain de temps et d'argent.

Pour les autres mutations, différentes hypothèses restent à explorer afin d'essayer de relier ces mutations à un phénomène de résistance.

Lorsque les mutations ne provoquent aucune modification observable par rapport à la forme sauvage : la mutation n'a donc pas de conséquence sur la catalyse telle que nous l'analysons.

- Une explication envisageable est que cette mutation est liée haplotypiquement avec une autre mutation qui pourrait se retrouver dans le promoteur par exemple, conduisant à la surexpression de la VKORC1 et rendant ainsi l'action des AVK moins efficace aux doses thérapeutiques usuelles.

- Une autre hypothèse possible est que la mutation n'a pas d'effet sur la catalyse médiée par VKORC1, mais sur les interactions entre VKORC1 et ses partenaires protéiques tel que le réducteur physiologique qui restent inconnu à ce jour ou tel que la caluménine, une protéine chaperonne qui pourrait être impliquée dans le repliement de VKORC1 et dans la résistance aux AVK.

D'autres mutations entraînent une perte d'activité, voire une inactivation de la protéine.

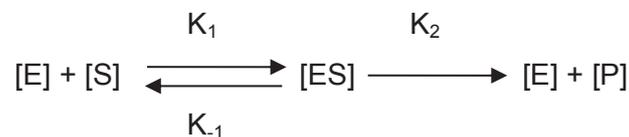
Sur le plan du mécanisme de la VKORC1, certaines mutations sont très intéressantes. Pour rappel, le cycle de l'enzyme comporte deux parties distinctes :

- Le transfert du pouvoir réducteur à partir de la lumière du réticulum endoplasmique au travers de protéines mal identifiées (telles que PDI, TMX, TMX4 ou encore ERp18) en contact direct avec les deux cystéines 43 et 51 de la boucle luminale de la VKORC1. La réduction de ces cystéines permettra ultérieurement la réduction des cystéines catalytiques 132 et 135.

- La catalyse de la réduction de l'époxyde de la vitamine K.

Les mutations retrouvées dans les domaines transmembranaires conduisent soit à l'inactivation de l'enzyme, soit l'enzyme reste active avec une V_{max} non modifiée par rapport à celle observée pour l'enzyme sauvage (10 ± 5 pmol/min/mg de protéine). Au contraire, les mutations dans la boucle luminale modifient de façon très forte les V_{max} (de 1 à 50 pmol/min/mg de protéine). Ce constat est en faveur du fait que le transfert de pouvoir réducteur réalisé au travers de cette boucle luminale est limitant, en terme de vitesse, par rapport à la catalyse de la réduction de la vitamine K>O. En effet, des perturbations même minimales de la structure de la protéine, impliquées dans une étape limitante se répercuteront directement sur la catalyse globale alors que des modifications même assez violentes de la phase non limitante ne se répercuteront que lorsque ces modifications aboutiront au fait que cette phase devienne elle-même limitante. Il est remarquable de noter que deux mutations accélèrent considérablement le cycle catalytique et en particulier la mutation Ser56Phe qui quadruple la V_{max} sans modifier la K_M de la réaction.

Stafford avait indiqué que le résidu 57 pouvait établir une liaison avec l'époxyde de vitamine K. Les mutations très proches de cet acide aminé (Val554Leu, Arg58Gly et la mutation Trp59Cys) modifient très fortement la K_m de l'enzyme montrant que toute déformation de l'enzyme autour de cette zone modifie l'interaction avec le substrat. Il semble donc que la boucle luminale et en particulier la demi-hélice alpha (acide-aminé 51 à 57) forme un « bouchon » mobile capable d'obturer le canal formé par les quatre domaines transmembranaires. Un tel « bouchon » conserverait une certaine forme d'hydrophobicité dans le milieu réactionnel et stabiliserait l'interaction entre le substrat et l'enzyme. Ainsi, la constante de dissociation K_{-1} du complexe [enzyme-substrat] serait diminuée du fait de « l'étanchéité » de ce bouchon. Toute déformation de ce « bouchon » se traduirait par une augmentation de K_{-1} et donc par une augmentation de la K_M .



$$K_M = (K_{-1} + K_2) / K_1$$

Deux articles publiés très récemment montrent des résultats très discordants par rapport aux nôtres. Le premier article issu du groupe de J. Oldenburg est basé sur l'expression hétérologue de mutants que nous avons considérés comme sensibles dans des cellules HEK 293 « knock outées » pour le gène *VKORC1* endogène. Dans leur étude, l'activité VKOR n'est pas suivie et les auteurs ont choisi de suivre la gamma-carboxylation du FIX qu'ils co-expriment avec la *VKORC1* ou un de ses mutants. Les auteurs montrent qu'aucune des mutations testées n'est sensible aux AVK (pour les mutants que nous considérons comme sensibles, les facteurs de résistance (FR) varient de 3 à 6) où que soit positionnée cette mutation. Les auteurs indiquent donc que nos observations sont totalement biaisées par l'utilisation de notre modèle levure.

Tie *et al.* (groupe de D. Stafford) ont également utilisé les cellules HEK pour étudier les mutants que nous avons considérés comme peu actifs. Ces auteurs utilisent un double knock-out tant de *VKORC1* que de *VKORC1L1* dont ils montrent le rôle important dans ces cellules. Ils co-expriment un mutant *VKORC1* et une partie du facteur X pour suivre la gamma-carboxylation de ce facteur synthétique. Ces auteurs observent une activité VKOR avec ces mutants, cependant la moitié de ces mutants sont sensibles (FR de 1) alors que ces mêmes mutants sont considérés comme résistants (FR de 3 à 6) par Czogalla. Tie et ses coauteurs indiquent que le knock-out de *VKORC1L1* est indispensable dans leur modèle

car en présence de cette dernière enzyme, l'activité VKOR reste importante dans les cellules. Nous considérons que dans la mesure où l'activité VKOR supportée par VKORC1L1 est résistante aux AVK, il est tout à fait possible que l'analyse de la sensibilité aux AVK en présence de VKORC1L1 soit perturbée par la présence de VKORC1L1. En conséquence la valeur minimale observée du facteur de résistance est toujours forte (de 3 à 6) pour des enzymes que nous considérons comme sensibles ou que Tie *et al.* considèrent comme sensibles.

Tableau 4 : Comparaison des facteurs de résistance (FR) pour différents mutants de VKORC1 déterminés en levure *Pichia pastoris* (Hodroge *et al.*) et en cellules HEK293 (Tie *et al.* / Czogalla *et al.*)

	Hodroge <i>et al.</i> (2011)	Tie <i>et al.</i> (2013)	Czogalla <i>et al.</i> (2013)
WT	1	1	1
A26P	11,2	-	49,6
A26T	1,3	-	3
L27V	1,1	-	2,5
H28Q	0,4	-	2,9
D36Y	1,1	-	3,8
D36G	0,4	-	3,2
A41S	1,1	-	-
V45A	0,7	-	6,2
V54L	4,8	-	4,5
S56F	0,6	-	6,8
R58G	0,9	-	3,4
W59C	0,7	-	7,6
H68Y	3,8	-	-
I123N	2,4	-	-
Y139H	3,6	-	4,6
S52L	-	10	7,4
S52W	-	1	5,7
W59R	-	100	17
W59L	-	30	75
V66M	-	1	5,4
V66G	-	1	2,8
G71A	-	1	5,1
N77S	-	3	5,3
N77Y	-	1	3,9
L128R	-	35	8,5

Un second aspect de nos résultats est contesté en particulier par Tie *et al.* Ils considèrent que les mutants que nous considérons comme peu actifs sont aussi actifs que la forme sauvage ou aussi actifs que la VKORC1L1 qui de ce fait est aussi active que VKORC1. Par contre, Tie *et al.* ne travaillent aucun des mutants que nous considérons comme actifs et ne prend comme témoin négatif qu'une mutation d'une des cystéines impliquées dans le transfert de pouvoir réducteur (C43A).

Il nous apparaît qu'en aucun cas ces auteurs n'envisagent de déterminer la nature de l'étape limitante du système utilisé. En effet, le système utilise une cellule très lourdement modifiée (2 gènes knock outés, 1 gène surexprimé constitutivement et une expression transitoire des mutants de VKORC1). La diffusion et la concentration du coumafène dans cette cellule (au même titre que la vitamine K époxyde) est fort probable et reste cependant non analysée. L'anticoagulant inhibant VKORC1, bloque la gamma carboxylation d'un peptide surexprimé. Aucune approche quantitative du niveau d'expression des mutants de VKORC1 ou du peptide ne permet de déterminer que VKORC1 est limitant. En revanche, il est évident, qu'en absence d'arguments spécifiquement développés, le facteur limitant entre une enzyme surexprimée et un substrat surexprimé, a toutes les chances d'être le substrat et non l'enzyme. Si tel était le cas, alors effectivement, même peu actifs des mutants pourraient être considérés comme actifs tant que leur activité permet la gamma-carboxylation du substrat. Dans ces conditions tous les mutants mais aussi la forme sauvage de VKORC1 et VKORC1L1 auraient toujours la même activité. C'est précisément ce qu'observent ces auteurs.

Propriétés catalytiques de VKORC1L1 et résistance extra-hépatique

Nous avons travaillé sur l'enzyme VKORC1L1 qui à ce jour n'avait fait l'objet que d'une unique publication par le groupe de J. Oldenburg. Ces derniers ont conclu que cette protéine, paralogue de VKORC1, est impliquée dans la lutte contre le stress oxydant. Nous avons décidé de vérifier si le rôle de cette protéine dans le cycle n'aurait pas été négligé.

Notre étude a permis de confirmer que la VKORC1L1 catalyse également l'activité VKOR. Le modèle d'expression en levure *Pichia pastoris* a été utilisé pour comparer l'efficacité catalytique de VKORC1 et VKORC1L1 chez l'homme puis chez le rat. Tandis que chez le rat, l'efficacité catalytique de VKORC1L1 est 30 fois plus faible que celle de VKORC1, chez l'homme VKORC1L1 réduit la vitamine K^{>O} avec une efficacité 2 fois supérieure à celle de la VKORC1. Ces résultats suggèrent un rôle important de la VKORC1L1 dans l'activité VKOR de l'homme.

Par ailleurs, rappelons que l'activité VKOR est spécifiquement inhibable par les AVK telle que le coumafène. En effet, la protéine VKORC1 a été décrite comme une protéine dont l'activité enzymatique est fortement inhibée par les AVK. La sensibilité de VKORC1L1 vis-à-vis de ces molécules n'a pas été clairement étudiée. Dans notre étude, nous démontrons que la réduction de la vitamine K[>]O en vitamine K catalysée par VKORC1L1 (aussi bien chez l'homme que chez le rat) est nettement moins sensible à l'action des AVK que celle catalysée par VKORC1. En effet, afin d'inhiber cette activité de la même façon que VKORC1, la dose d'anticoagulant inhibitrice est 30 à 50 fois supérieur pour la VKORC1L1 (respectivement chez l'homme et le rat).

Ces nouveaux résultats nous ont poussés à reconsidérer le rôle de VKORC1L1 dans le cycle de la vitamine K dans différents tissus. Dans un premier temps, nous avons voulu caractériser la part de l'activité VKOR assurée par VKORC1L1 dans le foie, tissu où cette activité est la plus élevée et où sont quasi exclusivement exprimés les facteurs de coagulation. Nous avons démontré que VKORC1L1 ne catalyse pas la réduction de la vitamine K[>]O dans ce tissu. En effet, non seulement l'expression transcriptionnelle de *Vkorc1l1* est négligeable dans le foie, et il apparaît que l'inhibition de l'activité VKOR dans le foie correspond parfaitement à une inhibition non-compétitive avec un modèle enzymatique où seule la VKORC1 interviendrait dans la catalyse de l'activité VKOR. De même, nous n'avons détecté aucune activité VKOR dans les foies de souris KO en VKORC1. Ces résultats sont en cohérence avec le phénotype décrit pour les souris *Vkorc1*^{-/-}. En effet, les souris homozygotes meurent 2 à 20 jours après leur naissance suite à de fortes hémorragies dues à une déficience totale de la gamma-carboxylation des facteurs de coagulation, confirmant l'exclusive implication de la VKORC1 dans le foie.

En revanche, dans certains tissus extra-hépatiques, l'activité VKOR est aussi bien catalysée par VKORC1 que VKORC1L1. Si les facteurs de coagulation sont synthétisés dans le foie, d'autres PVKD sont produites dans d'autres organes. Dans ces tissus non hépatiques, nous avons systématiquement détecté une activité VKOR. A titre indicatif, dans les poumons, où la MGP semble être exprimé selon l'équipe de Price, l'activité VKOR apparaît 5 fois plus faible que dans le foie. Dans les testicules où nous avons détecté de la MGP, cette activité est seulement 2 fois moins importante que dans le foie.

Dans les tissus extra-hépatiques testés dans cette étude, la quantité de l'ARN de *Vkorc1* est toujours fortement inférieure à celle détectée dans le foie. Quant à la distribution de l'ARN de *Vkorc1l1* se révèle être de quantité équivalente voire légèrement supérieure comparativement à ce qui est retrouvé dans le foie. Etant donné qu'il n'existe pas d'anticorps

anti-VKORC1L1 sur le marché à ce jour, nous avons déterminé l'activité de la VKORC1L1 en caractérisant l'activité VKOR dans les différents tissus extra-hépatiques. A titre d'exemple, dans les testicules des souris *Vkorc1^{-/-}*, une activité VKOR a été mesurée. Ceci démontre bien l'implication d'au moins une autre enzyme, certainement la VKORC1L1. En effet, nous avons découvert que dans les testicules de souris sauvages, la VKORC1L1 est responsable de 35% de l'activité VKOR et peut être inhibée avec de fortes concentrations en coumafène. Dans les testicules de rats, l'inhibition de l'activité VKOR suit également un modèle non-compétitif. Cependant, contrairement au foie, le modèle théorique où seule la VKORC1 catalyse l'activité VKOR ne correspond pas à nos résultats expérimentaux. Si, nous remplaçons les paramètres catalytiques de la VKORC1 par ceux de la VKORC1L1, le modèle reste incorrect. Seul un modèle où les deux enzymes interviennent dans la catalyse nous a permis de faire coïncider nos résultats expérimentaux à la théorie. Ainsi, dans les testicules de rat, il apparaît que l'activité VKOR est catalysée à 55% par la VKORC1L1 et à 45% par la VKORC1. Le même type d'étude a été réalisé avec des tissus non hépatiques où la part de la VKORC1L1 dans l'activité est légèrement plus faible que celle observée dans les testicules mais reste effective.

Ces résultats peuvent expliquer l'absence d'effets secondaires au niveau extra-hépatique lors de traitements avec des anticoagulants de type AVK. Ces résultats sont en cohérence avec ce qui est observé dans la littérature. L'équipe de Price doit utiliser des doses d'AVK fortement supérieure aux doses thérapeutiques humaines pour pouvoir inhiber l'action de l'ostéocalcine ou de la MGP en réduisant leur gamma-carboxylation. En effet, lorsque la VKORC1L1 est exprimée dans un tissu, une forte concentration en AVK est nécessaire pour inhiber l'activité VKOR de manière similaire à celle observée dans le foie où la VKORC1L1 n'intervient pas. Ainsi, les PVKD qui ont une fonction autre que celle de réguler la coagulation pourront être gamma-carboxylés durant un traitement aux AVK et donc continueront à assurer leur rôle physiologique. Ceci pourrait expliquer pourquoi les antivitamine K actuellement utilisés ne sont que des anticoagulants.

Implication des acides aminés de VKORC1L1 dans ses propriétés enzymatiques.

La précédente étude a permis de confirmer le rôle important de la VKORC1L1 dans le cycle de la vitamine K et ceci même lors d'un traitement aux AVK sans effet majeur sur son activité, à l'instar de la VKORC1. Afin de comprendre les différences catalytiques de ces deux enzymes, nous avons comparé leur séquence, ce qui a mis en évidence :

- des déterminants structuraux communs à l'origine soit de la fixation du substrat, la vitamine K époxyde, soit de la catalyse, mais également,
- des déterminants structuraux pouvant expliquer la différence de comportement face aux AVK.

Tableau 5 : Comparaison qualitative des constantes catalytiques des mutants de hVKORC1L1 déterminées *in vitro*, par rapport à celle de hVKORC1L1 non mutées.

	Activité spécifique	Km	Vmax	Efficacité enzymatique (= Vmax/Km)	Ki
C43(+7)A	0	NA	NA	NA	NA
C51(+7)A	0	NA	NA	NA	NA
K129(+7)Y	+	=	+	+	-
E130(+7)A	=	=	=	=	-
E130(+7)H	=	=	=	=	-
E130(+7)D	-	=	-	-	-
K129(+7)Y/E130(+7)D	-	=	-	-	-
C132(+7)A	0	NA	NA	NA	NA
C135(+7)A	0	NA	NA	NA	NA
Y139(+7)A	0	NA	NA	NA	NA
Y139(+7)F	-	=	-	-	+

Légende : « 0 », l'activité de l'enzyme est non détectable (nulle)
 « NA », non analysé
 « - », valeur inférieure à celle de l'enzyme non mutée
 « + », valeur supérieure à celle de l'enzyme non mutée
 « = », valeur égale à celle de l'enzyme non mutée

Tableau 6 : Comparaison qualitative des constantes catalytiques des mutants de hVKORC1 déterminées *in vitro*, par rapport à celle de hVKORC1 non mutées.

	Activité spécifique	Km	Vmax	Efficacité enzymatique (= Km/Vmax)	Ki
C43A	0	NA	NA	NA	NA
C51A	0	NA	NA	NA	NA
Y129K	+	=	+	+	=
D130A	0	NA	NA	NA	NA
D130H	0	NA	NA	NA	NA
D130E	=	=	=	=	=
Y129K/D130E	=	=	=	=	=
C132A	0	NA	NA	NA	NA
C135A	0	NA	NA	NA	NA
Y139A	-	=	=	-	+
Y139F	-	+	=	-	+

Légende : « 0 », l'activité de l'enzyme est non détectable (nulle)
 « NA », non analysé
 « - », valeur inférieure à celle de l'enzyme non mutée
 « + », valeur supérieure à celle de l'enzyme non mutée
 « = », valeur égale à celle de l'enzyme non mutée

Nous avons cherché à déterminer, dans un premier temps, l'importance de 4 cystéines (Cys-43, Cys-51, Cys-132, Cys-135) strictement conservés dans les différentes espèces répertoriées, aussi bien chez VKORC1 que chez VKORC1L1. La mutagenèse dirigée de ces cystéines en alanine a conduit à une perte totale de l'activité (tableaux 5 et 6). Ces résultats sont en cohérence avec ceux obtenus pour la VKORC1 (Rost *et al.*, 2005, Rishavy *et al.*, 2010). Quant à VKORC1L1, la participation de ces cystéines dans mécanisme d'action n'avait pour l'instant jamais été explorée. Ces nouveaux résultats supposent donc que le mécanisme catalytique de cette enzyme est similaire à celui de la VKORC1. Pour ces deux protéines, le domaine CXXC serait donc localisé dans le site actif, tandis que les deux cystéines de la grande bouche luminale seraient impliquées dans le transfert du pouvoir redox.

Etant donné que le mécanisme catalytique décrit par Silverman (1980) implique un acide aminé acide, nous avons par la suite tenté d'expliquer l'implication des acides aminés acides proches du domaine catalytique. En effet, l'époxyde de vitamine K récupérerait un proton *via* cet acide aminé acide. VKORC1L1 compte deux acides aminés proches du site actif (Glu-130(+7) et Tyr-139(+7)), tandis que VKORC1 en compte trois (Tyr-129, Asp-130 et Tyr-139). Afin d'explorer le rôle des résidus en position 130 et 139, ces derniers ont été remplacés dans hVKORC1 et dans hVKORC1-L1 par des résidus conservatifs et non conservatifs. Pour explorer le rôle joué par le résidu 129, ce dernier a été inter-changé entre les 2 protéines (chez VKORC1L1, le résidu en position 129(+7) est une lysine).

Nous avons donc exploré la participation du résidu en position 130 (Asp/Glu, respectivement pour VKORC1L1/VKORC1) dans le mécanisme catalytique. Les mutations non conservatives de ce résidu dans la hVKORC1 entraînent une perte totale d'activité, tandis que la mutation conservative ne modifie pas les caractéristiques catalytiques de l'enzyme. Ces résultats suggèrent donc un rôle déterminant de ce résidu dans le fonctionnement de hVKORC1, compatible avec un rôle de catalyseur acide. En revanche, les mutations conservatives et non conservatives de ce même résidu dans la hVKORC1L1 n'abolissent pas l'activité de la protéine. Il est donc probable que ce résidu ne soit pas le catalyseur acide dans hVKORC1L1 ou bien qu'un autre résidu puisse prendre le relais.

Quant aux résultats des K_i des mutants en 130 (mutation conservative ou non) obtenus dans la hVKORC1L1, il s'avère que ces mutations modifient énormément les sensibilités de l'enzyme aux AVK (Tableaux 5 et 6). Le Glu semble gêner la fixation de l'AVK par l'enzyme. Le résidu Glu pourrait entraîner un encombrement stérique plus grand que le résidu Asp présent dans la hVKORC1, pouvant expliquer la différence de comportement des 2 enzymes face aux AVK. Toutefois, chez VKORC1, la mutation D130E ne modifie pas le K_i .

Pour les mutants en 139, les K_i déterminés au cours de notre étude révèlent également une diminution de la sensibilité aux AVK, aussi bien chez VKORC1 que chez VKORC1L1 (Tableaux 5 et 6). Ceci est totalement cohérent avec les résultats cliniques observés (Watzka *et al.*, 2011), suggérant la causalité de la mutation dans le phénotype observé. D'ailleurs le remplacement de la Tyr139 par Phe, Cys ou Ser chez le rat entraîne un phénotype résistant aux AVK (Rost *et al.*, 2009). La Tyr139 semble donc participer à l'interaction avec l'AVK.

Enfin, le rôle du résidu 129 a été exploré. En effet, en position 129 de la VKORC1 est présent un résidu à caractère acide (Tyr), alors que en position 129 dans VKORC1L1, on retrouve un résidu basique (Lys). Une mutation réciproque a été effectuée (c'est-à-dire remplacement de la Tyr par une Lys dans la hVKORC1 et remplacement de la Lys par une Tyr dans la hVKORC1L1) afin d'évaluer l'implication de ce résidu dans la réponse différente des 2 enzymes vis-à-vis des AVK. Les 2 mutants obtenus restent actifs. Les K_m restent inchangés. Par ailleurs, la mutation K129Y dans la hVKORC1L1 augmente la sensibilité de l'enzyme vis-à-vis des AVK. Ce résultat suggère que la Lys129 repousse l'AVK ou bien que la Tyr129 participe à l'interaction avec l'AVK. Cependant, la mutation Y129K dans la hVKORC1 ne modifie pas la réponse aux AVK, ce qui orienterait alors vers un rôle répulsif de la lysine 129 vis-à-vis des AVK.

VIII - CONCLUSIONS

Les études à la fois transcriptionnelles et enzymatiques effectuées chez l'homme mais également chez le rat et la souris ont fourni un grand nombre d'informations tant sur les conséquences phénotypiques des mutations de VKORC1, que sur les propriétés catalytiques et la fonction de VKORC1L1 dans le cycle de la vitamine K.

Parmi les 26 mutations spontanées humaines retrouvées chez des patients dont la dose d'AVK est au moins deux fois supérieure à celle utilisées normalement, nous avons découvert que seules six expliquent directement cette résistance. Ces mutations devraient d'ailleurs être systématiquement prises en compte dans les schémas thérapeutiques. De façon surprenante, onze des mutations spontanées correspondent à des mutations invalidantes pour l'activité catalytique. Retrouver ces mutations chez des patients « résistants » pose différentes questions. Par exemple, comment une personne avec une VKORC1 inactive peut-elle coaguler et de plus, nécessiter des doses plus importantes en AVK (que celles utilisées en routine) pour observer une inhibition de la coagulation.

Concernant la VKORC1L1, peu d'informations sur cette enzyme étaient disponibles si ce n'est que sa fonction serait principalement d'agir contre le stress oxydatif. Nous avons, de notre côté, confirmé que la VKORC1L1 est une enzyme capable de catalyser la réduction de la vitamine K² au même titre que la VKORC1 et nous avons de plus démontré qu'elle est au moins 30 fois plus résistante aux AVK par rapport à la VKORC1. S'il apparaît que sa contribution dans l'activité VKOR dans le foie est insignifiante, nous avons également observé que sa participation dans les tissus non hépatiques testés est considérable, et tout particulièrement dans les testicules. Ces propriétés catalytiques de la VKORC1L1 peuvent expliquer l'absence d'effets secondaires dans les fonctions physiologiques des PVKD autres que les facteurs de la coagulation lors de traitements aux AVK. Toutefois, la meilleure façon pour déterminer la fonction d'une protéine est d'éteindre l'expression de son gène (tout comme cela a été réalisé pour la VKORC1). Le knock-out de la *Vkorc1l1* chez la souris est une perspective à envisager sérieusement pour la suite. L'obtention de souris *Vkorc1l1*^{-/-} permettra de conforter nos observations et ainsi de valider nos hypothèses. Les résultats attendus sont l'observation d'une hyper-calcification ectopique par exemple sans pour autant observer de problème de coagulation.

L'étude Structure-Fonction amorcée au cours de ce travail a permis de :

- de confirmer l'importance des Cys132 et 135 dans l'activité de VKORC1, mais également dans celle de VKORC1-L1. Ces résidus seraient impliqués dans le transfert de pouvoir redox de l'enzyme vers le substrat.

- de suggérer le rôle de catalyseur acide joué par l'Asp130 dans le mécanisme catalytique de VKORC1.

- de relier éventuellement la résistance de la hVKORC1L1 à l'encombrement stérique potentiellement dû au Glu130 et/ou à l'effet répulsif dû à la Lys129.

VIII - PERSPECTIVES

À court terme, il serait intéressant de découvrir la nature des partenaires protéiques des enzymes à activité VKOR, et notamment à ceux qui apportent le pouvoir réducteur. Quelle protéine intervient dans cette réduction ? La PDI ? Les TMX, TMX4 ou la protéine ERp18 ? Comment ces protéines interagissent-elles avec la VKORC1 ? Quels sont les éventuels motifs reconnus par ces protéines ? Pour apporter des éléments de réponse quant au partenaire redox, nous pouvons envisager de travailler sur les cellules HEK293 dont nous éteindrions l'expression grâce à un système efficace : TALEN. Cette nouvelle technologie permet même d'éteindre l'expression de plusieurs gènes en même temps dans l'éventualité où plusieurs protéines permettent de réduire l'enzyme VKORC1. Comment cela fonctionne-t-il ? En 2009, des chercheurs ont découvert que les bactéries *Xanthomonas* produisent des protéines, nommées TALE, capables de se lier à des séquences spécifiques de l'ADN. Si on leur adjoint une autre protéine, cette dernière peut alors remplir une fonction à l'emplacement ciblé par la première. Ainsi, si une nucléase est liée à une protéine TALE, on obtient une nouvelle protéine, appelée TALEN (N pour nucléase), qui a la capacité de reconnaître une séquence spécifique du génome (grâce à la protéine TALE) et de la couper (grâce à la nucléase).

Les protéines TMX à étudier parmi l'ensemble de celles décrites dans la littérature avec un tel pouvoir réducteur pourront être déterminées par l'étude de l'expression transcriptionnelle dans les cellules HEK293 et sélectionner celles qui y sont le plus exprimées.

De telles données seront utiles pour mettre en place un système d'étude enzymatique exempt de DTT alors remplacé par une protéine Trx-like et du NAD(P)H₂ pour apporter le pouvoir réducteur à la VKORC1(L1). Ce modèle se rapprocherait plus de ce qui se déroule physiologiquement chez l'homme.

À plus long terme, il me semble intéressant d'expliquer comment il est possible qu'une personne résistante aux AVK puisse « posséder » une VKORC1 (mutée) inactive. La question que l'on peut se poser est alors si notre modèle *in vitro* est utilisable pour établir une relation entre une mutation de la VKORC1 et la résistance phénotypique observée. Un premier élément de réponse peut-être apporté. En effet, nous disposons, dans notre animalerie, d'une lignée de souris « résistantes ». Après séquençage de leur VKORC1, nous avons découvert que le tryptophane en position 59 est muté en glycine (W59G). Les propriétés catalytiques de ce mutant de VKORC1 ont été évaluées *in vitro* grâce au système d'expression *Pichia pastoris* et il en résulte que cette mutation inactive l'enzyme. Jusqu'ici

rien de nouveau si ce n'est que nous possédons une lignée « rare » de souris avec une VKORC1 inactive. Par ailleurs, l'étude de la distribution transcriptionnelle des enzymes du cycle de la vitamine K ont montré que le taux de *Vkorc1* dans le foie est quasi nul, la quantité est d'ailleurs similaire à celle qu'on retrouve dans les souris *Vkorc1*^{-/-}. Ces dernières données renforcent les résultats obtenus avec notre système d'expression en levure et excluent toute participation de VKORC1 à l'activité VKOR. L'analyse approfondie de ce système est indispensable. Comment expliquer que ces souris W59G, n'exprimant pas *Vkorc1*, puissent vivre normalement tandis que les souris *Vkorc1*^{-/-} meurent en moins de 2 semaines !!! Il apparaît clairement que la résistance aux AVK ne peut être expliquée par l'action seule de la VKORC1.

Enfin, même si les résultats que nous avons obtenus pour la VKORC1L1 sont très novateurs, il est important de réaliser qu'ils restent encore à déterminer *in vivo* le rôle de la VKORC1L1 au niveau extra-hépatique.

IX - ANNEXES

Annexe 1 : Tableau des amorces des mutations spontanées de *Vkorc1*

Mutation	Amorce sens (5' → 3')	Amorce Anti-sens (5' → 3')
Ala26Pro	TCTCTGTACCCTCTGCATGTG	CACATGCAGAGGGTACAGAGA
Ala26Thr	TCTCTGTACACTCTGCATGTG	CACATGCAGAGTGTACAGAGA
Leu27Val	TCTCTGTACGCTGTGCATGTGAAAGCTG	CAGCTTTCACATGCACAGCGTACAGAGA
His28Gln	TGTACGCTCTGCAAGTGAAAGCTGC	GCAGCTTTCACTTGCAGAGCGTACA
Val29Leu	GCTCTGCATCTGAAAGCTGCC	GGCAGCTTTCAGATGCAGAGC
Asp36Tyr	CGTGCTAGATATCGCGACTAT	ATAGTCGCGATATCTAGCACG
Asp36Gly	CGTGCTAGAGGTCGCGACTAT	ATAGTCGCGACCTCTAGCACG
Ala41Ser	GACTATCGTTCTCTGTGTGAT	ATCACACAGAGAACGATAGTC
Val45Ala	CTGTGTGATGCCGGCACCGCA	TGCGGTGCCGGCATCACACAG
Ser52Leu	GCAATTAGTTGTCTTCGTGTTTTTAGC	GCTAAAAACACGAAGACAATAATTGC
Ser52Trp	GCAATTAGTTGTTGCGTGTTTTTAGC	GCTAAAAACACGCCAACAACTAATTGC
Val54Leu	TGTAGCCGCTTTTTAGCAGC	GCTGCTAAAAAGACGGCTACA
Ser56Phe	AGCCGTGTTTTTTTCAGCCGTTGGGGT	ACCCAACGGCTGAAAAAACACGGCT
Arg58Gly	TTTAGCAGCGGTTGGGGTCGT	ACGACCCCAACCGCTGCTAAA
Trp59Arg	AGCAGCCGTAGAGGTCGTGGC	GCCACGACCTCTACGGCTGCT
Trp59Leu	AGCAGCCGTTTGGGTCGTGGC	GCCACGACCCAAACGGCTGCT
Trp59Cys	AGCAGCCGTTGTGGTCGTGGC	GCCACGACCACAACGGCTGCT
Val66Met	TTCGACTGATGGAACACGTG	CACGTGTTCCATCAGTCCGAA
Val66Gly	TTCGACTGGGTGAACACGTG	CACGTGTTCAACCAGTCCGAA
His68Tyr	CTGGTTGAATACGTGTTGGGT	ACCCAACACGTATTCAACCAG
Gly71Ala	CACGTGTTGGCTCAGGACTCA	TGAGTCCTGAGCCAACACGTG
Asn77Ser	GACTCAATCCTGAGTCAATCCAATTCA	TGAATTGGATTGACTCAGGATTGAGTC
Asn77Tyr	GACTCAATCCTGTACCAATCCAATTCA	TGAATTGGATTGGTACAGGATTGAGTC
Ile123Asn	TATTTGGCGTGGAACCTGTTTTTCGTG	CACGAAAAACAGGTTCCACGCCAAATA
Leu128Arg	CTGTTTTTCGTGAGATACGATTTTTGT	ACAAAAATCGTATCTCACGAAAAACAG
Tyr139His	CATCACCCTCATGCCATCAACG	CGTTGATGGCATGAGTGGTGATG

Annexe 2 : Tableau des amorces des gènes des enzymes du cycle de la vitamine K et de la *Gapdh*, le gène de ménage

Gène	Amorce sens (5' → 3')	Amorce Anti-sens (5' → 3')
<i>Vkorc1</i>	TCCCGCGTCTTCTCCTCT	CGTCCCCTCAAGAACCTA
<i>Vkorc1l1</i>	CGAGCCAAACAGTGTCTTTGGACTTA	TGTGGTGACGCAGATGATGCAA
<i>Ggcx</i>	GGACCGAAAATACTTGGATG	GTCCAGGAGAAACACGTACC
<i>Nqo1</i>	AGGCTGGTTTGAGAGAGTGC	ATTGGCCAGAGAATGACGTT
<i>Gapdh</i>	CAGAACATCATCCCTGCATC	CTGCTTCAACCACCTTCTTGA

X - LISTE BIBLIOGRAPHIQUE

Andrews T. C., Peterson D. W., Doeppenschmidt D., Lucca M. J., Deering J. A. and LaVeau P. J. "Complications of warfarin therapy monitored by the International Normalized Ratio versus the prothrombin time ratio". *Clin. Cardiol.* (1995) **18** ; 80-82

Bates S. M., Greer I. A., Pabinger I., Sofaer S. and Hirsh J.; American College of Chest Physicians "Venous thromboembolism, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)". *Chest.* (2008) **133** (6 Suppl) ; 844S-886S

Bell R. G. and Matschiner J. T. "Vitamin K activity of phyloquinone oxide". *Arch. Biochem. Biophys.* (1970) **141** ; 473-476

Benzakour O., Gely A., Lara R. and Coronas V. « Fonctions nouvelles de Gas-6 et de la protéine S - Facteurs vitamine K-dépendants et ligands des récepteurs tyrosine kinase de la famille TAM ». *Medecine/Sciences* (2007) **23** ; 826-833

Berkner K. L. and Runge K. W. "The physiology of vitamin K nutrition and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis". *J. Thromb. Haemost.* (2004) **2** ; 2118-2132

Berny P., Velardo J., Pulce C., D'amico A., Kammerer M. and Lasseur R. "Prevalence of anticoagulant rodenticide poisoning in humans and animals in France and substances involved". *Clin. Toxicol. (Phila.)*. (2010) **48** ; 935-941

Beulens J. W. J., Bots M. L., Atsma F., Bartelink M-L. E. L., Prokop M., Geleijnse J. M., Witteman J. C. M., Grobbee D. E. and van der Schouw Y. T. "High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification". *Atherosclerosis* (2009) **203** ; 489-493

Bianchet M. A., Erdemli S. B. and Amzel L. M. "Structure, function, and mechanism of cytosolic quinone reductases". *Vitam. Horm.* (2008) **78** ; 63-84.

Binkley N., Krueger D., Engelke J. and Suttie J. "Vitamin K deficiency from long-term warfarin anticoagulation does not alter skeletal status in male rhesus monkeys". *J. Bone Miner. Res.* (2007) **22** ; 695-700

Bodin L. and Lorient M-A. « La pharmacogénétique : application aux anticoagulants oraux ». *Sang Thrombose Vaisseaux* (2003) **15** ; 357-363

Bodin L., Horellou M. H., Flaujac C., Lorient M-A. and Samama M. M. "A vitamin K epoxide reductase complex subunit-1 (VKORC1) mutation in a patient with vitamin K antagonist resistance". *J. Thromb. Haemost.* (2005) **3** ; 1533-1535

Boyle C. "Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* (Berkenhout) to anticoagulant poisons". *Nature* (1960) **188** ; 517-525

Cain D., Hutson S. M. and Wallin R. "Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane". *J. Biol. Chem.* (1997) **272** ; 29068-29075

- Carlquist J. F., Horne B. D., Muhlestein J. B., Lappé D. L., Whiting B. M., Kolek M. J., Clarke J. L., James B. C. and Anderson J. L. "Genotypes of the cytochrome p450 isoform, CYP2C9, and the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 conjointly determine stable warfarin dose: a prospective study". *J. Thromb. Thrombolysis* (2006) **22** ; 191-197
- Chatrou M. L., Reutelingsperger C. P. and Schurgers L. J. "Role of vitamin K-dependent proteins in the arterial vessel wall". *Hamostaseologie* (2011) **31** ; 251-257
- Coutu D. L., Wu J. H., Monette A., Rivard G. E., Blostein M. D. and Galipeau J. "Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells". *J. Biol. Chem.* (2008) **283** ; 17992-18001
- Czogalla K. J., Biswas A., Wendeln A-C., Westhofen P., Müller C. R., Watzka M. and Oldenburg J. "Human VKORC1 mutations cause variable degrees of 4-hydroxycoumarin resistance and effect putative warfarin binding interfaces". *Blood* (2013) **122** ; 2743-2750
- D'Andrea G., D'Ambrosio R. L., Di Perna P., Chetta M., Santacroce R., Brancaccio V., Grandone E. and Margaglione M. "A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin". *Blood* (2005) **105** ; 645-649
- Dam H. "The antihemorrhagic vitamin of the chick. Occurrence and chemical nature". *Nature* (1935) **135** ; 652-653
- Ducy P., Desbois C., Boyce B., Pinero G., Story B., Dunstan C., Smith E., Bonadio J., Goldstein S., Gundberg C., Bradley A. and Karsenty G. "Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice". *Nature* (1996) **382** ; 448-452
- Ernster L., Danielson L. and Ljunggren M. "DT-diaphorase I. Purification from the soluble fraction of rat-liver cytoplasm, and properties". *Biochim. Biophys. Acta.* (1962) **58** ; 171-188
- Esmon C. T., Sadowski J. A. and Suttie J. W. "A new carboxylation reaction. The vitamin K-dependent incorporation of H¹⁴CO₃⁻ into prothrombin". *J. Biol. Chem.* (1975) **250** ; 4744-4748
- Fasco M. J., Preusch P. C., Hildebrandt E. and Suttie J. W. "Formation of hydroxyvitamin K by vitamin K epoxide reductase of warfarin-resistant rats". *J. Biol. Chem.* (1983) **258** ; 4372-4380
- Ferron M., Hinoi E., Karsenty G. and Ducy P. "Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2008) **105** ; 5266-5270
- Franco V., Polanczyk C. A., Clausell N. and Rohde L. E. "Role of dietary vitamin K intake in chronic oral anticoagulation: prospective evidence from observational and randomized protocols". *Am. J. Med.* (2004) **116** ; 651-656
- Furie B. C., Blumenstein M. and Furie B. "Metal binding sites of a gamma-carboxyglutamic acid-rich fragment of bovine prothrombin". *J. Biol. Chem.* (1979) **254** ; 12521-12530
- Furie B., Bouchard B. A. and Furie B. C. "Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid". *Blood* (1999) **93** ; 1798-1808
- Goodstadt L. and Ponting C. P. "Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism". *Trends Biochem. Sci.* (2004) **29** ; 289-292

- Grandemange A., Kohn M. H., Lasseur R., Longin-Sauvageon C., Bery P. and Benoît E. "Consequences of the Y139F *Vkorc1* mutation on resistance to AVKs: in-vivo investigation in a 7th generation of congenic Y139F strain of rats". *Pharmacogenet Genomics*. (2009); **19** ; 742-750
- Grandemange A., Lasseur R., Longin-Sauvageon C., Benoît E. and Bery P. "Distribution of VKORC1 single nucleotide polymorphism in wild *Rattus norvegicus* in France". *Pest. Manag. Sci.* (2010) **66** ; 270-276
- Greaves J. and Ayres P. "Heritable resistance to warfarin in rats". *Nature* (1967) **215** ; 877-878
- Greaves J. and Ayres P. "Multiple allelism at the locus controlling warfarin resistance in the Norway rat". *Gent. Res. Camb.* (1982) **40** ; 59-64
- Greaves J., Buckle A. P. and Smith R. H. "Resistance to anticoagulant rodenticides. Rodent pests and their control". *Cab. International* (1994) 194-217
- Guengerich F. P., Dannan G. A., Wright S. T., Martin M. V. and Kaminsky L. S. "Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or beta-naphthoflavone". *Xenobiotica* (1982) **12** ; 701-716
- Guenther T. M., Cai D., Wallin R. "Co-purification of microsomal epoxide hydrolase with the warfarin-sensitive vitamin K1 oxide reductase of the vitamin K cycle". *Biochem. Pharmacol.* (1998) **55** ; 169-175
- Hatahet F. and Ruddock L. W. "Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation". *Antioxid. Redox Signal.* (2009) **11** ; 2807-2850. *Erratum in: Antioxid. Redox Signal.* (2010) **12** ; 322
- Hara K., Akiyama Y., Nakamura T., Murota S. and Morita I. "The inhibitory effect of vitamin K2 (menatetrenone) on bone resorption may be related to its side chain". *Bone* (1995) **16** ; 179-184
- Hara K., Kobayashi M. and Akiyama Y. "Comparison of inhibitory effects of warfarin on gamma-carboxylation between bone and liver in rats". *J. Bone Miner. Metab.* (2005) **23** ; 366-372
- Higashi M. K., Veenstra D. L., Kondo L. M., Wittkowsky A. K., Srinouanprachanh S. L., Farin F. M. and Rettie A. E. "Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy". *Jama* (2002) **287** ; 1690-1698
- Hodroge A., Longin-Sauvageon C., Fourel I., Benoit E. and Lattard V. "Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants". *Arch. Biochem. Biophys.* (2011) **515** ; 14-20
- Ingram B. O., Turbyfill J. L., Bledsoe P. J., Jaiswal A. K. and Stafford D. W. "Assessment of the contribution of NAD(P)H-dependent quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to the reduction of vitamin K in wild-type and NQO1-deficient mice". *Biochem J.* (2013) **456** ; 47-54
- Ishizuka M., Tanikawa T., Tanaka K. D., Heewon M., Okajima F., Sakamoto K. Q. and Fujita S. "Pesticide resistance in wild mammals. Mechanisms of anticoagulant resistance in wild rodents". *J. Toxicol. Sci.* (2008) **33** ; 283-291

- Jin D-A., Tie J-K. and Stafford D. W. "The conversion of vitamin K epoxide to vitamin K quinone and vitamin K quinone to vitamin K hydroquinone uses the same active site cysteines". *Biochemistry* (2007) **46** ; 7279-7283
- Kéréveur A., Leclercq M., Trossaërt M., Dupeyron J. P., Parent F., Horellou M. H., Conard J., Bachmann F. and Samama M. M. "Vitamin K metabolism in a patient resistant to vitamin K antagonists". *Haemostasis* (1997) **27** ; 168-173
- Knobloch J. E. and Suttie J. W. "Vitamin K-dependent carboxylase. Control of enzyme activity by the "propeptide" region of factor X". *J. Biol. Chem.* (1987) **262** ; 15334-15337
- Kohn M. H. and Pelz H. J. "Genomic assignment of the warfarin resistance locus, *Rw*, in the rat". *Mamm. Genome* (1999) **10** ; 696-698
- Kohn M. and Pelz H. J. "A gene-anchored map position of the rat warfarin-resistance locus, *Rw*, and its orthologs in mice and humans". *Blood* (2000) **96** ; 1996-1997
- Kohn M. H., Pelz H. J. and Wayne R. K. "Locus-specific genetic differentiation at *Rw* among warfarin-resistant rat (*Rattus norvegicus*) populations". *Genetics* (2003) **164** ; 1055-1070
- Koshihara Y., Hoshi K. and Shiraki M. "Vitamin K₂ (menatetrenone) inhibits prostaglandin synthesis in cultured human osteoblast-like periosteal cells by inhibiting prostaglandin H synthase activity". *Biochem. Pharmacol.* (1993) **46** ; 1355-1362
- Kulman J. D., Harris J. E., Haldeman B. A. and Davie E. W. "Primary structure and tissue distribution of two novel proline-rich gamma-carboxyglutamic acid proteins". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1997) **94** ; 9058-9062
- Kulman J. D., Harris J. E., Xie L. and Davie E. W. "Identification of two novel transmembrane gamma-carboxyglutamic acid proteins expressed broadly in fetal and adult tissues". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2001) **98** ; 1370-1375
- Lasseur R., Longin-Sauvageon C., Videmann B., Billeret M., Berny P. and Benoît E. "Warfarin resistance in a French strain of rats". *J. Biochem. Mol. Toxicol.* (2005) **19** ; 379-385
- Lee J. J. and Fasco M. J. "Metabolism of vitamin K and vitamin K 2,3-epoxide via interaction with a common disulfide". *Biochemistry* (1984) **23** ; 2246-2252
- Lee N. K., Sowa H., Hinoi E., Ferron M., Ahn J. D., Confavreux C., Dacquin R., Mee P. J., McKee M. D., Jung D. Y., Zhang Z., Kim J. K., Mauvais-Jarvis F., Ducy P. and Karsenty G. "Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton". *Cell* (2007) **130** ; 456-469
- Lev M. and Milfort A. F. "Effect of vitamin K depletion and restoration on sphingolipid metabolism in *Bacteroides melaninogenicus*". *J. Lipid Res.* (1972) **13** ; 364-370
- Li J., Lin J. C., Wang H., Peterson J. W., Furie B. C., Furie B., Booth S. L., Volpe J. J. and Rosenberg P. A. "Novel role of vitamin K in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons". *J. Neurosci.* (2003) **23** ; 5816-5826
- Li T., Chang C-Y., Jin D-Y., Lin P-J., Khvorova A. and Stafford D. W. "Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase". *Nature* (2004) **427** ; 541-544
- Li W., Schulman S., Dutton R. J., Boyd D., Beckwith J. and Rapoport T. A. "Structure of a bacterial homolog of vitamin K epoxide reductase". *Nature* (2010) **463** ; 507-512

- Lin P-J., Jin D-A., Tie J-K., Presnell S. R., Straight D. L. and Stafford D. W. "The putative vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase internal propeptide appears to be the propeptide binding site" *J. Biol. Chem.* (2002) **32** ; 28584-28591
- Link K. P. "The discovery of dicoumarol and its sequels". *Circulation* (1959) **19** ; 97-107
- Luo G., Ducey P., McKee M. D., Pinero G. J., Loyer E., Behringer R. R. and Karsenty G. "Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein". *Nature* (1997) **386** ; 78-81
- Martin A., Steed L., Redfern R., Gill J. and Huson L. "Warfarin-resistance genotype determination in the Norway rat, *Rattus norvegicus*". *Lab. Anim.* (1979) **13** ; 209-214
- Matagrín B., Hodroge A., Montagut-Romans A., Andru J., Fourel I., Besse E., Benoît E. and Lattard V. "New insights into the catalytic mechanism of vitamin K epoxide reductase (VKORC1). The catalytic properties of the major mutations of rVKORC1 explain the biological cost associated to mutations". *FEBS Open Bio* (2013) **3** ; 144-150
- Moreau C., Siguret V. and Lorient M. A. "The pharmacogenetics of vitamin K antagonists: still a matter for discussion". *Rev. Med. Interne* (2010) **31** ; 361-368
- Mulot C., Stucker I., Clavel J., Beaune P. and Lorient M. A. "Collection of human genomic DNA from buccal cells for genetics studies: comparison between cytobrush, mouthwash, and treated card". *J. Biomed. Biotechnol.* (2005) **2005** ; 291-296.
- Nelsestuen G. L., Zytkevich T. H. and Howard J. B. "The mode of action of vitamin K. Identification of gamma-carboxyglutamic acid as a component of prothrombin". *J. Biol. Chem.* (1974) **249** ; 6347-6350
- Nutescu E. A., Shapiro N. L., Ibrahim S. and West P. "Warfarin and its interactions with foods, herbs and other dietary supplements". *Expert Opin. Drug Saf.* (2006) **5** ; 433-451
- O'Connor J. A. "The use of blood anticoagulants for rodent control". *Research* (1948) **1** ; 334-336
- Oldenburg J., Bevans C. G., Müller C. R. and Watzka M. "Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1): the key protein of the vitamin K cycle". *Antioxid. Redox Signal.* (2006) **8** ; 347-353
- Oury F., Sumara G., Sumara O., Ferron M., Chang H., Smith C. E., Herno L., Suarez S., Roth B. L., Ducey P. and Karsenty G. "Endocrine regulation of male fertility by the skeleton". *Cell* (2011) **144** ; 796-809
- Pelz J., Rost S., Hunerberg M., Fregin A., Heiberg A. C., Baert K., MacNicoll A. D., Prescott C. V., Walker A. S., Oldenburg J. and Müller C. R. "The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents". *Genetics* (2005) **170** ; 1839-1847
- Penning-van Beest F. J., van Meegen E., Rosendaal F. R. and Stricker B. H. "Characteristics of anticoagulant therapy and comorbidity related to overanticoagulation" *J. Thromb. Haemost.* (2001) **86** ; 569-574
- Preusch P. C. "Is thioredoxin the physiological vitamin K epoxide reducing agent?". *FEBS Lett.* (1992) **305** ; 257-259

- Price P. A. and Williamson M. K. "Effects of warfarin on bone". *J. Biol. Chem.* (1981) **256** ; 12754-12759
- Price P. A., Faus S. A. and Williamson M. K. "Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves". *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (1998) **18** ; 1400-1407
- Quick A. J., Stanley-Brown M. and Bancroft F. W. "A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice". *Am. J. Med. Sci.* (1935) **190** ; 501-511
- Rached M. T., Kode A., Silva B. C., Jung D. Y., Gray S., Ong H., Paik J. H., DePinho R. A., Kim J. K., Karsenty G. and Kousteni S. "FoxO1 expression in osteoblasts regulates glucose homeostasis through regulation of osteocalcin in mice". *J. Clin. Invest.* (2010) **120** ; 357-368. *Erratum in J. Clin. Invest.* (2010) **120** ; 932
- Reddi K., Henderson B., Meghji S., Wilson M., Poole S., Hopper C. and Hodges S. J. "Interleukin 6 production by lipopolysaccharide-stimulated human fibroblasts is potently inhibited by naphthoquinone (vitamin K) compounds". *Cytokine* (1995) **7** ; 287-290
- Reedstrom C. K. and Suttie J. W. "Comparative distribution, metabolism, and utilization of phylloquinone and menaquinone-9 in rat liver". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1995) **209** ; 403-409
- Rieder M. J., Reiner A. P., Gage B. F., Nickerson D. A., Eby C. S., McLeod H. L., Blough D. K., Thummel K. E., Veenstra D. L. and Rettie A. E. "Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose". *N. Engl. J. Med.* (2005) **352** ; 2285-2293
- Rishavy M. A., Usabalieva A., Hallgreen K. W. and Berkner L. K. "Novel insight into the mechanism of the vitamin K oxidoreductase (VKOR): Electron relay through Cys43 and Cys51 reduces VKOR to allow vitamin K reduction and facilitation of vitamin K-dependent protein carboxylation". *J. Biol. Chem.* (2010) **286** ; 7267-7278
- Rombouts E. K., Rosendaal F. R. and Van Der Meer F. J. "Daily vitamin K supplementation improves anticoagulant stability". *J. Thromb. Haemost.* (2007) **5** ; 2043-2048
- Rost S., Fregin A., Ivaskevicius V., Conzelmann E., Hörtnagel K., Pelz H. J., Lappegard K., Seifried E., Scharrer I., Tuddenham E. G., Müller C. R., Strom T. M. and Oldenburg J. "Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2". *Nature* (2004) **427** ; 537-541
- Rost S., Fregin A., Hunerberg M., Bevans C., Müller C. and Oldenburg J. "Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1. Evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin". *J. Thromb. Haemost.* (2005) **94** ; 780-786
- Rost S., Pelz H. J., Menzel S., MacNicoll A. D., León V., Song K. J., Jäkel T., Oldenburg J. and Müller C. R. "Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice – a response to 50 years of selection pressure by warfarin?". *BMC Genet.* (2009) **10** ; 4
- Schofield F.W. "Hemorrhagic sweet clover disease in cattle". *Can. Vet. Rec.* (1922) **3** ; 74-75
- Schulman S., Wang B., Li W. and Rapoport T. A. "Vitamin K epoxide reductase prefers ER membrane-anchored thioredoxin-like redox partners". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2010) **107** ; 15027-15032

Schurgers L. J., Shearer M. J., Hamulyák K., Stöcklin E. and Vermeer C. "Effect of vitamin K intake on the stability of oral anticoagulant treatment: dose-response relationships in healthy subjects". *Blood* (2004) **104** ; 2682-2689

Schurgers L. J., Joosen I. A., Laufer E. M., Chatrou M. L. L., Herfs M., Winkens M. H. M., Westenfeld R., Veulemans V., Krueger T., Shanahan C. M., Jahnen-Dechent W., Biessen E., Narula J., Vermeer C, Hofstra L. and Reutelingsperger C. P. "Vitamin K-antagonists accelerate atherosclerotic calcification and induce a vulnerable plaque phenotype". *PLoS One* (2012) **7** ; e43229

Silverman R. B. "A model for a molecular mechanism of anticoagulant activity of 3-substituted 4-hydroxycoumarins". *J. Am. Chem. Soc.* (1980) **102** ; 5421-5423

Silverman R. B. "Chemical model studies for the mechanism of vitamin K epoxide reductase". *J. Am. Chem. Soc.* (1981) **103** ; 5939-5941

Silverman R. B. and Nandi D. L. "Reduced thioredoxin: a possible physiological cofactor for vitamin K epoxide reductase. Further support for an active site disulfide". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1988) **155** ; 1248-1254

Soute B. A., Ulrich M. M., Watson A. D., Maddison J. E., Ebberink R. H. and Vermeer C. "Congenital deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors due to a defective vitamin K-dependent carboxylase in Devon Rex cats". *J. Thromb. Haemost.* (1992) **68** ; 521-525

Spronk H. M., Soute B. A., Schurgers L. J., Thijssen H. H., De Mey J. G. and Vermeer C. "Tissue-specific utilization of menaquinone-4 results in the prevention of arterial calcification in warfarin-treated rats". *J. Vasc. Res.* (2003) **40** ; 531-537

Stafford D. W. "The vitamin K cycle". *J. Thromb. Haemost.* (2005) **3** ; 1873-1878

Stenflo J. "Vitamin K and the biosynthesis of prothrombin. IV. Isolation of peptides containing prosthetic groups from normal prothrombin and the corresponding peptides from dicoumarol-induced prothrombin". *J. Biol. Chem.* (1974) **249** ; 5527-5535

Stenflo J. "Contributions of Gla and EGF-like domains to the function of vitamin K-dependent coagulation factors". *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* (1999) **9** ; 59-88

Stenova E., Steno B., Killinger Z., Baqi L. and Payer J. "Effect of long-term oral anticoagulant therapy on bone mineral density and bone turnover markers: a prospective 12 month study". *Bratisl. Lek. Listy* (2011) **112** ; 71-76

Tai M. M., Furie B. C. and Furie B. "Localization of the metal-induced conformational transition of bovine prothrombin". *J. Biol. Chem.* (1984) **259** ; 4162-4168

Tie J-K., Nicchitta C., von Heijne G. and Stafford D. W. "Membrane topology mapping of vitamin K epoxide reductase by in vitro translation/cotranslation". *J. Thromb. Haemost.* (2005) **3** ; 1873-1878

Tie J-K., Jin D-Y., Tie K. and Stafford D. W. "Evaluation of warfarin resistance using TALENs-mediated vitamin K epoxide reductase knockout HEK293 cells". *J. Biol. Chem.* (2013) **11** ; 1556-1564

Tishler M., Fieser L. and Wendler N. "Hydro, oxydo and other derivatives of vitamin K1 related compounds". *J. Am. Chem. Soc.* (1940) **62** ; 2866-2871

Thomas D. D., Krzykowski K. J., Engelke J. A. and Groblewski G. E. "Exocrine pancreatic secretion of phospholipid, menaquinone-4, and caveolin-1 in vivo". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004) **319** ; 974-979

Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1979) **76** ; 4350-4354

Uno H., Ishikawa J., Hoshide S., Kabutoya T., Ishikawa S., Shimada K. and Kario K. "Effects of strict blood pressure control by a long-acting calcium channel blocker on brain natriuretic peptide and urinary albumin excretion rate in Japanese hypertensive patients". *Hypertens. Res.* (2008) **31** ; 887-896

Van Haarlem L. J., Ulrich M. M., Hemker H. C., Soute B. A. and Vermeer C. "Isolation and partial characterization of a vitamin K-dependent carboxylase from bovine aortae". *Biochem. J.* (1987) **245** ; 251-255

Vasse M. "Protein Z, a protein seeking a pathology". *J. Thromb. Haemost.* (2008) **100** ; 548-556

Veenstra D. L., You J. H., Rieder M. J., Farin F. M., Wilkerson H. W., Blough D. K., Cheng G. and Rettie A. E. "Association of vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) variants with warfarin dose in a Hong Kong Chinese patient population". *Pharmacogenet. Genomics* (2005) **15** ; 687-391

Viegas C. S., Cavaco S., Neves P. L., Ferreira A., João A., Williamson M. K., Price P. A., Cancela M. L. and Simes D. C. "Gla-rich protein is a novel vitamin K-dependent protein present in serum that accumulates at sites of pathological calcifications". *Am. J. Pathol.* (2009) **175** ; 2288-2298

Villines T. C., O'Malley P. G., Feuerstein I. M., Thomas S. and Taylor A. J. "Does prolonged warfarin exposure potentiate coronary calcification in humans? Results of the warfarin and coronary calcification study". *Calcif. Tissue Int.* (2009) **85** ; 494-500

Wadelius M., Chen L. Y., Downes K., Ghori J., Hunt S., Eriksson N., Wallerman O., Melhus H., Wadelius C., Bentley D. and Deloukas P. "Common VKORC1 and GG CX polymorphisms associated with warfarin dose" *Pharmacogenomics J.* (2005) **5** ; 262-270

Wadelius M., Chen L. Y., Eriksson N., Bumpstead S., Ghori J., Wadelius C., Bentley D., McGinnis R. and Deloukas P. "Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism" *Hum. Genet.* (2007) **121** ; 23-34

Wajih N., Hutson S. M. and Wallin R. "Disulfide-dependent protein folding is linked to operation of the vitamin K cycle in the endoplasmic reticulum - A protein disulfide isomerase-VKORC1 redox complex appears to be responsible for vitamin K₁ 2,3-epoxide reduction". *J. Biol. Chem.* (2007) **282** ; 2626-2635

Wallin R., Gebhardt O. and Prydz H. "NAD(P)H dehydrogenase and its role in the vitamin K (2-methyl-3-phytyl-1,4-naphthaquinone)-dependent carboxylation reaction". *Biochem. J.* (1978) **169** ; 95-101

Wallin R. and Hutson S. "Vitamin K-dependent carboxylation. Evidence that at least two microsomal dehydrogenases reduce vitamin K₁ to support carboxylation". *J. Biol. Chem.* (1982) **257** ; 1583-1586

Wallin R., Hutson S. M., Cain D., Sweatt A. and Sane D. C. "A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat" *FASEB J.* (2001) **15** ; 2542-2544

Wallin R. and Hutson S. M. "Warfarin and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system". *Trends Mol. Med.* (2004) **10** ; 299-302

Watzka M., Geisen C., Bevans C. G., Sittinger K., Spohn G., Rost S., Seifried E., Müller C. R. and Oldenburg J. "Thirteen novel VKORC1 mutations associated with oral anticoagulant resistance: Insight into improved patient diagnosis and treatment". *J. Thromb. Haemost.* (2011) **9** ; 109-118

Westhofen P., Watzka M., Marinova M., Hass M., Kirfel G., Müller J. Bevans C. G., Müller C. R. and Oldenburg J. "Human vitamin 2,3-epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) mediates vitamin K-dependent intracellular antioxidant function". *J. Biol. Chem.* (2011) **286** ; 15085-15094

Whitlon D. S., Sadowski J. A. and Suttie J. W. "Mechanism of coumarin action: significance of vitamin K epoxide reductase inhibition". *Biochemistry* (1978) **17** ; 1371-1377

Xie H. G., Prasad H. C., Kim R. B. and Stein C. M. "CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance". *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2002) **54** ; 1257-1270