

Yvette Sultan

## LE GÉNIE GÉNÉTIQUE AU SECOURS DES MALADES QUI SAIGNENT ET QUI THROMBOSENT

### RÉFÉRENCES

1. White GC, Mc Millan CW, Kington HS *et al.* Use of recombinant anti-hemophilic factor in the treatment of two patients with classic hemophilia. *N Engl J Med* 1989 ; 320 : 166-70.
2. Schwartz RS, Abildgaard CF, Aledort LM, *et al.* Human recombinant DNA-derived anti-hemophilic factor (factor VIII) in the treatment of hemophilia A. *N Engl J Med* 1990 ; 323 : 1800-5.
3. Bedner U, Hansen L, Winter D, Comparison of the effect of factor VII prepared from human (pVIIa) and recombinant VIIa (rVIIa) *in vitro* and in rabbits. *Thromb Haemost.* 1987 ; 58 : 270-8.
4. Thim L, Bjoern S, Chistensen M, *et al.* Amino-acid sequence and posttranslational modifications of human factor VIIa from plasma and transfected baby hamster kidney cells. *Biochemistry* 1988 ; 27 : 7785-93.
5. O'Brien DP, Giles AR, Take KM, Vehiar GA. Factor VIII by-passing activity of bovin tissue factor using a canine hemophilic model. *J Clin Invest* 1988 ; 82 : 206-11.
6. Vestraete M, Bernard R, Bory M, *et al.* Randomized trial of intravenous recombinant tissue type plasminogen activator versus intravenous streptokinase in acute myocardial infarction. *Lancet* 1985 ; 22 : 965-9.
7. White HD, Rivers JT, Maslowski AH, *et al.* Effect in intravenous streptokinase as compared with that of tissue plasminogen activator on left ventricular function after first myocardial infarction. *N Engl J Med* 1989 ; 320 : 817-21.
8. Harvey RP, Degryse E, Stefani L, *et al.* Cloning and expression of cDNA coding for the anticoagulant hirudin from the blood suckling leech *hirudo medicinalis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 1084-8.
9. Brown PJ, Juliano RL. Selective inhibition of fibronectin mediated cell adhesion by monoclonal antibodies to a cell surface glycoprotein. *Science* 1985 ; 228 : 1448-51.
10. Haverstick DM, Cowan JF, Yaurada KM, Santoro SA. Inhibition to fibronectin, fibrinogen and von Willebrand factor substrates by a synthetic tetrapeptide derived from the cell binding domain of fibronectin. *Blood* 1985 ; 66 : 946-52.

### ADRESSE ET TIRÉS À PART

Y. Sultan : Centre d'accueil des hémophiles, hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75679 Paris Cedex 14, France.

Les biotechnologies peuvent venir en aide aux patients atteints de maladies hémorragiques ou thrombo-emboliques de différentes façons : (1) en produisant, par génie génétique, de grandes quantités de protéines présentes dans le sang à l'état de trace, dont la purification exige le recours à d'énormes volumes de plasma humain avec un rendement faible et un risque toujours présent de contamination virale ; (2) en imaginant des molécules synthétiques, synergiques ou compétitives avec des facteurs de coagulation particuliers. C'est ainsi que, d'ores et déjà, les biotechnologies créent des produits actifs sur : (a) les maladies héréditaires de la coagulation, en particulier l'hémophilie ; (b) les maladies à manifestations thrombo-emboliques, grâce aux molécules qui permettent d'inactiver les plaquettes, de dynamiser la fibrinolyse ou d'inactiver plus rapidement les enzymes de la coagulation.

**Le facteur VIII.** Le plus intéressant de ces exemples est le facteur VIII ou facteur antihémophilique A. Le taux plasmatique est inférieur à 100 ng/ml et le facteur VIII est extrêmement sensible à la dégradation enzymatique ; de très grands volumes de plasma sont donc nécessaires pour fournir les quantités indispensables au traitement des hémophiles.

Le rendement de purification du facteur VIII est à peine de 15 %, et ce rendement est d'autant plus faible que la purification est plus poussée.

Aujourd'hui seulement 20 % des hémophiles ont accès à un traitement satisfaisant, alors qu'il suffirait de 4 kg de facteur VIII par an pour permettre aux hémophiles de la planète d'être traités correctement.

Des préparations de facteur VIII fabriqué par génie génétique sont déjà utilisées chez les hémophiles. Depuis 1988, les très petites quantités synthétisées au début du développement des techniques ont permis de traiter deux hémophiles pendant plus d'un an. Aujourd'hui, plusieurs centaines d'hémophiles, dont des cohortes de nouveau-nés, reçoivent ces produits et deux préparations commerciales attendent l'autorisation d'être mises sur le marché [1, 2]. Ces préparations reproduisent aussi fidèlement que possible la molécule native synthétisée par la cellule humaine. Les difficultés sont grandes car la molécule de facteur VIII est une grosse molécule de 340 kDa et les mécanismes de sécrétion sont difficiles à mettre au point.

Les résultats des essais cliniques sont très encourageants. Ces préparations de facteur VIII recombinant sont aussi efficaces et aussi bien tolérées que les concentrés provenant du plasma humain ; aucun effet indésirable n'a été observé. Le facteur VIII recombinant ne semble pas avoir une immunogénicité plus grande que les dérivés plasmatiques. Cependant, le coût de ce médicament sera très élevé et l'espoir de synthétiser des kilos pour l'ensemble de la planète n'est pas pour demain. Il pourrait être moins onéreux et plus facile, de synthétiser une molécule plus petite qui comporterait le site actif de facteur VIII.

N. Bihoreau (*p. 1043 de ce numéro*) décrit une de ces molécules de deuxième génération débarrassée du domaine B du facteur VIII (1000 AA) qui semble ne pas avoir d'action dans la coagulation. La molécule synthétisée comporte les deux chaînes du facteur VIII qui interviennent dans l'interaction du facteur IXa avec le facteur X et les phospholipides. Le point d'interrogation est l'accueil que le système immunitaire humain va faire à cette molécule. Substantiellement différente de la molécule native, va-t-elle donner lieu à la synthèse d'anticorps neutralisants ? Seuls les essais cliniques nous le diront.

**Le facteur VII.** Une firme commerciale danoise s'est lancée dans la synthèse par génie génétique de facteur VII activé [3]. Élément clé de la coagulation à point de

départ tissulaire, le facteur VII associé au facteur tissulaire (FT) (facteur ubiquitaire présent dans la plupart des tissus de l'organisme), forme un complexe provoquant l'activation du facteur X, puis la formation de la thrombine, entraînant ainsi la coagulation du fibrinogène par une voie efficace et rapide.

L'idée de la préparation de cette molécule était de venir en aide aux patients hémophiles ou non hémophiles ayant développé un anticorps neutralisant contre le facteur VIII. Ce facteur VIIa en provoquant la coagulation d'origine tissulaire pourrait favoriser un court-circuit des facteurs anti-hémophiliques. L'arrière-pensée est plus ambitieuse : si la voie de la coagulation tissulaire joue un rôle aussi important que le suggèrent certaines équipes, pourquoi ne pas oublier la voie longue de la coagulation et les facteurs anti-hémophiliques ? Il se pourrait que les hémophiles, même sans inhibiteurs, puissent rétablir leur coagulation par un excès de facteur VIIa, molécule simple, prête à se lier au facteur tissulaire sur le terrain même de l'hémorragie [4].

**Facteur tissulaire.** Le facteur tissulaire (FT) lui-même est une molécule omniprésente en quantité plus ou moins importante dans tous les tissus de l'organisme sous forme d'une glycoprotéine transmembranaire. Son association avec les phospholipides de la membrane permet la formation d'un complexe appelé thromboplastine. Cet ensemble membrane-facteur tissulaire est capable de s'associer au facteur VIIa venu du sang pour former un autre complexe FT/FVIIa qui déclenche très rapidement la coagulation par la voie courte du facteur X. La partie extramembranaire du facteur tissulaire a été synthétisée par génie génétique et cette molécule rendue soluble représente également une possibilité de rétablir la coagulation chez les sujets ayant développé des inhibiteurs contre les facteurs de coagulation. Mais la partie extramembranaire synthétisée est dépourvue de phospholipides. Ses fonctions sont, de ce fait, différentes de celles de la « thromboplastine » (élément tissulaire) dans la coagulation chez l'homme.

Les premiers essais animaux sont, en fait, décevants. Dépourvue de phospholipides, la molécule synthétisée perd beaucoup de son efficacité, mais son amélioration fonctionnelle est envisageable [5].

**L'activateur du plasminogène.** Certaines molécules clés de l'hémostase sont en quantité si faible dans le plasma que leur purification à partir du sang n'a jamais pu être réalisée. C'est le cas des activateurs du plasminogène, éléments fondamentaux du système fibrinolytique. L'activateur tis-

sulaire du plasminogène (tPA) est synthétisé par les cellules endothéliales, libéré dans le sang et très rapidement métabolisé par le foie.

Pour obtenir un médicament, on eut d'abord recours à la purification à partir d'un surnageant de culture de cellules de mélanome. Dès 1983, le tPA recombinant (rtPA) entrainé dans des essais cliniques comme agent thrombolytique [6, 7]. En 1989, une très importante étude clinique démontrait qu'il n'y avait pas une significative supériorité du tPA sur la streptokinase (SK) pour l'induction des traitements thrombolytiques. Le tPA agit localement après fixation sur la fibrine et on s'attendait à une plus grande efficacité et à une diminution des complications hémorragiques observées avec les traitements par la streptokinase (SK). Il fut démontré que le rtPA n'était pas supérieur à la SK, ni dans la récupération de la fonction ventriculaire, ni dans la mortalité et qu'il n'y avait pas de réduction du nombre des accidents hémorragiques (*m/s n° 7, vol. 8, p. 735*). En revanche, le traitement de l'infarctus du myocarde par le rtPA est 20 fois plus cher que le traitement par la SK. Même si le rtPA présente des avantages, en particulier le fait qu'il ne provoque pas l'apparition d'anticorps comme la SK, le coût est une véritable limite à son utilisation.

**L'hirudine.** Les propriétés anticoagulantes de la salive des sangsues sont connues depuis un siècle. Récemment purifiée et caractérisée l'hirudine est l'inhibiteur de la thrombine le plus puissant que nous connaissions [8].

Il existe plusieurs hirudines recombinantes sur le marché. La synthèse de cette molécule polypeptidique est facilitée par la petite taille (65 acides aminés, 7 000 daltons). Les résultats sur la coagulation intravasculaire disséminée ou les thromboses animales sont très encourageants. Chez l'homme, l'utilisation clinique est limitée par l'absence d'antidote connue et les risques de complications hémorragiques d'allergie ou de réaction immunologique n'ont pas encore été appréciés. Il se pourrait pourtant que l'hirudine fût un anticoagulant plus puissant que l'héparine, d'autant qu'elle est indépendante de l'antithrombine III.

**Les molécules originales.** A côté des agents thrombolytiques que nous venons de citer, la recherche dans le domaine des médicaments pour lutter contre les thromboses a provoqué l'imagination des chercheurs. L'inhibition des principales fonctions plaquettaires, l'adhérence et l'agrégation fait appel à des principes plus élaborés et plus risqués. Une bonne connaissance de la relation structure-fonction est

nécessaire pour cibler l'effet du produit à fabriquer.

Pour inhiber une fonction portée par une partie restreinte de la molécule dont la séquence est bien définie, les anticorps monoclonaux dirigés contre ce site étaient tout désignés [9].

Des batteries d'anticorps monoclonaux reconnaissant des séquences de glycoprotéines de membrane des plaquettes GPIIb, GPIX et GPIIb-IIIa ont été fabriquées [9]. Certains d'entre eux ont, *in vitro*, des propriétés d'inhibition de l'adhérence ou de l'agrégation tout à fait reproductibles, voire même des activités inhibitrices *in vivo* sur des modèles animaux, mais l'introduction chez l'homme d'immunoglobulines de souris pose cependant encore des problèmes.

Une nouvelle génération de produits est représentée par les fragments polypeptidiques reproduisant la séquence du site à inhiber [10]. C'est ce qui nous est proposé par A. Schreiber *et al.* (*p. 1036 de ce numéro*).

Il est possible de bloquer un récepteur, par exemple les glycoprotéines de la membrane plaquettaire, par un motif peptidique synthétique qui reproduit la structure exacte du site d'attache du ligand à cette glycoprotéine. Ces petites molécules, qui pourraient ne pas déclencher de réaction immunologique, agissent par compétition avec le ligand physiologique pour l'interaction avec le récepteur.

A. Schreiber *et al.* ont-ils synthétisé un peptide de 15 acides aminés reproduisant le site de liaison du facteur von Willebrand avec la GPIIb de la membrane plaquettaire. Cette séquence se retrouve deux fois dans la molécule de facteur von Willebrand, entre les acides aminés 449 et 728. *In vitro*, ce fragment inhibe l'adhérence des plaquettes aux surfaces recouvertes de collagène ou de matrice extracellulaire et inhibe l'agglutination des plaquettes en présence de ristocétine. Il semble efficace dans des modèles de thrombose artérielle chez l'animal. Cependant, tous les animaux ont développé des anticorps contre ce peptide et nul ne connaît les conséquences, à plus ou moins long terme, d'anticorps qui pourraient reconnaître la molécule de facteur von Willebrand circulant.

En conclusion, l'avenir de ces molécules synthétiques ou recombinantes différentes des facteurs normaux ne dépend pas seulement de leur efficacité dans des systèmes expérimentaux, mais aussi de leur tolérance immunologique appréciée grâce à des essais cliniques dont la réalisation peut poser de délicats problèmes éthiques.

De plus, le rapport coût/efficacité de ces nouveaux produits est un paramètre sur lequel il n'est pas possible de faire l'impasse ■