

Le facteur VIII (anti-hémophilique A) recombinant : relation structure/fonction

Le facteur VIII, cofacteur glycoprotéique de la coagulation plasmatique, est absent ou non fonctionnel chez les hémophiles de type A. Il est synthétisé sous la forme d'un précurseur de 330 kDa rapidement clivé pour donner une molécule bicaténaire formée d'une chaîne lourde de 220 kDa et d'une chaîne légère de 80 kDa liant le facteur von Willebrand. La partie carboxyterminale de la chaîne lourde (domaine B) peut être variablement clivée sans que l'activité procoagulante soit affectée, ce qui signifie que ce domaine n'est pas indispensable à l'activité du facteur VIII. L'activation biologique est la conséquence de coupures des chaînes lourdes et légères par la thrombine, aboutissant à un trimère actif libéré de son association avec le facteur von Willebrand. Cette forme est sensible à la digestion par la protéine C activée qui, clivant la partie aminotermine de la chaîne lourde, inactive le facteur VIII. Des formes complètes ou dépourvues du domaine B du facteur VIII ont été préparées par génie génétique. Ces produits font actuellement l'objet d'essais cliniques ou précliniques.

Nicolas Bihoreau

ADRESSE ET TIRÉS À PART

N. Bihoreau : docteur de l'université Paris XI Orsay, responsable du laboratoire de biochimie analytique : département de recherche et développement en biotechnologie. T.M. Innovation, 3, avenue des Tropiques, 91943 Les Ulis, France.

m/s n° 10 vol. 8, décembre 92

L' hémophilie A est la conséquence de l'absence ou d'un dysfonctionnement d'un cofacteur de la cascade de la coagulation : le facteur VIII.

Le facteur VIII dans la cascade de la coagulation

Cette cascade correspond à une suite de réactions enzymatiques, contrôlées par de nombreuses activations et inhibitions (figure 1, p. 1044). Une de ces réactions est la protéolyse du fac-

teur X en facteur Xa, qui fait intervenir un complexe comprenant l'enzyme (le facteur IXa), un cofacteur (le facteur VIII activé), des ions calcium et des phospholipides. Cette activation du facteur X est accélérée environ 200 000 fois par la présence du facteur VIII, préalablement activé par la thrombine, le facteur Xa ou le facteur IXa. Le facteur Xa ainsi formé coupe la prothrombine en thrombine en présence du cofacteur Va (homologue structural du facteur VIII). La thrombine (ou facteur IIa) va transformer à son tour le fibrino-

RÉFÉRENCES

- Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, *et al.* Molecular cloning of cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* 1984 ; 312 : 343-7.
- Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, *et al.* Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 1984 ; 312 : 330-7.
- Kaufman RJ, Wasley LC, Dorner AJ. Synthesis, processing and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 6352-62.
- Dorner AJ, Bole DG, Kaufman RJ. The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *J Cell Biol* 1987 ; 105 : 2665-74.
- Vehar GA, Keyt B, Eaton DL, *et al.* Structure of human factor VIII. *Nature* 1984 ; 312 : 337-42.
- Kane WH, Davie EW. Blood coagulation factor V and VIII : structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood* 1988 ; 71 : 539-55.
- Hornsey VS, Griffin BD, Pepper DS, Miclem LR, Prowse CV. Immunoaffinity purification of factor VIII complex. *Thromb Haemost* 1987 ; 57 : 102-5.
- Mejan O, Fert V, Delezay M, Delaage M, Cheballah R, Bourgeois A. Immunopurification of human FVIII/vWf complex from plasma. *Thromb Haemost* 1988 ; 59 : 364-71.
- Zimmerman TS. Purification of factor VIII by monoclonal antibody affinity chromatography. *Semin Hematol* 1988 ; 1 : 25-6.
- Fay PJ, Anderson MT, Chavin SI, Marder VJ. The size of human factor VIII heterodimers and the effect produced by thrombin. *Biochim Biophys Acta* 1986 ; 871 : 268-78.
- Andersson LO, Forsman N, Huang K, *et al.* Isolation and characterization of human factor VIII : molecular forms in commercial factor VIII concentrate, cryoprecipitate and plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 2979-83.

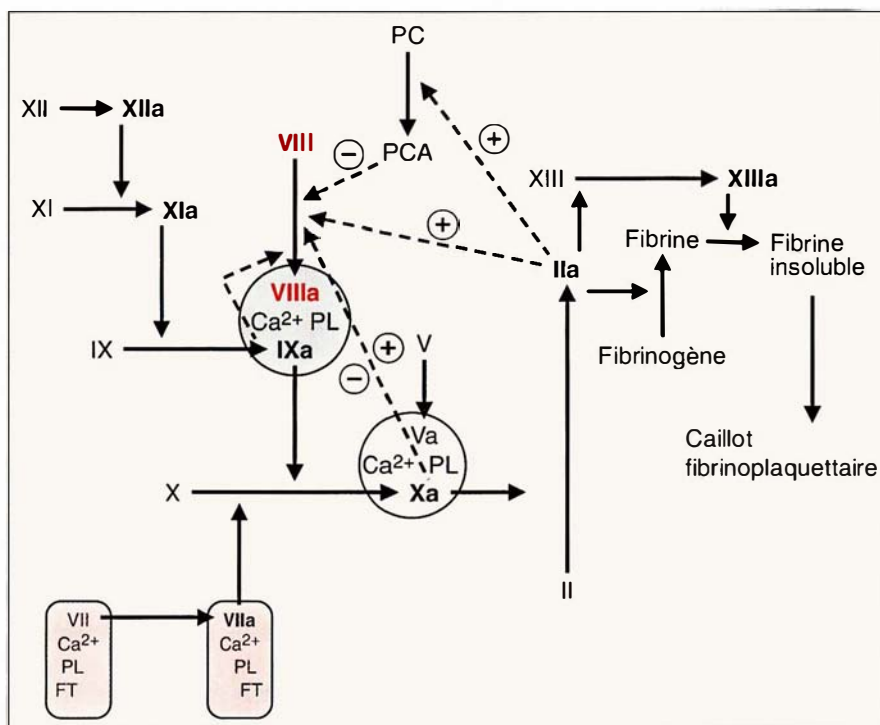


Figure 1. **Schéma simplifié de la coagulation.** La coagulation comprend plusieurs étapes de conversion d'un zymogène (facteurs XI, XII, VII, etc.) en enzyme active (caractérisée par l'indice « a »). Certaines réactions sont accélérées en présence de cofacteurs (facteurs Va ou VIIIa), de phospholipides (PL) et d'ions calcium (Ca^{2+}). Les mécanismes d'activation \oplus et d'inactivation \ominus sont représentés (\dashrightarrow). FT : facteur tissulaire, PCA : protéine C activée.

gène en fibrine et activer le facteur XIII qui lui-même stabilise la fibrine. Les autres substrats de la thrombine sont des inhibiteurs de la coagulation comme la protéine C, qui, sous forme activée, intervient dans l'inactivation du facteur VIII. Enfin, les monomères de fibrine vont former, en liaison avec le facteur XIIIa, un réseau englobant les plaquettes. Ce caillot fibrinoplaquettaire arrête le saignement en bouchant la brèche vasculaire.

Synthèse du facteur VIII

Le facteur VIII est essentiellement synthétisé dans les cellules hépatiques bien que de l'ARNm de facteur VIII ait été détecté dans d'autres tissus. Le clonage et l'expression de l'ADNc du facteur VIII [1, 2] dans des cellules de mammifère ont permis de proposer un mécanisme de biosynthèse et de maturation de la protéine [3].

L'ADNc code pour un polypeptide de 2351 acides aminés qui perdrait son peptide signal de 19 acides aminés au cours du passage dans le réticulum endoplasmique, où s'effectuerait par ailleurs la glycosylation. Une fraction du facteur VIII fixé à des protéines du réticulum endoplasmique, les BiP (*binding protein*, [4]), serait dégradée. L'autre partie transiterait vers le Golgi où s'effectueraient, d'une part, les modifications post-traductionnelles (addition des ions sulfates aux résidus tyrosines et des carbohydrates aux acides aminés sérine et thréonine) et, d'autre part, la coupure de la protéine de 330 kDa en une chaîne légère de 80 kDa et une chaîne lourde de 210 kDa. La formation de complexes actifs dépendrait de la présence du facteur von Willebrand qui associe les deux chaînes libres. En son absence, les chaînes lourde et légère du facteur VIII non associées seraient sécrétées et dégradées [3].

Structure du facteur VIII

L'analyse de la séquence en acides aminés, déduite de l'ADNc humain, a montré que le facteur VIII est constitué de trois domaines structuraux différents : A, B et C. Le domaine A, de 330 acides aminés, est présent en trois exemplaires ; la région B, unique, possède 983 acides aminés ; et les deux domaines C contenant 150 acides aminés sont situés dans la partie carboxyterminale du facteur VIII. Ces différents domaines sont arrangés suivant l'ordre A1-A2-B-A3-C1-C2 (figure 2) [5]. Les domaines A ont entre eux 30 % d'homologie alors que les domaines C ont entre eux 40 % d'homologie. Le facteur VIII possède 23 résidus cystéines dont 19 sont répartis dans les domaines A et C à des positions identiques d'un domaine homologue à l'autre, ce qui suggère la formation de ponts disulfures équivalents dans chacun de ces domaines.

Il existe également 30 % d'homologie entre les domaines A du facteur V [6] et du facteur VIII. Le domaine B n'a pas d'homologie connue avec d'autres protéines. Il possède 19 sites potentiels de glycosylation sur les 25 identifiés pour le facteur VIII. Le domaine C présente une homologie avec des lectines capables de se lier aux phospholipides chargés négativement.

Le facteur VIII est présent dans le plasma en faible concentration (0,1 µg/g/ml) et est coupé par de nombreuses sérine protéases. Ces caractéristiques ont rendu difficile la purification de cette protéine. Le facteur VIII a été purifié par de nombreuses techniques et récemment grâce à des méthodes d'immunopurification [7-9]. Celles-ci permettent, en une seule étape, de piéger les différentes formes de facteur VIII actif pour obtenir, avec un rendement élevé, un produit de haute activité spécifique et forte concentration. A partir du produit immunopurifié, différents complexes actifs de facteur VIII ont été séparés et caractérisés [10, 11]. Ce sont des formes bicaténaires ayant en commun une chaîne de 80 kDa (chaîne légère) et dont l'autre chaîne (chaîne lourde) peut avoir un poids moléculaire compris entre 210 et 90 kDa (figure 2). Les

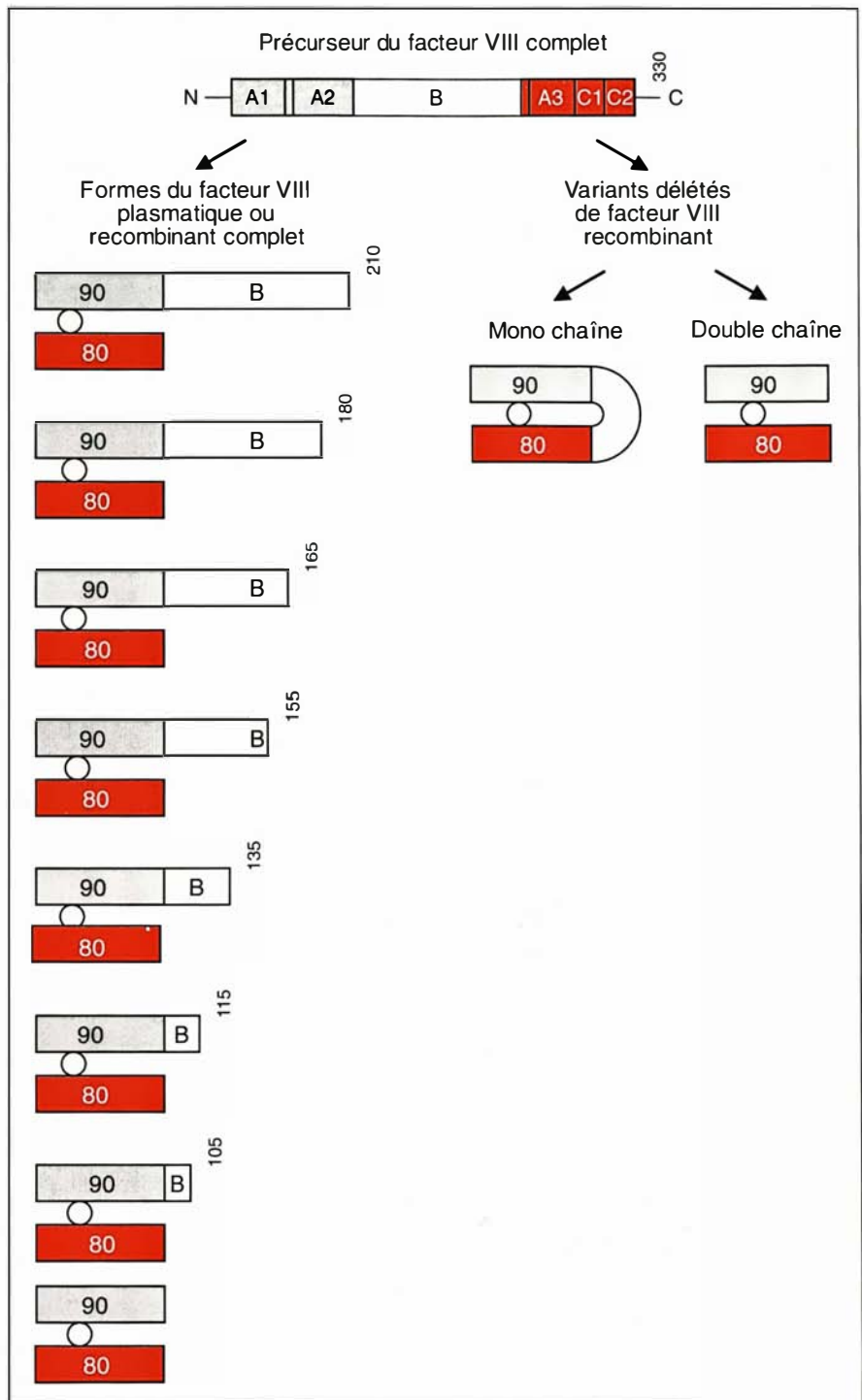


Figure 2. **Les différentes formes du facteur VIII.** Le facteur VIII complet, de 330 kDa, comprend trois domaines A, B et C. Les différents dimères de facteur VIII, dont la région B est plus ou moins protéolysée, correspondent à l'association d'une chaîne lourde (de 210 à 90 kDa) avec une chaîne légère (de 80 kDa), par un cation divalent (○).

RÉFÉRENCES

12. Nordfang O, Ezban M, Hansen JJ. FVIII subunits : purification and antigenic properties. *Thromb Haemost* 1987 ; 58 : 1043-8.
13. Nordfang O, Ezban M. Generation of active coagulation factor VIII from isolated subunits. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 1115-8.
14. Fay PJ. Thrombin-activated factor VIIIa is composed of a non covalent 73/51 Kd dimer. *Thromb Haemost* 1987 ; 58 : 343 (abstr 1241).
15. Lollar P, Parker CG. Subunits structure of thrombin-activated porcine factor VIII. *Biochemistry* 1989 ; 28 : 666-74.
16. Eaton DL, Wood WI, Eaton D, *et al.* Construction and characterization of an active factor VIII lacking the central one third of the molecule. *Biochemistry* 1986 ; 25 : 8343-7.
17. Toole JJ, Pittman DD, Orr EC, Murtha P, Wasley LC, Kaufman RJ. A large region (= 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for *in vitro* procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 5939-42.
18. Brinkhous KM, Sandberg H, Garris JB, *et al.* Purified human factor VIII procoagulant protein : comparative hemostatic response after infusions into hemophilic and von Willebrand disease dogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 ; 82 : 8752-6.
19. Pittman DD, Kaufman RJ. Proteolytic requirements for thrombin activation of anti-hemophilic factor (factor VIII). *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 2429-33.
20. Gitshier J, Kogan S, Levinson B, Tud-denham, EGD. Mutations of factor VIII cleavage sites in hemophilia A. *Blood* 1988 ; 72 : 1022-8.
21. Fay PJ, Haidaris PJ, Smudzin TM. Reconstitution of factor VIIIa from the isolated A1/A3-C1-C2 dimer and the A2 subunit. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 8957-62.
22. Foster PA, Fulcher CA, Houghten RA, Mahoney SG, Zimmerman TS. Localization of the binding regions of a murine monoclonal anti-factor VIII antibody and a human anti-factor VIII alloantibody, both of which inhibit factor VIII procoagulant activity, to aminoacid residues Thr³⁵¹.Ser³⁶⁵ of the factor VIII heavy chain. *J Clin Invest* 1988 ; 82 : 123-8.
- protéases responsables du clivage du facteur VIII en deux chaînes lourde et légère et du clivage progressif de la région B n'ont pas été identifiées à ce jour. Les séquences N-terminales des différentes chaînes lourdes étant identiques [11], celles-ci sont issues de la dégradation progressive de l'extrémité C-terminale de la chaîne lourde de 210 kDa (figure 2).
- L'association entre les chaînes lourde et légère du facteur VIII, qui est indispensable à l'activité coagulante [12], se fait par l'intermédiaire d'un ion divalent. La nature de cet ion est inconnue à ce jour. L'activité coagulante est restaurée si les deux chaînes du facteur VIII sont mises en présence d'ions Mn²⁺ ou Ca²⁺ [13]. Ces mêmes ions sont indispensables à la réassociation des fragments isolés du facteur V, homologue structural du facteur VIII. Les sites exacts d'interaction du facteur VIII avec les ions divalents ne sont pas connus précisément. Cependant, l'identification de complexes de faible poids moléculaire, de 70-50 kDa, suppose que l'ion divalent associe les sous-domaines homologues A1 et A3 [14].

Rôle de la région B

De multiples arguments prouvent que la région B n'est pas nécessaire à l'activité procoagulante du facteur VIII. La comparaison des séquences en acides aminés entre les facteurs VIII humain et porcin fait apparaître des différences majeures au niveau de cette région B [15]. Le facteur VIII porcin est néanmoins utilisé efficacement pour le traitement de l'hémophilie A, en substitution du facteur VIII humain, chez les hémophiles ayant des inhibiteurs.

Des protéines recombinantes, obtenues à partir de l'ADNc de facteur VIII délété de la partie codante pour la région B, se sont révélées aussi actives que la molécule de facteur VIII complète [16, 17]. De plus, toutes les formes bicaténaires naturelles (figure 2) contenant tout ou partie de cette région sont également actives. Brinkous *et al.* [18] ont montré, chez le chien hémophile, que les complexes actifs de 90-80 kDa, sans région B, avaient un temps de demi-vie plus long que le facteur VIII plasmatique avec région B. Cette différence de

stabilité serait due à une fixation préférentielle du facteur VIII sans région B à sa protéine porteuse : le facteur von Willebrand. Par ailleurs, la thrombine active *in vitro* plus rapidement les variants délétés de la région B que le facteur VIII recombinant complet [16]. Ces observations confirment l'influence de la région B dans le processus d'activation du facteur VIII par la thrombine. Ce domaine B n'est donc pas indispensable à l'activité procoagulante mais contrôlerait l'action d'effecteurs de la cascade de la coagulation.

Activation et inactivation

Plusieurs protéines interviennent dans la régulation de l'action du facteur VIII. Celui-ci est, d'une part, activé par la thrombine, le facteur Xa et le facteur IXa, et, d'autre part, inactivé par la protéine C activée. Eaton *et al.* [16] ont démontré que l'augmentation brutale de l'activité coagulante observée après action de la thrombine était liée à la protéolyse de la chaîne légère et de la chaîne lourde du facteur VIII pour former le complexe activé de 70-50-45 kDa (figure 3).

Pittman *et al.* [19] ont déterminé, par mutagenèse dirigée, les sites de clivage du facteur VIII par la thrombine. La mutation des arginines en position 740 et 1648 (figure 3) par des isoleucines empêche la protéolyse, qui engendre les polypeptides de 90 et 80 kDa, sans altérer l'activation *in vitro*. Cela démontre que la coupure de la région B n'est pas une étape préalable à l'activation du facteur VIII. En revanche, lorsque les sites 372 et 1689 du facteur VIII sont mutés [18], le variant n'est plus protéolysé par la thrombine au niveau des sites modifiés et il n'est pas activable, *in vitro*, par cet effecteur. Ces dernières coupures sont donc indispensables pour l'activation du facteur VIII. De plus, si un seul de ces deux sites est modifié, l'activation n'a toujours pas lieu, ce qui suggère un processus de clivage non séquentiel lors de l'activation pour former le complexe de 70-50-45 kDa.

Enfin, l'hémophilie sévère observée chez certains patients dont la structure du facteur VIII diffère par une substitution de l'arginine 1689 en cystéine [20] ou de l'arginine 372 en

histidine, confirme l'importance de ces sites de clivage pour l'activité du facteur antihémophilique A *in vivo*. La figure 3 montre que la thrombine et le facteur Xa coupent les chaînes lourdes du facteur VIII après l'arginine 740 pour engendrer un polypep-

tide de 90 kDa lui-même protéolysé, après le résidu 372, en deux fragments de 50 et 45 kDa. Le polypeptide de 50 kDa correspond à l'extrémité N-terminale de la protéine. La chaîne légère du facteur VIII de 80 kDa est clivée en position 1689

par la thrombine et le facteur Xa pour engendrer une protéine de 70 kDa.

Après formation du complexe activé de 70-50-45 kDa, la phase d'inactivation observée à la suite du contact prolongé avec la thrombine est indépendante de cette protéase et correspondrait plutôt à une dissociation du complexe en un dimère de 70-50 kDa et un fragment de 45 kDa (figure 3).

Le facteur Xa modifie aussi les formes activées en protéolysant les polypeptides de 70 et 50 kDa en deux fragments de, respectivement, 67 et 45 kDa. Ces clivages entraînent une diminution brutale de l'activité procoagulante. La protéine C activée se lie à la chaîne légère du facteur VIII pour couper uniquement la chaîne lourde, après les résidus 740 et 336. La mutation ponctuelle de l'arginine 336 en lysine ou isoleucine provoque une inhibition de l'inactivation par la protéine C activée [18]. Ce clivage, qui aboutit après dissociation du fragment A1/A3-C1-C2, correspond à l'inactivation du facteur VIII (figure 4, p. 1048). Un trimère actif peut être reconstitué à partir des deux formes inactives A1/A3-C1-C2 et A2 [21].

La figure 4 montre que les résidus Arg 336 et 372 sont impliqués dans l'activation et l'inactivation du facteur VIII. La région comprise entre ces deux résidus, qui contient 15 résidus acides aspartique et glutamique pour seulement quatre résidus lysine et arginine, doit donc jouer un rôle fonctionnel important [22]. De même, la partie N-terminale de la chaîne légère du facteur VIII correspond à une région très acide (avec également 15 résidus acides aspartique et glutamique pour quatre résidus lysine et arginine). La protéolyse du polypeptide de 80 kDa par la thrombine et le facteur Xa après la sérine 1689 permet de libérer ce fragment acide. Cette deuxième région acide a également un rôle fonctionnel important puisqu'elle intervient dans la liaison du facteur VIII au facteur von Willebrand (figure 4).

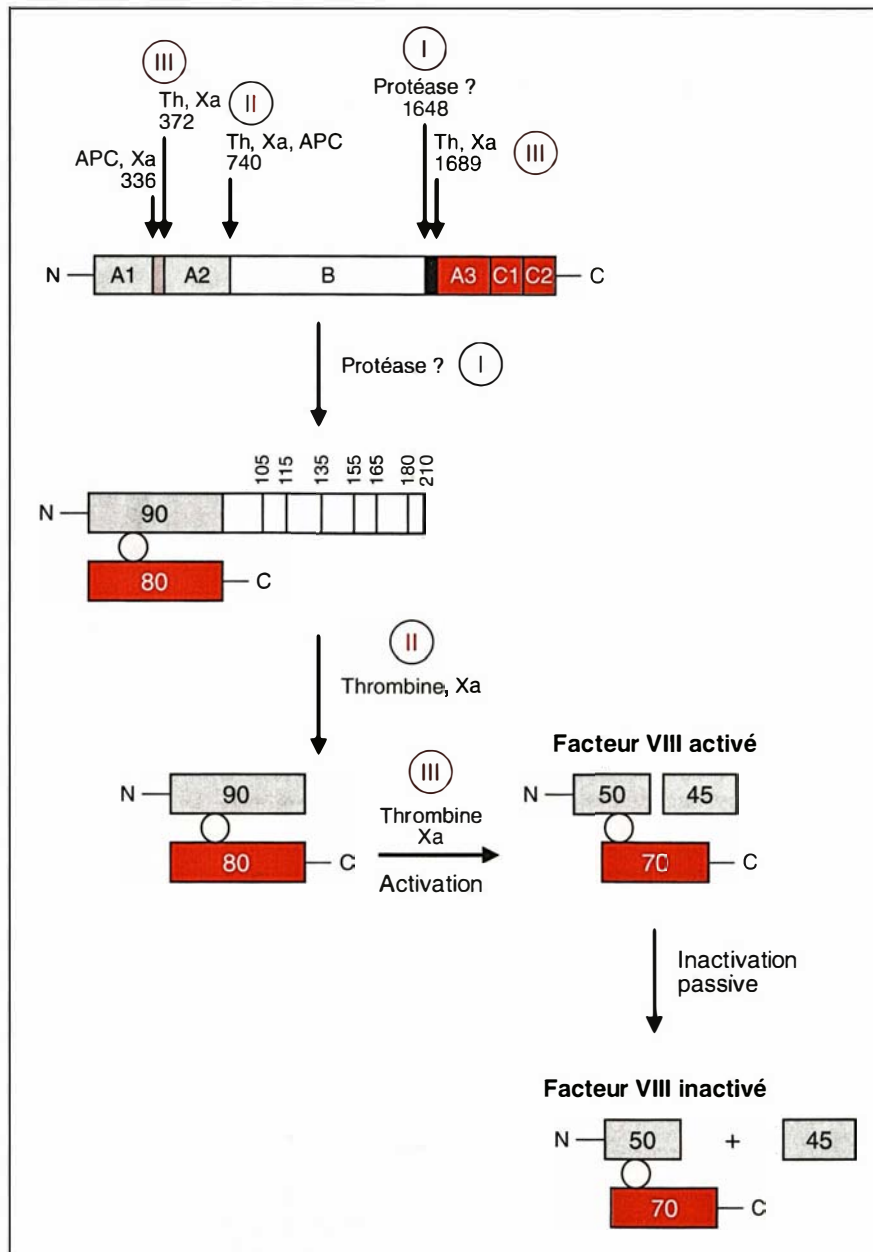


Figure 3. **Activation par la thrombine ou le facteur Xa.** Les sites de clivage de la thrombine (Th) et du facteur Xa (Xa) sont indiqués (⇨). (I) Protéolyse en position 1689 par une protéase inconnue (?). (II) Protéolyse de la région B après le résidu Arg740 pour former le dimère de 90-80 kDa de chaînes lourde et légère associées par le cation divalent (○). (III) Activation par la thrombine ou le facteur Xa par protéolyse du facteur VIII après l'Arg 372. Les masses moléculaires des fragments qui constituent le facteur VIII activé sont représentés en kDa. L'inactivation passive correspond à la dissociation du fragment C terminal de 45 kDa du complexe activé.

Le facteur von Willebrand

Le facteur VIII est stabilisé par l'association avec une autre glycoprotéine plasmatique, le facteur von Wil-

RÉFÉRENCES

23. Fay PJ. Reconstitution of human factor VIII from isolated subunits. *Arch Biochem Biophys* 1988 ; 262 : 525-31.

24. Giles AR, Tinlin S, Hoogendoorn H, Fournel MA, Ng P, Pancham N. *In vivo* characterization of recombinant factor VIII in a canine model hemophilia A (factor VIII deficiency). *Blood* 1988 ; 72 : 335-9.

25. Meulien P, Faure T, Mischler F, *et al.* A new recombinant procoagulant protein derived from the cDNA encoding human factor VIII. *Prot Eng* 1988 ; 2 : 301-6.

26. Foster PA, Fulcher CA, Houghten RA, Zimmerman TS. An immunogenic region within residues Val¹⁶⁷⁰-Glu¹⁶⁸⁴ of the factor VIII light chain induces antibodies which inhibit binding of factor VIII to von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 5230-4.

27. Hamer RJ, Koedam JA, Beeser-Visser NH, Sixma JJ. The effect of thrombin on the complex between factor VIII and von Willebrand factor. *Eur J Biochem* 1987 ; 167 : 253-9.

28. Leyte A, van Schijndel HB, Niehrs C. Sulfation of Tyr¹⁶⁸⁰ of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 740-6.

29. Lollar P, Hill-Eubanks DC, Parker CG. Association of the factor VIII light chain with von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 10451-5.

30. Hill-Eubanks DC, Parker CG, Lollar P. Differential proteolytic activation of factor VIII-von Willebrand factor complex by thrombin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 6508-12.

31. Bihoreau N, Paolantonacci P, Bardelle C, *et al.* Structural and functional characterization of factor VIII- Δ II, a new recombinant factor VIII lacking most of the B domain. *Biochem J* 1991 ; 277 : 23-31.

32. Krishnan S, Kolbe HVJ, Lepage P, *et al.* Thrombin cleavage analysis of a novel antihemophilic factor variant, factor VIII- Δ II. *Eur J Biochem* 1991 ; 195 : 637-44.

lebrand. L'expression de facteur VIII recombinant dans des cellules de mammifères a montré que la protéine synthétisée en absence de facteur von Willebrand est sécrétée sous forme de deux chaînes séparées, très exposées aux attaques enzymatiques. Son rôle dans l'association des chaînes légère

et lourde du facteur VIII pour former un complexe actif a été confirmé par des expériences de réassociation *in vitro* des différentes chaînes libres [23].

Une étude réalisée *in vivo* [24] sur des chiens hémophiles après injection de facteur VIII recombinant complet ou

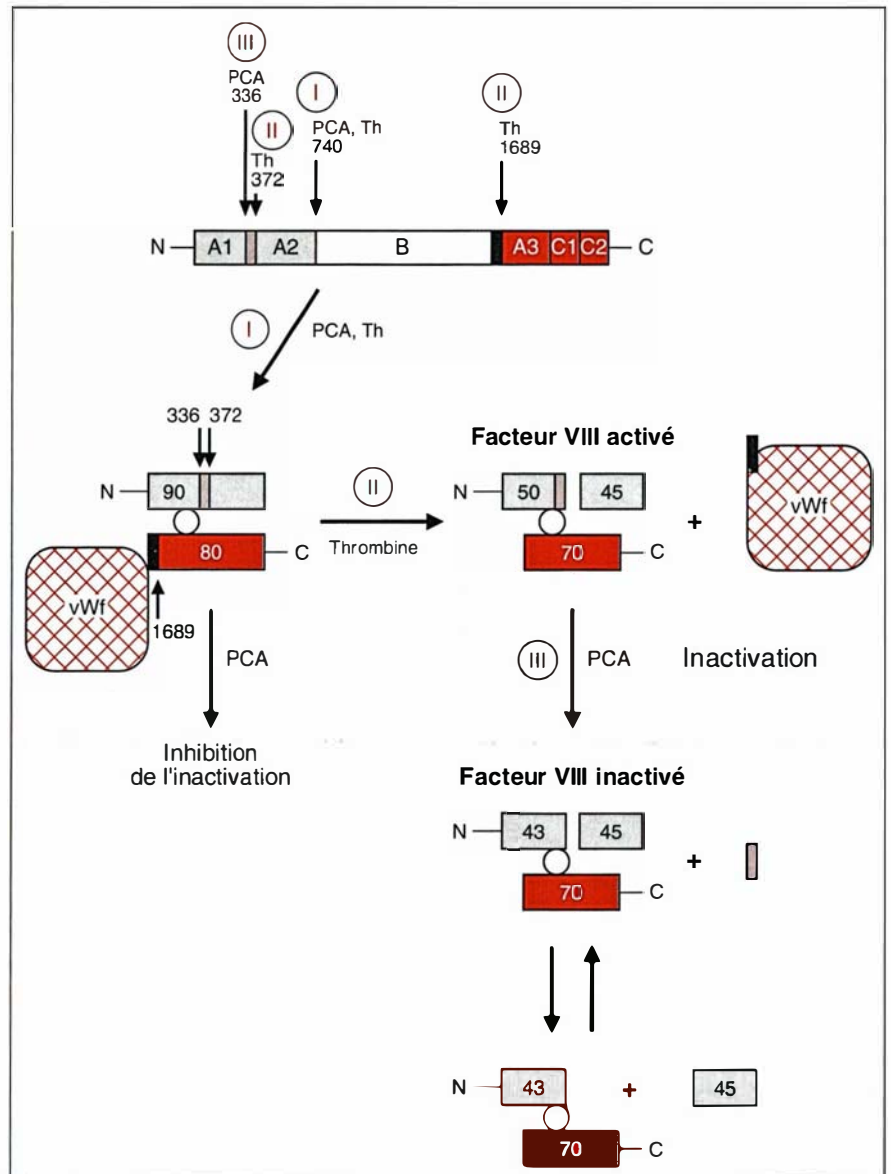


Figure 4. **Inactivation par la protéine C activée.** Les différents sites de clivage sont représentés (I-III). (I) Clivages en position 740 et 1648 et formation du facteur VIII de 90-80 kDa. Le facteur von Willebrand (vWf) est associé au facteur VIII par la région acide (■) N-terminale de la chaîne légère. (II) Le vWf est séparé du facteur VIII par protéolyse de la région acide (■). (III) Grâce à la perte du vWf, l'inactivation par la protéine C activée (PCA) s'effectue par coupure après le résidu Arg 336. Les poids moléculaires des fragments qui constituent le facteur VIII inactivé sont représentés en kDa. Cette inactivation correspond aussi à la perte de la région acide de la chaîne lourde et à la dissociation du fragment C-terminal de 45 kDa.

de facteur VIII plasmatique a prouvé que la formation d'un complexe entre le facteur VIII et le facteur von Willebrand était indispensable au maintien d'une demi-vie normale.

Sachant que le facteur V ne se lie pas au facteur von Willebrand, alors qu'il présente une forte homologie avec le facteur VIII, il a été possible d'identifier sur ce dernier plusieurs sites potentiels de fixation au facteur von Willebrand.

Le facteur VIII recombinant obtenu après délétion de la partie codante pour la région B se lie au facteur von Willebrand de la même manière que la protéine complète [25]. Ces observations ont permis d'éliminer une première hypothèse de liaison sur ce domaine B. De même, la délétion de la région acide de la chaîne lourde provoque la perte de l'activité du mutant alors que celui-ci garde sa capacité de fixer le facteur von Willebrand. En revanche, la délétion de la région située entre les acides aminés 1648 et 1689 empêche la fixation du facteur von Willebrand.

Des anticorps dirigés contre un épitope situé entre les acides aminés Val-1670 et Glu-1684 inhibent la fixation du facteur von Willebrand [26]. Enfin, la protéolyse par la thrombine de la chaîne légère du facteur VIII libère le fragment N-terminal de 7 kDa associé au facteur von Willebrand [27] (figure 4). Ces résultats prouvent que le site de fixation du facteur von Willebrand est situé à l'extrémité N-terminale de la chaîne légère du facteur VIII.

Celle-ci possède des tyrosines sulfatées en position 1664 et 1680 [28]. L'implication de ces résidus dans la fixation au facteur von Willebrand a été étudiée par mutagenèse dirigée. Une substitution ponctuelle de ces deux résidus engendre une molécule très instable du fait de sa mauvaise fixation au facteur von Willebrand. Ces résultats suggèrent que les deux tyrosines modifiées sont d'une grande importance pour l'association des deux glycoprotéines. En revanche, la bonne capacité à fixer le facteur von Willebrand de formes délétées du facteur VIII ne possédant pas la tyrosine 1664 [25], indique que la tyrosine 1680 est la plus impliquée dans l'association du facteur VIII au facteur von Willebrand.

Le rôle d'intermédiaire du facteur von Willebrand dans l'association des chaînes légère et lourde du facteur VIII suppose un site de fixation sur chacune de ces chaînes. Bien qu'aucun site n'ait clairement été identifié sur la chaîne lourde du facteur VIII, il semble que le facteur von Willebrand se fixe tout d'abord à la chaîne légère [29] et s'associe ensuite, après action de la thrombine, au fragment C-terminal de 45 kDa de la chaîne lourde du facteur VIII activé [27]. Cela indique la présence d'un site secondaire de fixation au facteur von Willebrand qui serait plus accessible après l'action de la thrombine.

Hill-Eubanks *et al.* [30] ont étudié l'effet d'une protéase de venin de serpent similaire à la thrombine mais

qui n'hydrolyse que la chaîne lourde du facteur VIII. La présence de facteur von Willebrand sur la chaîne légère du facteur VIII inhibe l'action de cette protéase alors que la thrombine active normalement le facteur VIII. Par ailleurs, l'action protéasique de la protéine C activée sur la chaîne lourde du facteur VIII est inhibée par la présence de facteur von Willebrand. Ces résultats confirment qu'une première coupure de la chaîne légère par la thrombine permettant de dissocier le facteur VIII du facteur von Willebrand est indispensable à la protéolyse ultérieure de la chaîne lourde par la thrombine ou par la protéine C activée pour l'activation ou l'inactivation du facteur VIII (figure 4).

Quels facteurs antihémophiliques A pour demain ?

L'histoire du traitement de l'hémophilie A est jalonnée par l'utilisation de produits d'origine plasmatique contenant du facteur VIII à des taux de plus en plus élevés (Tableau 1). Cette évolution vers des produits de plus haute pureté s'est enrichie aussi de l'introduction de traitements inactivant les virus qui garantissent l'innocuité des protéines naturelles. En effet, le don de sang, rémunéré ou non, apporte une part de risques qui ne peuvent être maîtrisés qu'après avoir été subis. Ainsi la contamination d'hémophiles par des produits plasmatiques contenant du VIH n'a pu être stoppée qu'après identification de ce virus en 1983 comme l'agent responsable du SIDA.

De même, le virus de l'hépatite B, identifié en 1968, contaminait fréquemment ces préparations jusqu'à ce que des méthodes fiables de dépistage, mises en place dans les années 1970, permettent de rejeter les dons contaminés.

L'avènement proche des premiers facteur VIII recombinants (*Kogenate* et *Recombinate*, Tableau II, p. 1050) garantit une innocuité virale qui ne peut défailir. D'une part, chaque cellule productrice provient d'une lignée de cellules conservées dans l'azote liquide en banques, dont le statut viral est figé et contrôlé. D'autre part, toutes les étapes d'élaboration, de la culture cellulaire jusqu'au pro-

Tableau I

PURETÉ DES DIFFÉRENTS FACTEURS VIII PLASMATIQUES

Les différents facteurs VIII plasmatiques	Activité spécifique*(1)
Plasma frais	0,016
Cryoprécipité	0,1
Concentré standard	1
Produit de pureté intermédiaire	100 à 200
Produit immunopurifié	2 000 à 3 000
Facteur VIII pur	10 000

* L'activité spécifique est mesurée en unités de facteur VIII par milligramme de protéines.

Tableau II				
LES DIFFÉRENTS FACTEURS VIII RECOMBINANTS				
Nom	Groupe industriel	Forme	Mode de purification	Statut
Recombinante	Baxter	Complète	Immunopurif	Prélancement
Kogenate	Cutter Miles Bayer	Complète	Immunopurif	Prélancement
FVIII- Δ II	T M I	Délétée monochaîne (771-1666)	Non immunopurif	Préclinique
FVIII : SQ	Kabi	Délétée bicaténaire (743-1638)	Immunopurif	Préclinique

duit final, suivent un procédé de fabrication réglementé intégrant un traitement inactivant pour aboutir à un produit pharmaceutique standardisé.

Les normes réglementaires qui fixent à des valeurs seuils très faibles les taux de génome et de protéines cellulaires dans le produit final impliquent en fait que la pureté soit proche de 100 % avant addition d'agents stabilisants.

Les coûts de ces produits recombinants doivent prendre en compte l'amortissement de frais de recherche et de développement longs et coûteux, d'études cliniques et de mise en place de l'outil de production. Le prix de revient industriel dépendra de la productivité cellulaire (exprimée en unités de facteur VIII par million de cellules et par 24 heures) mais aussi du coût du milieu de culture cellulaire. En effet les volumes de milieu utilisés sont considérables et leur coût direct très lié à leur charge en protéines. Un milieu de production chimiquement défini, sans sérum, donc peu chargé en protéines, ne nécessite pas de techniques lourdes et coûteuses de purification (immunopurification, par exemple) par rapport aux méthodes de chromatographie classiques (Tableau II).

Près de dix ans seront écoulés entre le clonage en 1984 du gène du facteur VIII humain et le lancement des facteurs VIII recombinants complets, et peut-être de douze à quinze ans pour les variants du facteur VIII. Ces variants bénéficient des connaissances

sur la relation structure-fonction. Ainsi, ils ne contiennent pas de domaine B (Tableau II, [31, 32]), ce qui peut expliquer qu'ils sont plus facilement sécrétés par les cellules du fait d'un moindre degré de glycosylation de la protéine [4].

Certains de ces variants sont bicaténaires et d'autres monocaténaires (Tableau II), et les modes de purification varient en fonction des contaminants apportés par le milieu de culture cellulaire.

Cette multiplicité de nouveaux facteurs antihémophiliques A potentiels reflète la demande d'un produit thérapeutique efficace et sûr.

L'efficacité du facteur VIII recombinant complet a été montrée chez de nombreux patients, notamment chez des hémophiles sévères. Les essais cliniques multicentriques ont montré que ce produit recombinant était bien toléré et aussi efficace que le facteur VIII plasmatique. Par ailleurs, des études réalisées *in vitro* et *in vivo* chez des chiens hémophiles ont prouvé également l'efficacité des facteurs VIII délétés de la région B. Cependant, les risques potentiels d'immunisation contre ces variants, liés notamment à la présence de néoantigènes, sont actuellement évalués dans différents modèles animaux et lors des premiers essais cliniques. A terme, les outils de la biologie moléculaire et les biotechnologies auront façonné un ou plusieurs facteurs antihémophiliques A plus efficaces et plus sûrs ■

Summary

Recombinant factor VIII (antihemophilic A): structure-function relationship

Factor VIII is a glycoprotein which acts as a cofactor in the blood coagulation pathway. Sequence modifications or a deficiency in factor VIII cause a serious bleeding disorder called haemophilia A. Gene cloning has greatly contributed to the understanding of the factor VIII structure and function. The primary sequence, deduced from the human cDNA, predicts a mature polypeptide of 2332 aminoacids which exhibits three domains arranged as follows: A1-A2-B-A3-C1-C2. Factor VIII is present in plasma as a complex corresponding to the association, by a divalent ion, of a 210 kDa heavy chain (A1-A2-B) to a 80 kDa light chain (A3-C1-C2). Cleavages of the B domain lead to different heterodimers of Mr ranging from 210-80 to 90-80 kDa. Factor VIII acts in the blood coagulation pathway in its activated or inactivated forms after proteolysis by thrombin or activated protein C, respectively. Site-directed mutagenesis has allowed an analysis of the structural requirements for factor VIII function. Thrombin activation corresponds to proteolysis on the heavy and light chains after the Arg 372 and 1689, respectively, to generate the activated trimer A1/A2/A3-C1-C2. Dissociation of the A2 domain from this complex leads to factor VIII inactivation. By contrast, inactivation with the activated protein C corresponds to the proteolysis of the heavy chain after Arg 336 to generate the A1/A3-C1-C2 dimer. Considering these structural requirements and that the B region is dispensable for procoagulant activity, different variants of factor VIII comprising partial or complete deletions of the B domain have been constructed. These variants, which are better secreted than the complete protein, are active to restore coagulation *in vitro* and *in vivo* in hemophilic dogs. The clinical investigations have shown that the complete recombinant factor VIII is efficacious for treatment of haemophilia A.