

**VETAGRO SUP  
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2018 - Thèse n° 29

***UNE APPROCHE QSAR POUR UNE INHIBITION  
SELECTIVE DE LA VKOR-LIKE***

**THESE**

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I  
(Médecine - Pharmacie)  
et soutenue publiquement le 14 Septembre 2018  
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

*CREPIN Gary*



VetAgro Sup





**VETAGRO SUP  
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2018 - Thèse n° 29

***UNE APPROCHE QSAR POUR UNE INHIBITION  
SELECTIVE DE LA VKOR-LIKE***

**THESE**

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I  
(Médecine - Pharmacie)  
et soutenue publiquement le 14 Septembre 2018  
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

*CREPIN Gary*



VetAgro Sup





## Liste des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (1er mars 2018)

Nom	Prénom	Département	Grade
ABITBOL	Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ARCANGIOLI	Marie-Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
AYRAL	Florence	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BECKER	Claire	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BELLUCO	Sara	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENAMOU-SMITH	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENOIT	Etienne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BERNY	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BOULOCHER	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BOURDOISEAU	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
BOURGOIN	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BRUYERE	Pierre	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BUFF	Samuel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BURONFOSSE	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
CACHON	Thibaut	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CADORÉ	Jean-Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
CAROZZO	Claude	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CHABANNE	Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CHALVET-MONFRAY	Karine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DE BOYER DES ROCHES	Alice	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DEMONT	Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
DJELOUADJI	Zorée	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
ESCRIOU	Catherine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
FRIKHA	Mohamed-Ridha	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GALIA	Wessam	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Stagiaire
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
GONTHIER	Alain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GRANCHER	Denis	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
GREZEL	Delphine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
HUGONNARD	Marine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
JANKOWIAK	Bernard	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Contractuel
JAUSSAUD	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
JEANNIN	Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Inspecteur en santé publique vétérinaire (ISPV)
JOSSON-SCHRAMME	Anne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences Contractuel
JUNOT	Stéphane	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
KODJO	Angeli	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
KRAFFT	Emilie	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
LAABERKI	Maria-Halima	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LAMBERT	Véronique	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LE GRAND	Dominique	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
LEBLOND	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LEDoux	Dorothee	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Stagiaire
LEFEBVRE	Sébastien	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences Stagiaire
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LEPAGE	Olivier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LOUZIER	Vanessa	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
MARCHAL	Thierry	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MATEOS	Stevana	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
MOISSONNIER	Pierre	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MOUNIER	Luc	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
PEPIN	Michel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
PIN	Didier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PONCE	Frédérique	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PORTIER	Karine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
POUZOT-NEVORET	Céline	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
PROUILLAC	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
REMY	Denise	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
RENE MARTELLET	Magalie	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
RIVES	Germain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Contractuel
ROGER	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
SABATIER	Philippe	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
SAWAYA	Serge	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
SCHRAMME	Michael	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
SERGEANT	Delphine	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
THIEBAULT	Jean-Jacques	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
THOMAS-CANCIAN	Aurélien	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
TORTEREAU	Antonin	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
VIGUIER	Eric	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
ZENNER	Lionel	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur



## REMERCIEMENTS

### **À Monsieur le Professeur Serge NATAF,**

De la faculté de Médecine de Lyon,  
Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,  
Pour votre disponibilité et votre amabilité,  
Veuillez trouver ici l'expression de mes hommages respectueux.

### **À Monsieur le Professeur Etienne BENOIT,**

De VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon,  
Qui nous a fait l'honneur d'encadrer et de corriger ce travail,  
Pour votre gentillesse, votre bonne humeur et votre soutien indéfectible,  
Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

### **À Monsieur le Professeur Thierry BURONFOSSE,**

De VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon,  
Qui nous a fait l'honneur de participer à ce jury de thèse et de corriger ce travail,  
Pour votre sympathie et votre disponibilité,  
Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

### **À Madame le Docteur Virginie LATTARD,**

De l'USC 1233 de l'INRA,  
Qui nous a fait l'honneur d'encadrer et de guider ce travail,  
Pour son implication, sa disponibilité et son infaillibilité,  
Mes plus sincères remerciements et mon plus profond respect.







## TABLE DES MATIERES

Liste des annexes.....	11
Liste des figures.....	13
Liste des tableaux.....	15
Liste des abréviations.....	17
INTRODUCTION.....	19
Partie I : Partie Bibliographique.....	21
I. La vitamine K : une vitamine aux multiples fonctions.....	23
a. Histoire.....	23
b. La vitamine K sous toutes ses formes.....	23
c. Différentes fonctions.....	25
II. Vitamine K et activation des PVKD.....	27
a. Les différentes PVKD.....	27
i. Hépatiques : rôle dans la coagulation.....	27
ii. Extra-hépatiques.....	31
I. MGP.....	31
II. Ostéocalcine.....	32
III. Gas 6.....	33
b. La gamma-carboxylation.....	34
III. Le cycle de la Vitamine K : un recyclage essentiel.....	36
a. Présentation du cycle.....	36
b. VKORC1 : un acteur majeur.....	37
c. VKORC1L1 : un rôle à découvrir ?.....	40
IV. Mode d'action des AVK.....	42
a. Historique.....	42
b. Différents AVK.....	43
c. Inhibition de l'activité VKR.....	45
V. Résistance aux AVK.....	47
a. Mutations de VKORC1.....	47
b. VKOR-like : une résistance supérieure.....	54
Partie II : Partie expérimentale.....	57
I. Objectif(s) de l'étude.....	59

II.	Matériels et méthodes .....	59
a.	Transformation des levures <i>Pichia pastoris</i> .....	60
b.	Mise en culture des levures.....	61
c.	Préparation des fractions microsomales de levures recombinantes.....	62
d.	Dosage de la concentration protéique des fractions microsomales.....	62
e.	Analyse par western blot de l'expression de la protéine recombinante rVKORC1-like dans la fraction microsomale.....	63
f.	Activité enzymatique de la protéine recombinante VKORC1-like exprimée dans la fraction microsomale.....	64
g.	Inhibition de la VKOR-like.....	65
III.	Résultats .....	66
IV.	Discussion .....	69
	CONCLUSION .....	73
	BIBLIOGRAPHIE.....	75
	ANNEXES.....	85

## Liste des annexes

Annexe I : Production des fractions microsomales.....	85
Annexe II : Résultat du western-blot de VKORC1 et VKORC1-L1.....	86



## Liste des figures

Figure 1 : Noyau 2-méthyl-1,4-naphtoquinone .....	23
Figure 2 : Formule chimique des différentes formes de la vitamine K .....	25
Figure 3 : Schéma simplifié des cascades de la coagulation .....	28
Figure 4 : Rôle de l'ostéocalcine non gamma-carboxylée dans le métabolisme .....	33
Figure 5 : Topologie de GGCX.....	34
Figure 6: Réaction de gamma-carboxylation d'une protéine vitamine K-dépendante .....	35
Figure 7 : Le cycle de la Vitamine K .....	37
Figure 8 : Modélisation 3D de VKORC1 .....	38
Figure 9 : Mécanisme catalytique de VKORC1 .....	39
Figure 10 : Homologie des séquences de VKOR-like.....	40
Figure 11 : Topologies de VKORC1 et VKORC1L1 .....	41
Figure 12 : Formation du dicoumarol.....	43
Figure 13 : Les principales familles d'AVK et leurs dérivés .....	44
Figure 14 : Représentation de Lineweaver et Burk d'une inhibition non compétitive de l'activité VKOR de microsomes de foie de rats sensibles par des concentrations croissantes de coumafène.....	45
Figure 15 : Action des AVK sur le cycle de la Vitamine K .....	46
Figure 16 : Mécanisme d'inhibition de VKORC1 .....	47
Figure 17 : Répartition géographique des différentes mutations .....	51
Figure 18 : Temps de prothrombine comparés face à différents anticoagulants, pour différents phénotypes issus de la mutation Y139F .....	53
Figure 19 : Utilisation des protéines recombinantes exprimées en <i>Pichia pastoris</i> pour l'évaluation du rôle des mutations du gène VKORC1. Rapport des constantes d'inhibition observées pour un AVK pour une mutation sur la constante d'inhibition observée pour la forme non mutée .....	53
Figure 20 : Schéma explicatif de la formation de vitamine K hydroxylée en 3 induisant une subcarence en vitamine K .....	54
Figure 21 : Comparaison d'inhibition de l'activité de VKORC1 et VKORCL1 par différentes concentrations de warfarine .....	55
Figure 22 : Levures sous agitation à 30°C.....	61
Figure 23 : Schématisation des expériences d'activité enzymatique .....	65

Figure 24 : Linéarité en fonction du temps de l'activité de la VKOR-like.....	66
Figure 25 : Courbe d'inhibition de la molécule n°12 sur la VKORC1L1 recombinante .....	67
Figure 26 : Histogramme des IC50 de VKORC1L1 recombinante en fonction des inhibiteurs	68
Figure 27 : Histogramme comparatif des IC50 de VKORC1L1 et de VKORC1 sauvage .....	68
Figure 28 : Histogramme comparatif des IC50 de VKORC1L1 et de VKORC1-Y139C.....	69
Figure 29 : Base de travail sur un noyau coumarinique.....	70
Figure 30 : Rapport des Ki observés pour VKORC1 Y139C/VKORC1L1 .....	71

## Liste des tableaux

Tableau I : Quelques exemples d'inhibition comparée de VKORC1 et VKORC1L1 .....	54
---	----



## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
AVK	Antivitamine K
BGP	Bone Gla Protein (=ostéocalcine)
cOC	Ostéocalcine gamma-carboxylée
CV	Calcifications vasculaires (= Minéralisations vasculaires)
CYP	Cytochrome P-450
(k)Da	(kilo)Dalton
DTT	Dithiothreitol
Gas6	Growth arrest-specific gene 6
GGCX	gamma-glutamyl-carboxylase
Gla	Acide aminé gamma-carboxyglutamate
Glu	Acide aminé glutamate
GRP	Gla-rich-protein (=Ucma)
HDL	Lipoprotéines de haute densité
Kb	Kilobase
KH	Vitamine K quinone
KH <sub>2</sub>	Vitamine K hydroquinone
Ki	Constante d'inhibition
Km	Constante de Michaelis-Menten
KO	Knock out
Kox	Vitamine K époxyde
K <sub>1</sub> Ox	Vitamine K <sub>1</sub> époxyde
LDL	Lipoprotéines de basse densité
Mb	Mégabase
MGP	Protéine-gla-matricielle
MK	Ménaquinone
MKn	Ménaquinone n (avec 4<n<13)
MD	Ménadione
OC	Ostéocalcine (=BGP)
PCR	Polymerase Chain Reaction

PIVKA	Prothrombine induite par une absence en vitamine K
PK	Phylloquinone
PVKD	Protéine vitamine K-dépendante
SD	Sprague-Dawley
SNP	Single nucleotide polymorphism
TQ	Temps de Quick
ucMGP	Protéine-gla-matricielle non-gamma-carboxylée
ucOC	Ostéocalcine non-gamma carboxylée
USC	Unité sous contrat
VKOR (activité)	(activité) vitamine K époxyde réductase
VKORC1	Vitamine K époxyde réductase sous-unité 1
Vkorc1 <sup>C139/C139</sup>	Rats sauvages avec la mutation C139 à l'état homozygote
VKORC1L1	VKORC1-like 1
VKR	Vitamine K Reductase (activité)

## INTRODUCTION

La vitamine K désigne une famille de micro-nutriments essentiels à la vie des organismes mammifères. En effet, la vitamine K est un cofacteur de l'activation de plusieurs protéines vitamine K-dépendantes hépatiques impliquées dans le processus de la coagulation sanguine. Mais son rôle ne s'arrête pas là. En effet, il existe également des protéines vitamine K-dépendantes non impliquées dans la coagulation, à localisation extra-hépatiques, impliquées dans le contrôle de la croissance osseuse, la lutte contre les calcifications vasculaires ou encore le métabolisme énergétique.

Cette vitamine K est parfaitement recyclée dans l'organisme, grâce à l'action d'une enzyme, la vitamine K époxyde réductase VKORC1. C'est cette enzyme qui se trouve être la cible des traitements anticoagulants utilisés chez l'homme, mais surtout des produits rodenticides, très utilisés dans le monde. Un gène paralogue à celui codant pour cette enzyme, code pour une enzyme proche, nommée VKORC1L1, et surtout exprimée dans les tissus extra hépatiques. Mais le rôle de cette enzyme est encore très mal connu. Ce travail a pour ambition d'aider à découvrir son ou ses rôles.

En effet, le travail de recherche réalisé dans cette thèse a pour but d'aider à identifier, si cela est possible, le ou les rôles de cette enzyme dans l'organisme. Pour ce faire, nous avons essayé de trouver une molécule capable d'inhiber VKORC1L1, mais sans inhiber l'activité de VKORC1. La difficulté réside dans le fait que les deux enzymes sont relativement proches et donc que leurs substrats et leurs inhibiteurs ont des structures similaires, leur conférant des propriétés proches, à la fois dans leur activité enzymatique ou dans leur inhibition. Nous verrons dans cette étude que VKORC1 et VKORC1L1, bien que proches, diffèrent en plusieurs points.

Enfin, suite à ce constat, nous réaliserons un screening des différentes molécules inhibitrices à notre disposition, afin de pouvoir sélectionner, si elles existent, les molécules d'intérêt. Cela nous permettrait de réaliser un K-O chimique sur cette enzyme chez des rats ou des souris, et de pouvoir ainsi identifier le ou les systèmes touchés, et donc le ou les rôles de la VKOR-like.



## Partie I : Partie Bibliographique



## I. La vitamine K : une vitamine aux multiples fonctions

### a. Histoire

La vitamine K a été mise en évidence par le chercheur biochimiste danois Carl Peter Henrik Dam. En effet, vers la fin des années 1920, alors qu'il étudiait le rôle du cholestérol en nourrissant des poulets avec une alimentation pauvre en lipides, il constate qu'après plusieurs semaines de régime, ces animaux souffrent de nombreuses hémorragies persistantes (même après ajout de cholestérol dans leur alimentation). Il lui apparaît alors évident qu'en plus du cholestérol, une autre substance a été retirée de l'alimentation et que cette substance a un rôle dans la coagulation. Cette découverte fut publiée en allemand, où cette molécule fut désignée par le terme Koagulation vitamin et reçoit donc la lettre K (Dam, 1935).

En 1936, le Docteur Dam parvient à purifier la vitamine K à partir de luzerne mais c'est seulement en 1939 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.

C'est une vitamine liposoluble, résistante à la chaleur mais détruite par la lumière. Elle 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 certaines bactéries de notre flore intestinale produisent de la vitamine K, la contribution de ces bactéries dans le statut vitaminique reste une hypothèse non vérifiée. Pour l'homme, l'apport journalier en vitamine K doit être d'environ 1 µg/kg, en se basant uniquement sur les besoins de la coagulation sanguine.

### b. La vitamine K sous toutes ses formes

Trois formes de la vitamine K sont actuellement décrites : ce sont toutes des quinones car elles présentent dans leur structure chimique une naphtoquinone (2-méthyl-1,4-naphtoquinone) nécessaire aux transferts d'électrons (figure 1).

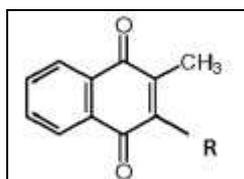


Figure 1 : Noyau 2-méthyl-1,4-naphtoquinone

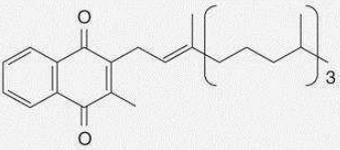
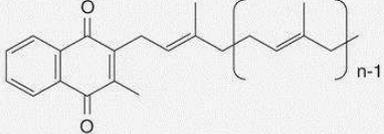
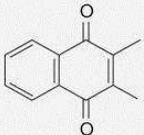
Cette naphthoquinone est substituée en position 3 par une chaîne latérale carbonée qui détermine la divergence de propriétés de chacune de ces vitamines :

- La vitamine K1 (figure 2) : sa chaîne latérale est une chaîne phytyle. Egalement appelée phylloquinone, elle est retrouvée dans les membranes des chloroplastes de certains légumes verts. Peu absorbée, sa contribution dans le statut vitaminique est sans doute surestimée. Insoluble dans l'eau, elle est soluble dans les graisses et se présente (quand elle est pure) sous la forme d'une huile de couleur jaune.
- La vitamine K2 (figure 2) : appartenant au groupe des ménaquinones (MK), elle est retrouvée dans les aliments fermentés tels 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 terpénoïde. 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 majoritaire dans le spectre des ménaquinones présentes dans le soja. Par ailleurs, la forme MK-4 peut être alkylée à partir des autres isoformes de ménaquinone 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 (n'ayant pas de transporteur plasmatique spécifique) est transportée par des lipoprotéines. La différence de liposolubilité des vitamines K1 et K2 peut expliquer leurs différences dans le transport ou encore la demi-vie. Par ailleurs, la vitamine K1 apparaît être utilisée prioritairement dans le foie tandis que la vitamine K2 s'accumulerait préférentiellement dans les artères ou d'autres localisations 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 vitamine K2 est transportée par des LDL et HDL jusqu'à d'autres organes cibles (Beulens et al., 2009). Ainsi, Beulens décrit une relation entre vitamine K2 et tissus

extra-hépatiques suite à l'observation d'une accumulation et une utilisation de la vitamine K2 plus importante que celle de la vitamine K1 dans ces tissus.

- 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. 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 raison d'effets secondaires délétères (nausées, vomissements, anémie hémolytique, asthénie, faiblesse, vertiges, 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.

	Formule chimique
Phylloquinone : vitamine K <sub>1</sub>	
Ménaquinone : vitamine K <sub>2</sub>	
Ménadione : vitamine K <sub>3</sub>	

**Figure 2 :** Formule chimique des différentes formes de la vitamine K  
(d'après Moreau et al., 2012)

### c. Différentes fonctions

En 1974, le professeur Stenflo ainsi que l'équipe de Nelsestuen ont simultanément décrit un acide aminé inhabituel gamma-carboxyglutamate (Gla) dans la prothrombine (facteur II de la coagulation). 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 la 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 directement impliquée dans la prévention de dommages oxydatifs (Li et al., 2003), 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 d'ictère et de 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.

## II. Vitamine K et activation des PVKD

### a. Les différentes PVKD

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 centrale 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 domaines 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-protéases, trois d'entre elles sont des tyrosine-kinases.

Pour la suite, nous répartirons les PVKD selon deux familles : les protéines vitamine K dépendantes hépatiques et les protéines vitamine K dépendantes extra-hépatiques.

### i. Hépatiques : rôle dans la 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 3) 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 VIII 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.

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.

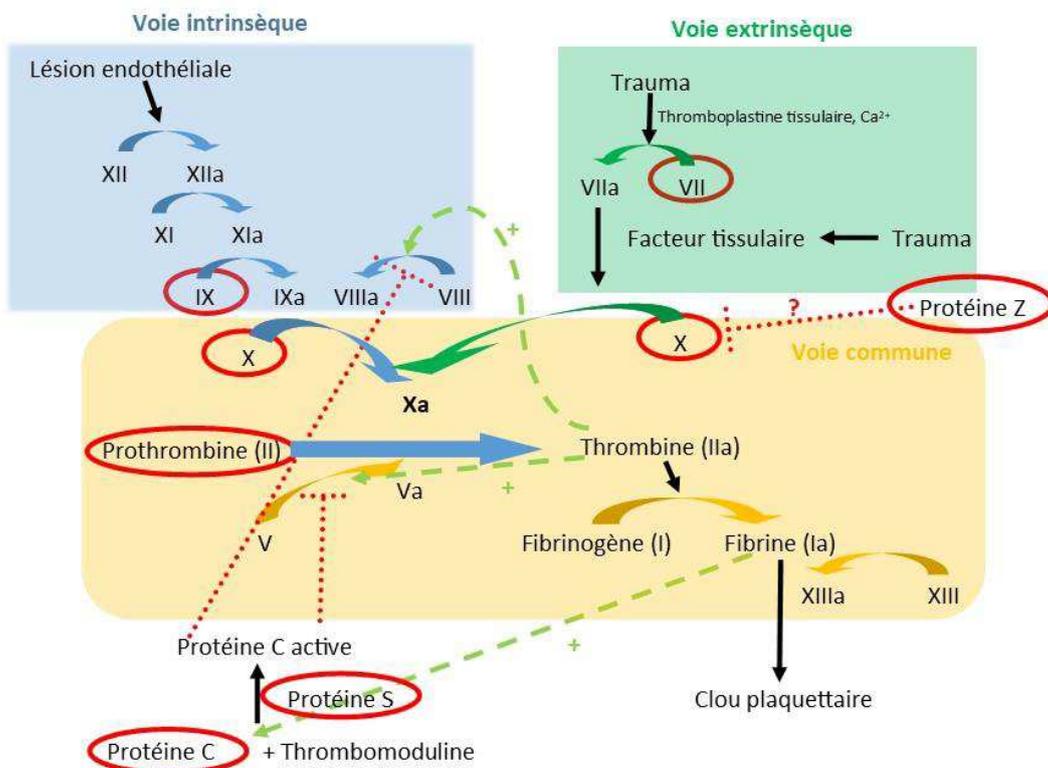


Figure 3 : Schéma simplifié des cascades de la coagulation (les protéines vitamine K-dépendantes sont entourées en rouge)

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). L'inversion de la membrane des plaquettes observée au cours de l'agrégation plaquettaire permet de retrouver des groupements phosphates de phospholipides exposés vers le pôle plasmatique et d'interagir au travers d'une liaison au calcium avec les protéines gamma-carboxylées. Dans la voie intrinsèque, les facteurs II, IX et X 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 toutes 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 phosphatidyl-sérines présentes à la surface de l'agrégat plaquettaire. Ces 4 facteurs vitamine K-dépendants, contrôlant les dernières étapes de la formation de fibrine, 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 activée 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 plasmatique (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 C<sub>4</sub>BP, 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 phosphatidylserine est exposé vers l'extérieur de la membrane cellulaire de telle façon que le complexe [PS/C<sub>4</sub>BP] s'y fixe via les résidus Gla de la PS. Le C<sub>4</sub>BP peut ainsi intervenir dans les dernières étapes de l'activation du complément et assurer sa fonction de cofacteur de la dégradation de la protéine C<sub>4</sub>b. Ainsi, en se liant à la protéine C<sub>4</sub>BP, 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 isolé 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).

## ii. Extra-hépatiques

Contrairement aux PVKD, précédemment décrites, impliquées dans la coagulation, 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 sont les protéines vitamine K dépendantes dont les fonctions sont les plus étudiées à ce jour.

Je ne décrirai ici que les principales protéines vitamine K-dépendantes produites dans les tissus extra-hépatiques, à savoir :

### I. MGP

La protéine matricielle Gla (ou MGP pour « matrix-gla-protein ») a été isolée à partir de matrice osseuse bovine et décrite pour la première fois par Paul Price en 1983. C'est une PVKD de 14 kDa pour 84 acides aminés comportant 5 acides glutamiques en position 2, 37, 41, 48, et 52 qui peuvent être gamma-carboxylés (Viegas et al., 2009) et 3 sérines phosphorylables en position 3, 6 et 9.

La MGP est exprimée dans les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les chondrocytes, les cellules endothéliales, mais pas au niveau des ostéoblastes. Elle joue un rôle primordial dans l'inhibition des minéralisations vasculaires.

Chez l'Homme, une mutation récessive au niveau du gène codant pour la MGP est responsable du syndrome de Keutel. Ce syndrome est caractérisé par une atteinte squelettique (calcifications du cartilage, hypoplasie...) et cardiovasculaire avec d'importantes calcifications artérielles. Chez la souris, un KO de la MGP entraîne des minéralisations vasculaires massives aboutissant à la mort de l'animal en moins de 2 mois (Luo et al., 1997). Inversement, une hypominéralisation des dents chez des souris surexprimant la MGP a été observée (Kaipatur et al., 2008). Seule la forme gamma-carboxylée de la MGP est capable de jouer le rôle d'inhibiteur de calcifications (Proudfoot and Shanahan, 2006) en se liant directement au niveau des cristaux d'hydroxyapatite en formation empêchant ainsi la croissance du cristal et/ou en se liant à BMP-2 (« bone morphogenetic protein 2 », une protéine qui stimule la production osseuse en temp normal) (Zebboudj et al., 2003).

## II. Ostéocalcine

L'ostéocalcine (OC) aussi appelée Bone Gla Protein (BGP) dans la littérature a été identifiée pour la première fois en 1975 par Hauschka à partir de tissus osseux (Hauschka et al., 1975). Cette protéine non collagénique de 49 acides aminés est la plus abondante de la matrice osseuse, sécrétée par les ostéoblastes. Les résidus acide glutamique (Glu) en position 13,17, 20 chez la souris et 17, 21, 24 chez l'Homme, peuvent être gamma-carboxylés au niveau du RE. La BGP peut ainsi circuler sous forme gamma-carboxylée ou non.

La gamma-carboxylation de l'ostéocalcine lui procure une forte affinité pour les ions calcium de l'hydroxyapatite de l'os. Ce qui la différencie des autres PVKD est que 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) (Sunnerhagen et al., 1996). Pendant la phase de remodelage osseux, la diminution du pH dans les lacunes des ostéoclastes favorise la décarboxylation de l'ostéocalcine. Cela réduit son affinité pour l'os et favorise son relargage dans la circulation générale (Malashkevich et al., 2013).

La forte présence de l'ostéocalcine dans la matrice osseuse a d'abord laissé supposer un rôle majeur dans la régulation de sa minéralisation. Ce rôle a été confirmé chez des souris KO pour le gène codant pour l'ostéocalcine en montrant une augmentation de la minéralisation et donc de la prolifération osseuse chez ces animaux (Ducy et al., 1996). Il est intéressant également de noter que ces souris présentaient aussi une diminution de la taille des îlots de Langerhans, une hypoinsulinémie, une hyperglycémie, une diminution de l'expression et de la concentration plasmatique de l'adiponectine ainsi qu'une augmentation de la masse grasse (Lee et al., 2007). Ces résultats ont permis de mettre en évidence le rôle médiateur de l'ostéocalcine dans la régulation du métabolisme énergétique.

*In vitro*, l'ajout d'OC à des cellules  $\beta$  du pancréas en culture stimule l'expression de l'insuline (Hinoi et al., 2008). Ces résultats sont confirmés *in vivo* en montrant que l'administration d'ostéocalcine au long court chez la souris augmente la stimulation de la sécrétion d'insuline

ainsi que la tolérance au glucose (Ferron et al., 2008). Ces études montrent pour la première fois un rôle endocrine de l'os sur le métabolisme énergétique par l'ostéocalcine circulante (figure 4).

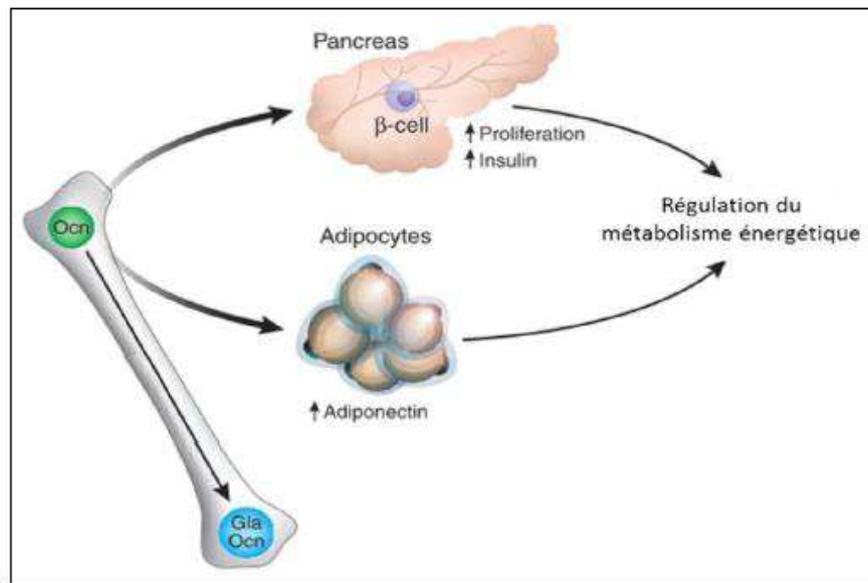


Figure 4 : Rôle de l'ostéocalcine non gamma-carboxylée dans le métabolisme  
(d'après Lee et al. 2007)

L'ostéocalcine pourrait aussi être impliquée dans la reproduction en favorisant la fertilité masculine (Oury et al., 2011). D'après ces auteurs, elle stimulerait la synthèse de testostérone dans les testicules en se fixant au niveau de récepteurs spécifiques (Gprc6a) localisés sur la membrane des cellules de Leydig.

### III. Gas 6

La protéine « growth arrest specific gene 6 » (Gas6) a été identifiée pour la première fois en 1988 par le Dr Schneider alors que lui et son équipe étaient à la recherche de gènes surexprimés dans des fibroblastes de souris dont la croissance était stoppée à l'état embryonnaire (Schneider et al., 1988).

Gas6 est une glycoprotéine de 75 kDa contenant un domaine Gla dans sa partie N-terminale. Bien que Gas6 partage environ 44% d'homologie de séquence peptidique avec la protéine S, les fonctions de ces 2 protéines restent très différentes (Laurance et al., 2012). Gas6 est impliquée dans la régulation de la prolifération, la différenciation, la migration et l'adhésion

cellulaire, mais aussi dans l'agrégation plaquettaire, le relargage de cytokines pro-inflammatoires ou encore le développement des adipocytes.

Plus récemment plusieurs études rapportent que Gas6 pourrait jouer un rôle dans l'inflammation, le diabète de type 2 et la résistance à l'insuline (Hung et al., 2010) (Lee et al., 2012) (Hsiao et al., 2013) (Dihingia et al., 2017).

### b. La gamma-carboxylation

La gamma-carboxylation est une modification post-traductionnelle essentielle qui convertit spécifiquement les résidus glutamates des PVKD en résidus gamma-carboxyglutamates. L'enzyme qui catalyse cette réaction est une enzyme de type monomère membranaire située dans le RE rugueux : la Gamma Glutamyl Carboxylase ou GGCX (figure 5).

Cette activité GGCX a été découverte pour la première fois dans les années 1970 à partir du surnageant issu de la fraction post-microsomale (fraction S10) de foie de rats (Shah and Suttie, 1974), mais la purification de la protéine du même nom n'a été réalisée qu'en 1991 à partir de foie de bœuf (Wu et al., 1991a). La même année, les ADN complémentaires (ADNc) codants pour la GGCX bovine et humaine ont été isolés et clonés par la même équipe (Wu et al., 1991b).

Le gène de la GGCX est localisé sur le chromosome 2 chez l'Homme et est composé de 15 exons pour 13kpb. Sa séquence de nucléotides est très conservée entre les espèces (88% d'homologie entre rat et humain) et code pour une protéine de 758 acides aminés, de 95 kDa, localisée au niveau du réticulum endoplasmique. Cette protéine est constituée de 5 domaines transmembranaires avec une extrémité N-terminale au niveau du cytoplasme et une extrémité C-terminale au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique (Tie et al., 2000) (figure 5).

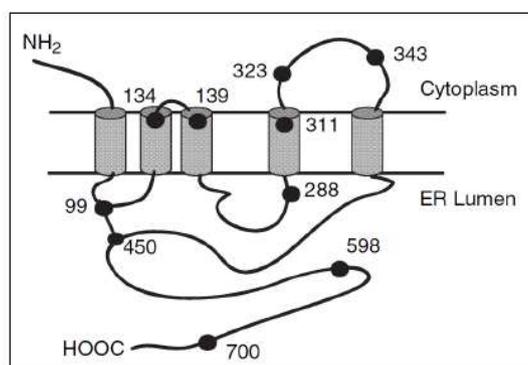
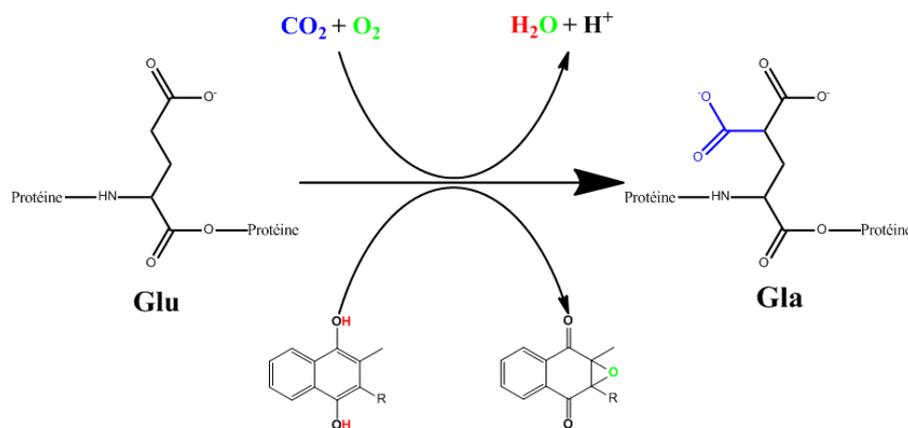


Figure 5 : Topologie de GGCX (d'après Stafford, 2005)

La gamma-carboxylation consiste en la substitution d'un atome d'hydrogène par un groupement carboxyle (COO<sup>-</sup>) sur le carbone gamma d'un acide glutamique (Glu), le transformant ainsi en acide gamma-carboxyglutamique (Gla).

La réaction de  $\gamma$ -carboxylation nécessite la présence de vitamine K sous forme hydroquinone comme cofacteur ainsi qu'une molécule de CO<sub>2</sub> et d'O<sub>2</sub>. À la suite de cette réaction la vitamine K hydroquinone est oxydée en vitamine K 2,3-époxyde (figure 6).



**Figure 6:** Réaction de gamma-carboxylation d'une protéine vitamine K-dépendante (PVKD)

Toutes les formes de vitamines K ne présentent pas la même affinité pour la GGCX (Yen and Mack, 1980). Il apparaît que l'activité GGXC est optimale avec la MK-3 comme cofacteur et que plus la chaîne latérale de la MK est grande, plus l'activité diminue. La MK-4 possède une efficacité 3 fois plus faible que la phylloquinone. Il est à noter que la ménadione (=MD = Vitamine K3) n'est pas un cofacteur de la GGCX (Buitenhuis et al., 1990).

Chez le rat, l'activité GGCX est retrouvée dans la majorité des tissus à l'exception du muscle, des veines et de la membrane osseuse. Le testicule est le seul organe à montrer une activité supérieure au foie (Vermeer et al., 1982).

Un KO de la GGCX à l'état homozygote chez la souris entraîne la mort embryonnaire entre le 9,5<sup>ème</sup> et 18<sup>ème</sup> jours dans 50% des cas et les souris arrivant à terme meurent peu de temps après la naissance d'hémorragies abdominales massives (Zhu et al., 2007). Le KO de la GGCX ciblé au niveau du foie permet d'améliorer le phénotype précédent, mais les souris présentent tout de même une mort prématurée et des hémorragies (Azuma et al., 2014).

Chez l'Homme des mutations de la GGCX entraînent des phénotypes multiples dont le plus répandu est un déficit en facteurs de coagulation vitamine K-dépendant ou encore des affections au niveau de la peau, semblables à celles observées dans le pseudoxanthome élastique (De Vilder et al., 2017).

### III. Le cycle de la Vitamine K : un recyclage essentiel

#### a. Présentation du cycle

L'apport alimentaire en vitamine K étant limité, l'organisme a mis en place un système de recyclage efficace permettant le maintien d'une quantité suffisante afin d'assurer ses fonctions biologiques. Le recyclage via ce cycle est tellement efficace qu'on évalue à environ 500 fois la capacité de régénération d'une molécule de vitamine K avant son élimination (6).

Ce recyclage fait intervenir plusieurs enzymes et se déroule ainsi (*figure 7*) :

1 / La vitamine K hydroquinone ( $KH_2$ ) en présence d'oxygène et de  $CO_2$  sert de cofacteur à la GGCX permettant la gamma-carboxylation d'une PVKD.

2/ Cette réaction va aboutir à l'activation d'une PVKD, à l'oxydation de la  $KH_2$  en vitamine K époxyde (KOX) et à la production d'une molécule d' $H_2O$ .

3/ La KOX va ensuite être réduite sous l'action de la vitamine K époxyde réductase complexe 1 (VKORC1) et/ou VKORC1 like 1 (VKORC1L1) en présence d'une thiorédoxine encore non identifiée.

4/ La vitamine K quinone produite (KH) est à nouveau réduite sous l'action de VKORC1, VKORC1L1 et une autre enzyme comportant l'activité VKR (Vitamine K Reductase) non inhibable par les antivitamines K (AVK), et non encore identifiée.

5/ Sous sa forme  $KH_2$  la vitamine K va pouvoir être réutilisée à l'étape 1 pour l'activation d'une nouvelle PVKD par la GGCX.

6/ Il est à noter que les AVK qui sont des inhibiteurs à la fois de VKORC1 et VKORC1L1 entraînent l'arrêt du recyclage de la vitamine K. Cela se traduit par une augmentation de la vitamine K sous forme époxyde et d'une diminution des PVKD gamma-carboxylés activés.

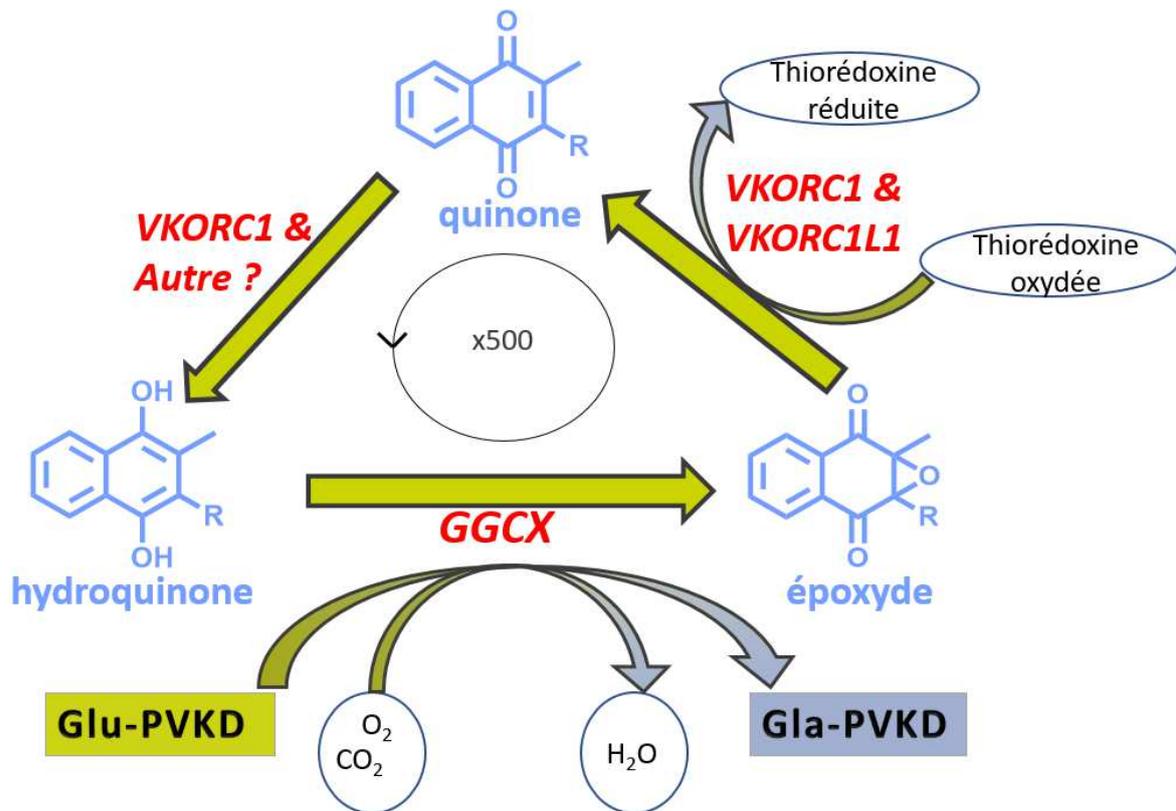


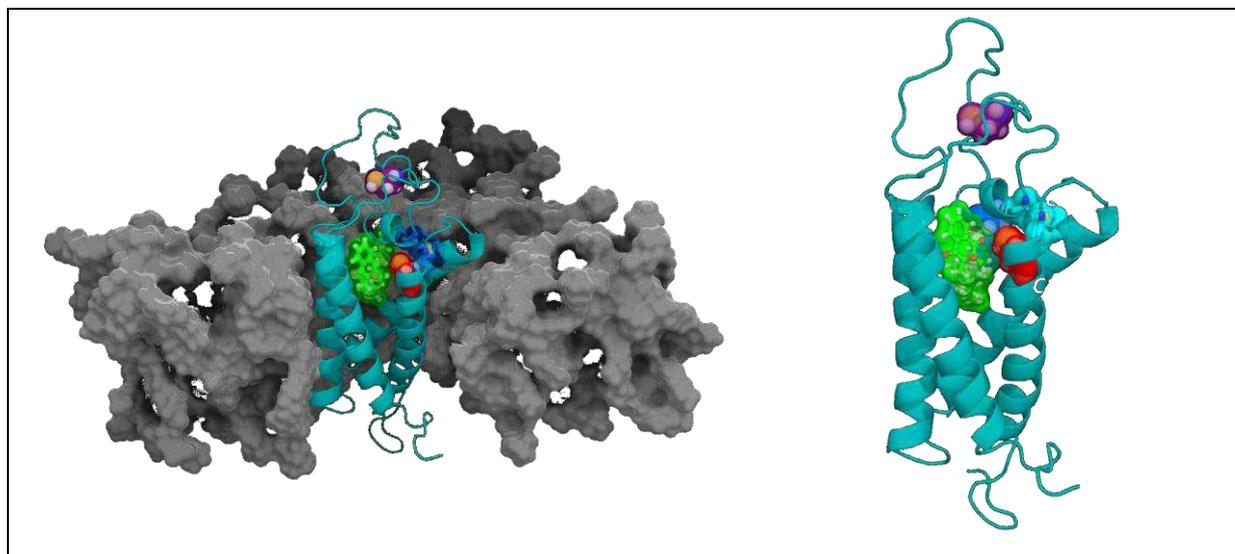
Figure 7 : Le cycle de la Vitamine K (d'après Michaux, A., 2018)

#### b. VKORC1 : un acteur majeur

L'activité vitamine K époxyde réductase (VKOR) a été décrite pour la première fois en 1970 par Bell et Mastschiner, bien avant que le gène VKORC1 responsable en partie de cette activité ne soit identifié en 2004 (Li et al., 2004) (Rost et al., 2004).

Ce gène est localisé sur le chromosome 16 chez l'Homme et 1 chez le rat pour une longueur de 5126 paires de bases et 3 exons. Il code pour une petite protéine, du même nom, de 163 acides aminés pour 18 kDa. Cette protéine membranaire se situe au niveau du réticulum endoplasmique avec ses extrémités N-terminale et C-terminale dans le cytoplasme. Initialement proposée avec 3 domaines transmembranaires (Tie et al., 2005) cette

conformation a été remise en question après avoir identifié par cristallographie une structure 3D à 4 domaines transmembranaires chez un homologue bactérien : *Synéchococcus* sp (Li et al., 2010). Deux topologies légèrement différentes à 4 domaines ont été proposées et des travaux récents de modélisation de deux équipes indépendantes viennent conforter ce résultat (Watzka et al., 2011) (Czogalla et al., 2016) (Chatron et al., 2017) (figure 8).



**Figure 8 :** Modélisation 3D de VKORC1, dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE), à gauche, et seule, à droite (d'après Nolan Chatron)

La VKORC1 est relativement conservée entre les espèces et de nombreux orthologues sont retrouvés aussi bien chez les vertébrés, les insectes, les plantes ou encore les bactéries (Goodstadt and Ponting, 2004). Ces séquences orthologues font toutes apparaître des acides aminés strictement conservés ainsi qu'un motif CXXC (Cys132XXCys135) qui constitue le site actif de l'enzyme en formant le centre d'oxydoréduction (Rost et al., 2005). Les anticoagulants antivitamine K comme la warfarine ou la bromadiolone, en se fixant sur les sites actifs, viennent inhiber VKORC1.

La VKORC1 est l'enzyme clef du cycle de la vitamine K, permettant de régénérer cette vitamine. L'extinction du gène VKORC1 chez la souris entraîne la mort par hémorragie de 50% des individus entre la première et la 3ème semaine. Seule une forte injection quotidienne de vitamine K1 permet de prévenir cette mortalité. Après 2 jours d'arrêt du traitement, le niveau d'activité des facteurs de coagulation devient indétectable et les animaux meurent, là encore, d'hémorragies.

Le mécanisme réactionnel de réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone est complexe et a été proposé pour la première fois en 1981 par Silverman. Dans la forme oxydée de VKORC1, les cystéines 132 et 135 forment un pont disulfure (figure 9).

La première étape consiste en l'activation de l'enzyme via la réduction du pont disulfure par l'action d'une protéine non encore identifiée *in vivo*. *In vitro* cette étape peut être réalisée par un agent réducteur fort comme le dithiolthreitol (DTT) (1).

La vitamine K-2,3-époxyde se fixe sur l'enzyme et l'atome d'oxygène de l'époxyde est alors protoné (2). Dans le même temps, le thiol d'une des 2 cystéines du site actif forme ainsi un adduit covalent par attaque nucléophile sur le carbone 2 de l'époxyde (3).

Le deuxième acide aminé partenaire permet la formation de deux équilibres successifs (4) et (5) pour protoner l'hydroxyle de la vitamine K. Le pont disulfure de VKORC1 en se régénérant conduit au départ d'une molécule d'eau et à la libération de la vitamine K sous sa forme quinone (6).

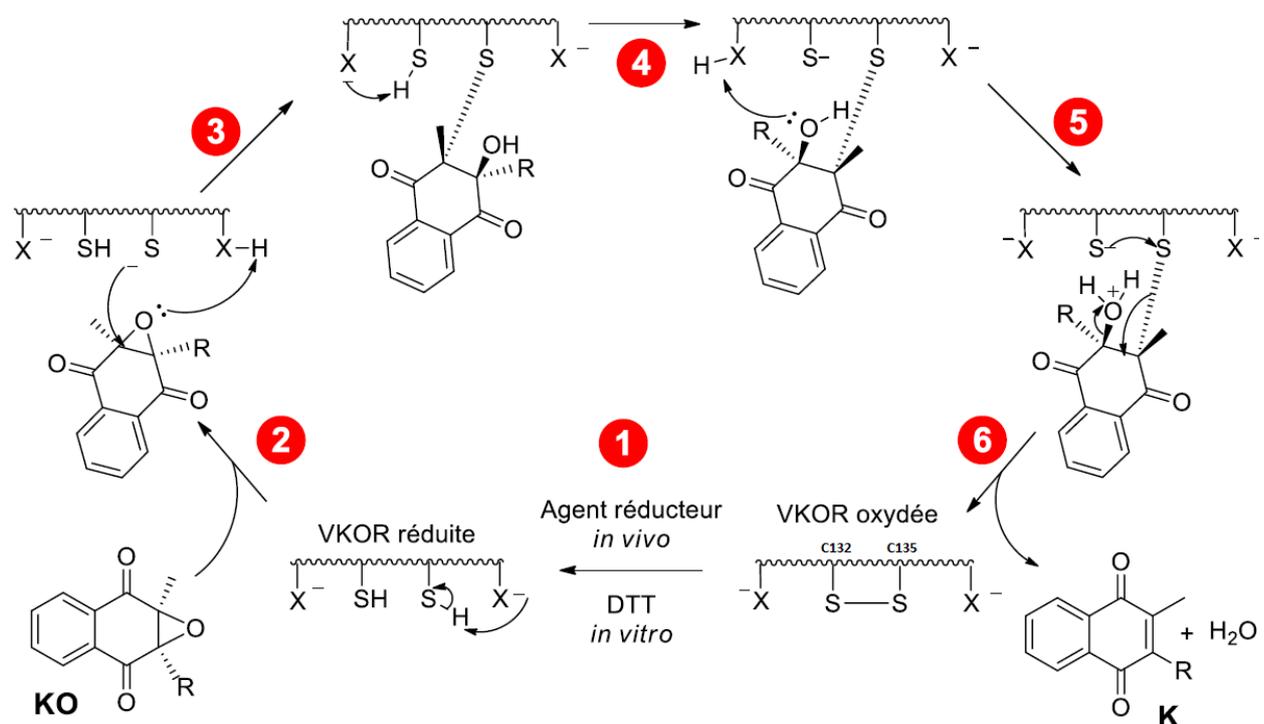


Figure 9 : Mécanisme catalytique de VKORC1. Adapté de « *Chemical model studies for the mechanism of vitamin K epoxide reductase* » (Silverman, 1981).

Ce modèle de mécanisme réactionnel est le seul qui ait été proposé depuis la découverte de VKORC1, mais aucune étude expérimentale n'a permis de le confirmer à ce jour.

### c. VKORC1L1 : un rôle à découvrir ?

En 2004, *Rost et al.* découvrent l'existence d'un gène paralogue à VKORC1 par séquençage systématique du génome humain. Du fait de l'existence de motifs similaires à ceux retrouvés dans VKORC1, ce gène fut nommé *VKORC1L1*, pour *VKORC1-like* numéro 1. Ce gène code pour une enzyme de 176 acides aminés.

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 (figure 10). Ainsi les séquences protéiques sont 100% identiques entre le rat et la souris, et 97% identiques entre l'homme et les rats/souris.

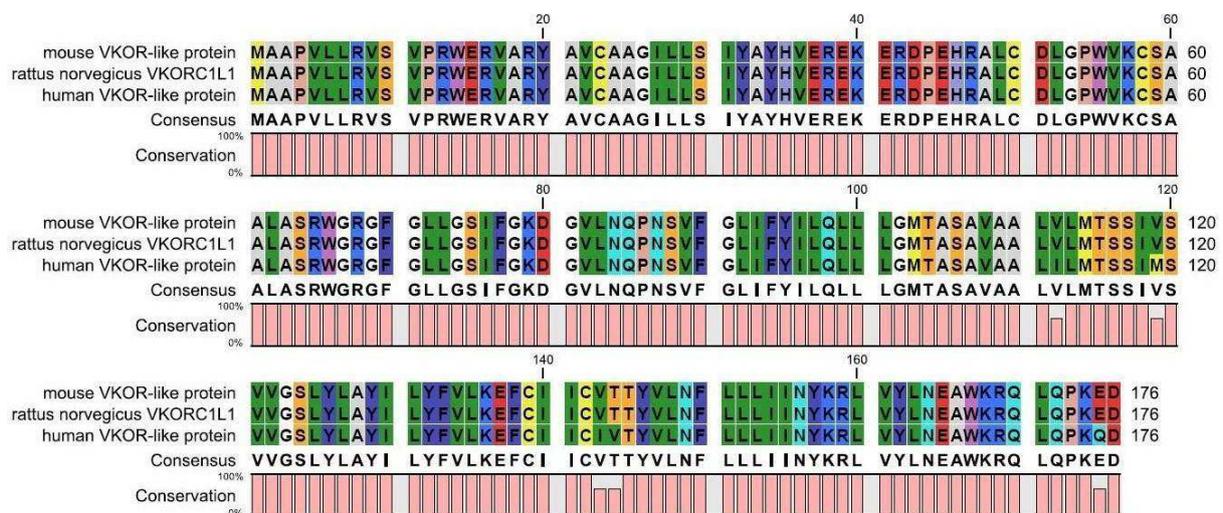
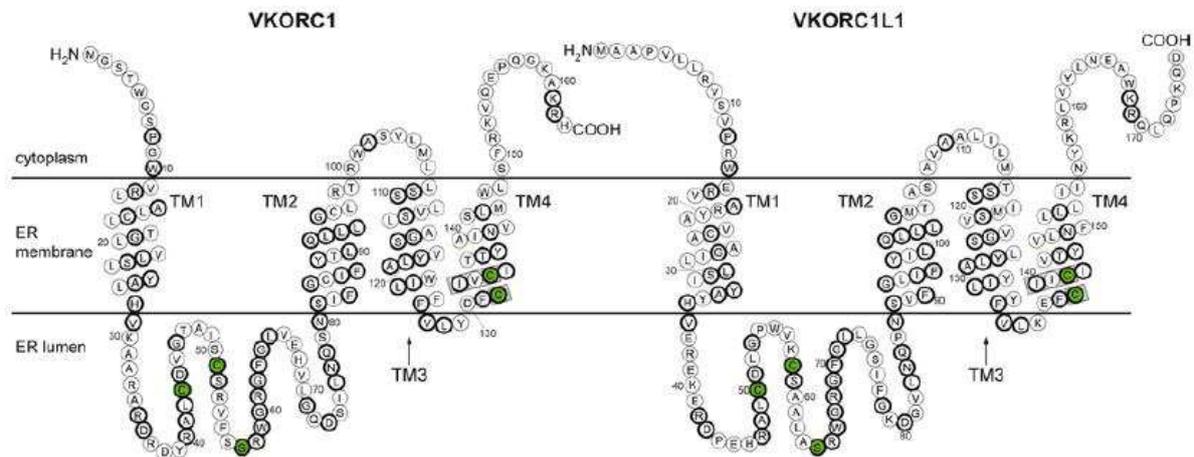


Figure 10 : Homologie des séquences de VKOR-like

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 11).



**Figure 11 :** Topologies de VKORC1 et VKORC1L1 (d'après Oldenburg et al., 2015)

Jusque très récemment, la VKORC1L1 constituait une grande inconnue, tant par son activité, son expression tissulaire, que son rôle physiologique. Peu d'études ont été publiées à ce sujet. Et il reste encore beaucoup à explorer.

Les travaux de Westhofen et al. (2011) ont 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  $\mu$ M de coumafène (dans les mêmes conditions, VKORC1 est inhibée à 50 %). 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.

Czogalla et al. (2018), ont démontré que VKORC1 et VKORC1L1 ont des réponses différentes aux traitements anticoagulants, notamment par des sites de liaison différents, appuyant le fait que la VKOR-like est nettement plus résistante aux anti-vitamine K classiques que la VKORC1 (Hammed A., 2013). Cette thèse a d'ailleurs montré également que l'activité VKOR de VKORC1L1 dans le foie est insignifiante, en opposition à une activité considérable dans les tissus extra hépatiques.

L'étude réalisée par Hammed et al. (2013), démontre, elle, que lorsque VKORC1L1 est exprimée dans un tissu, une plus forte dose d'anticoagulant est nécessaire dans ce tissu afin d'obtenir une inhibition identique à celle observée dans le foie lorsque VKORC1 y est exprimée seule. Cette étude semble montrer que lors d'un traitement anticoagulant à long terme, la vitamine K est recyclée dans différents tissus extra-hépatiques (tels les testicules) par la VKORC1L1, permettant ainsi la synthèse de protéines vitamine K-dépendantes non impliquées dans le phénomène de coagulation, telles que l'ostéocalcine ou la MGP.

Lacombe et al. (2018), ont eux montré que VKORC1L1 assurerait en partie la gamma-carboxylation des protéines vitamine K-dépendantes in vivo.

En effet, leur étude sur des souris génétiquement déplétées en VKORC1 établit que la VKORC1L1 est surexprimée chez ces souris et assure la carboxylation et l'hémostase, tandis que des souris génétiquement privées à la fois de VKORC1L1 et VKORC1 souffrent et meurent d'hémorragies dès la naissance. A noter toutefois que les souris K-O en VKORC1 uniquement finissent par mourir également d'hémorragies, mais au bout de quelques semaines.

## **IV. Mode d'action des AVK**

### **a. Historique**

La découverte des antivitamine K (AVK) s'est faite par hasard. En effet, en 1920, au Canada et au nord des Etats-Unis, des bovins se sont mis à présenter des syndromes hémorragiques spontanés et fatals. 2 ans plus tard, en 1922, le Dr vétérinaire F.W. Scofield montre que ces symptômes sont dus à une consommation de trèfle doux (ou mélilot), importé d'Europe. Il note que ces aliments sont avariés au moment de leur consommation, à

cause du délai d'importation et des mauvaises conditions de conservation. Les hémorragies sont provoquées par une augmentation du temps de coagulation. En retirant cet aliment de la ration quotidienne des bovins, et en réalisant des transfusions, les animaux guérissent (Schofield, 1922).

C'est seulement en 1939 que l'équipe de Karl Paul Link isole la structure cristalline de l'agent responsable de ces hémorragies : la 3,3'-diméthylène-4-hydroxycoumarine, appelée plus simplement dicoumarol. C'est cette molécule qui explique à elle seule le caractère nocif du mélilot avarié, le trèfle doux frais étant inoffensif. Lors de sa dégradation, la coumarine est oxydée en 4-hydroxycoumarine, couplée au formaldéhyde et enfin dimérisée pour produire le dicoumarol (figure 12).

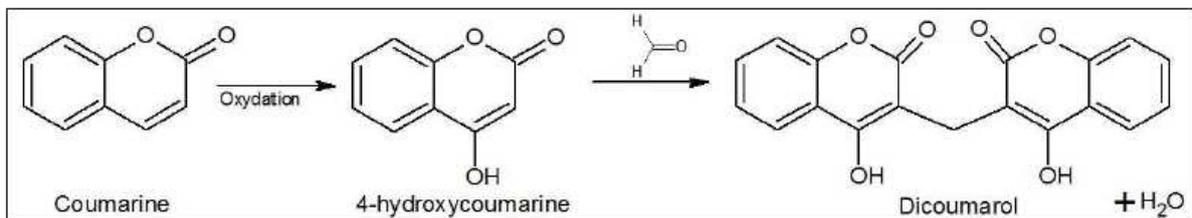


Figure 12 : Formation du dicoumarol

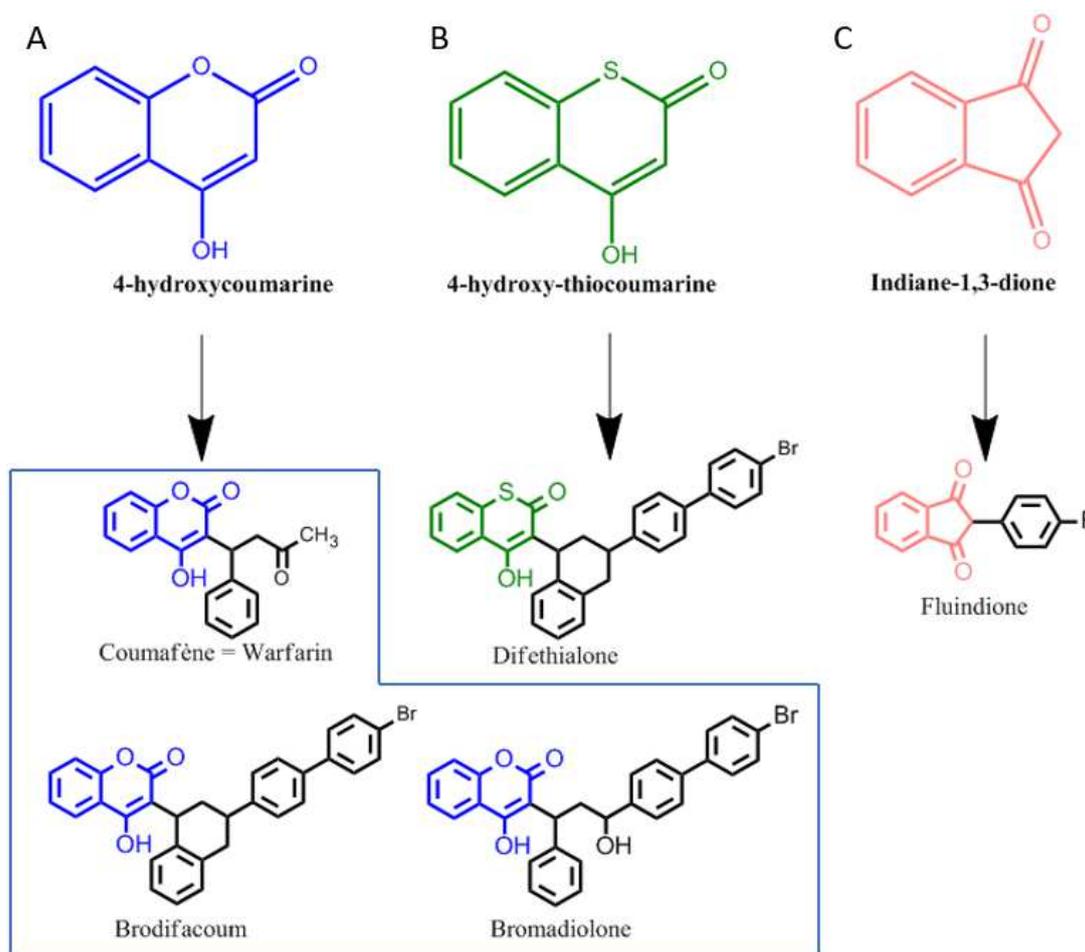
En 1935, Quick développe le test du temps de prothrombine avec ses collaborateurs (Quick et al., 1935). La mise au point de ce test leur a permis de démontrer en 1937 l'augmentation du temps de prothrombine dans la maladie du trèfle doux avarié et dans la maladie hémorragique du poulet. Karl Paul Link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

Synthétisé en 1940 par voie chimique, le dicoumarol est utilisé en médecine humaine comme anticoagulant, mais fut rapidement abandonné au profit du coumafène, un autre AVK présentant lui aussi un noyau coumarinique. Ce dernier est encore très utilisé en médecine humaine, notamment aux Etats-Unis où son faible coût le rend accessible aux personnes ayant une couverture de santé limitée.

## b. Différents AVK

Depuis l'isolement du dicoumarol, de nombreuses molécules AVK ont été synthétisées. Toutes ces molécules peuvent être classées en 3 grandes catégories en fonction de leur structure chimique (figure 13) :

- Les dérivés des 4-hydroxycoumarines parmi lesquels on va retrouver le coumafène et le brodifacoum.
- Un dérivé de la 4-hydroxy-thiocoumarine représenté par la diféthialone.
- Les dérivés de l'indane-1,3-dione parmi lesquels on va retrouver la fluindione.

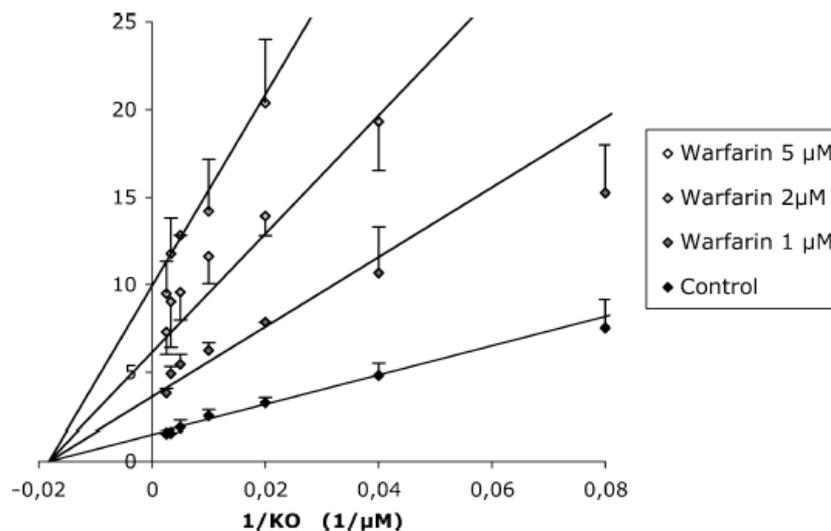


**Figure 13 :** Les principales familles d'AVK et leurs dérivés (d'après Michaux, A., 2018)

Les principaux principes actifs médicamenteux utilisés en France sont le coumafène (Coumadine®), l'acénocoumarol (Sintrom®) et la fluindione (Previscan®). Des dérivés beaucoup plus efficaces ont été développés et utilisés en tant que rodenticides (chlorophacinone, coumatetralyl, bromadiolone, difenacoum, flocoumafène, brodifacoum, diféthialone...).

### c. Inhibition de l'activité VKR

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  $\mu\text{M}$  pour le coumafène (figure 14) 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 fixent 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 14 :** Représentation de Lineweaver et Burk d'une inhibition non compétitive de l'activité VKOR de microsomes de foie de rats sensibles par des concentrations croissantes de coumatetralil (d'après Lasseur et al., 2005)

L'utilisation des AVK a pour résultat le blocage du recyclage 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) (figure 15).

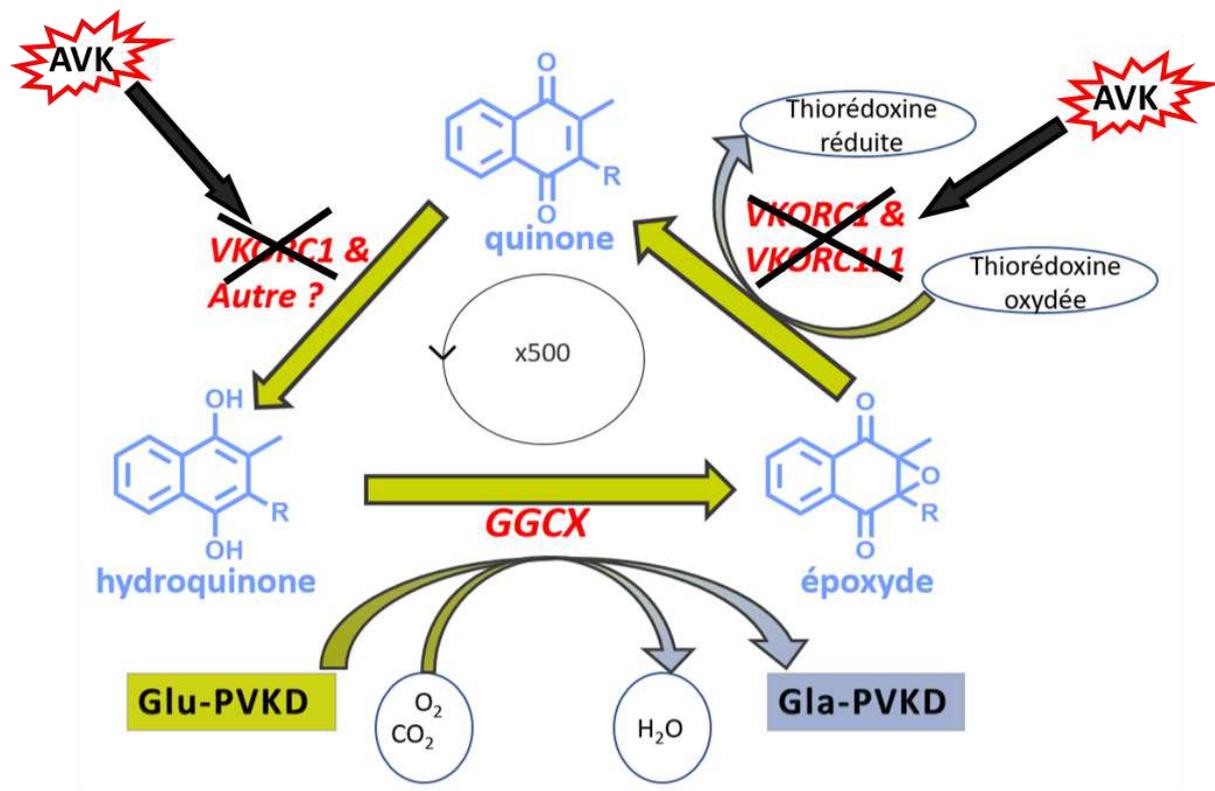


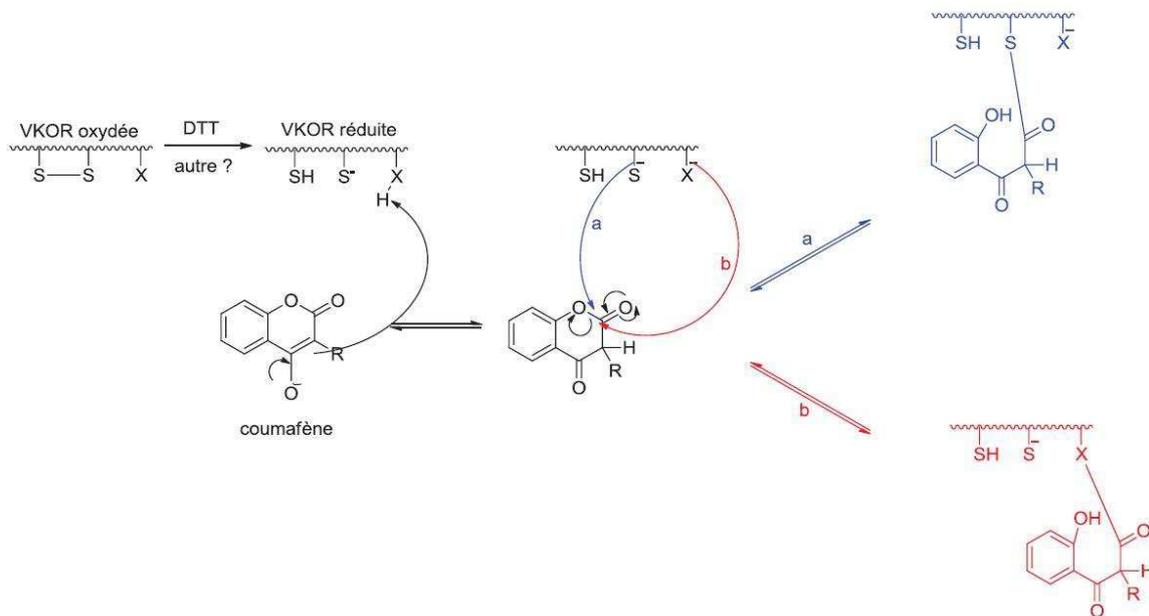
Figure 15 : Action des AVK sur le cycle de la Vitamine K

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 coagulation vitamine K-dépendants restent alors sous forme non-gamma-carboxylée et voient leur activité pro-coagulante fortement diminuée : le calcium ne peut pas être fixé par la pince « di-carboxylique », empêchant ainsi l'interaction avec les phospholipides anioniques plaquettaires. Les AVK induisent ainsi une augmentation du temps de coagulation et retardent la formation de fibrine.

Le dosage dans le plasma des facteurs non gamma-carboxylés (=PIVKA = protein induced by vitamin k antagonist) permet d'identifier un état de subcarence en vitamine K.

Malgré une utilisation intensive partout dans le monde, tant en médecine que comme rodenticide, le mode d'action des AVK reste incertain. En 1980, Silverman a proposé un mécanisme d'inhibition qui implique une acylation par l'inhibiteur d'une des 2 cystéines du site catalytique de VKOR ou éventuellement d'un acide aminé nucléophile proche dans

l'espace (figure 16). Le thioester ainsi formé rendrait compte du caractère irréversible de l'inhibition et de son caractère non compétitif. Cependant, l'instabilité relative de ce thioester rendrait sa mise en évidence difficile à pH neutre.



**Figure 16 :** Mécanisme d'inhibition de VKORC1 (d'après Silverman, 1980)

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

## V. Résistance aux AVK

### a. Mutations de VKORC1

#### Résistance chez le rongeur

Les rongeurs, et plus particulièrement les rats, ont été de tous temps assimilés aux grandes épidémies et ont fait l'objet d'une véritable lutte à travers le monde pour contrôler leur population disséminée aussi bien dans les zones urbaines que rurales.

Et pour cause, les rats sont directement responsables de la peste qui a frappé l'Europe au XIV<sup>ème</sup> siècle et qui fit des millions de morts. De manière plus générale, les rongeurs sont

porteurs de plus de 40 zoonoses différentes comme la leptospirose ou le thyphus murin qui peuvent elles aussi s'avérer mortelle. De plus, étant des animaux commensaux, les rongeurs génèrent des dégâts colossaux au niveau des réserves céréalières par leur consommation ainsi que par la contamination via leurs déjections au niveau des stocks, rendant les produits impropres à la consommation. Avec une population estimée à 10 milliards, les rats constituent un tiers de la population de mammifères du monde. On évalue aujourd'hui que les ravages perpétrés pourraient nourrir plus de 600 millions de personnes à travers le monde par an, il semble donc évident que la lutte contre les rongeurs représente un enjeu de taille.

Mais l'utilisation accrue des anticoagulants rodenticides a permis la sélection de rongeurs possédant des parades très efficaces face aux produits utilisés dans cette lutte. On observe alors ce que l'on nomme un phénomène de résistance chez ces animaux les rendant insensibles aux AVK et nécessitant une innovation constante pour développer de nouvelles molécules toujours plus efficaces.

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. 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 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 des 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.* ».

## **Historique**

C'est en 1958 que fut signalée pour la première fois en Ecosse (Boyle, 1960), dans une ferme des faubourgs de Glasgow, l'apparition de cas de résistance aux rodenticides de type AVK. La Grande Bretagne avait développé au début du siècle un contrôle massif des populations de rongeurs en raison de la nécessité de conserver des stocks alimentaires durant les deux guerres mondiales. Lors de la mise sur le marché des anticoagulants en 1953, ceux-ci prirent un ascendant rapide sur les toxiques aigus comme la strychnine. La

Grande Bretagne connut alors une longue suite de traitements à base de coumafène principalement. Ce composé était alors employé à des concentrations de 0.005 % et 0.025 % contre le rat brun.

Les études menées sur des rats capturés en Ecosse montrèrent une aptitude des rongeurs à survivre à des quantités d'anticoagulants considérables et en tout cas bien supérieures à la quantité normalement mortelle.

Le second pays à être touché par la résistance fut le Danemark en 1962. Les piégeages dans une zone couvrant 9000 km<sup>2</sup> montrèrent que 24.2 % des rats étaient résistants (Lund, 1967). En 1972, l'emploi du coumafène fut interdit sur l'ensemble du Jutland. Il fut remplacé par le coumatétralyl, qui fut efficace sur 50 à 70 % des rats résistants.

En 1966 c'est au Pays-Bas qu'une résistance du rat brun fut mise en évidence, plus précisément dans la province de Drenthe au nord-est du pays. Les précautions prises entraînèrent la réalisation de traitements rapides. Le coumafène fut remplacé par du coumatétralyl, puis par le fluoroacétamide (Ophof et Langevelt, 1969).

En 1968 c'est au tour de l'Allemagne Fédérale. En 1971 les Etats Unis apparaissent sur la carte des pays contenant des rats résistants, plus précisément en Caroline du Nord (Jackson et Kaukeinen, 1972). Deux ans plus tard, des populations résistantes ont été détectées dans 11 des 39 plus grandes villes des USA.

Par la suite, on a pu également mettre en évidence l'apparition de résistance au Japon et en Australie ainsi que dans le sud-est de l'Asie (Jackson et Ashton, 1986).

La France ne fut pas épargnée par le phénomène de résistance. En 1970, un cas de résistance au coumafène dans une colonie de *Rattus rattus* a été rapporté à Marseille (Desideri *et al.*, 1978).

Face aux problèmes d'inefficacité du coumafène et des anticoagulants de première génération, des composés plus puissants ont été développés dans les années 1970 et 1980, tout d'abord le difénacoum et la bromadiolone, puis plus tardivement le brodifacoum, le flocoumafène et la diféthialone (ces composés ne nécessitant qu'une seule ingestion pour être mortels). Cependant, des résistances à la plupart de ces composés ont été rapportées peu de temps après leur introduction (Rowe *et al.*, 1981 ; Greaves *et al.*, 1982 ; MacNicoll et Gill, 1987). De manière générale, ces cas de sensibilité réduite concernent des populations

de rongeurs qui étaient largement connus pour être déjà hautement résistants aux anticoagulants de première génération (Lund, 1981, MacNicoll et Gil, 1987).

Actuellement de nombreuses questions se posent sur la réalité de ces résistances aux anticoagulants de seconde génération. La résistance aux AVKs n'a jusqu'à présent été confirmé que pour trois espèces de rongeurs. *Rattus norvegicus* (rat brun), chez lequel fut découvert le phénomène, *Rattus rattus* (rat noir) et *Mus musculus domesticus* (souris domestique).

En France, ces trois espèces de rongeurs sont présentes. Dans les années 1950, le rat noir (*Rattus rattus*) était l'espèce qui, en nombre d'individus, était dominante sur tout le territoire. Depuis les années 1980, le rat brun (*Rattus norvegicus*) a connu une expansion fulgurante et est, de ce fait, devenu l'espèce principale sur le territoire français. Il semble que la population de rat noir ait connu un déclin parallèle et qu'elle soit maintenant cantonnée dans le sud de la France.

Concernant la souris domestique, elle connaît aussi une dynamique de population très importante. On retrouve cette espèce dans des environnements très variés, sachant tout de même que la cohabitation avec des populations de rats est très rare. Cette espèce est maintenant très représentée en milieu urbain et c'est elle qui semble poser, actuellement, le plus de problèmes, en termes de dégâts et en terme de difficulté d'éradication.

### **Mécanisme de la résistance aux AVK**

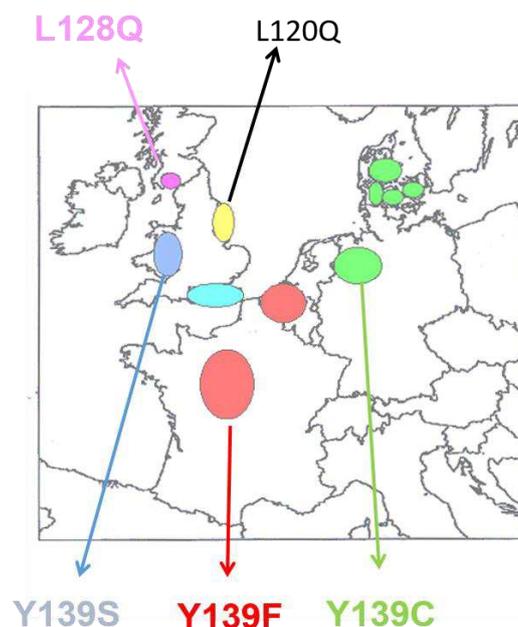
La résistance génétique chez le rat est principalement due à deux mécanismes :

- la résistance de cible c'est-à-dire l'inefficacité vis-à-vis de VKORC1, la cible des AVK.
- la résistance métabolique c'est-à-dire 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 présentait 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 (figure 17).

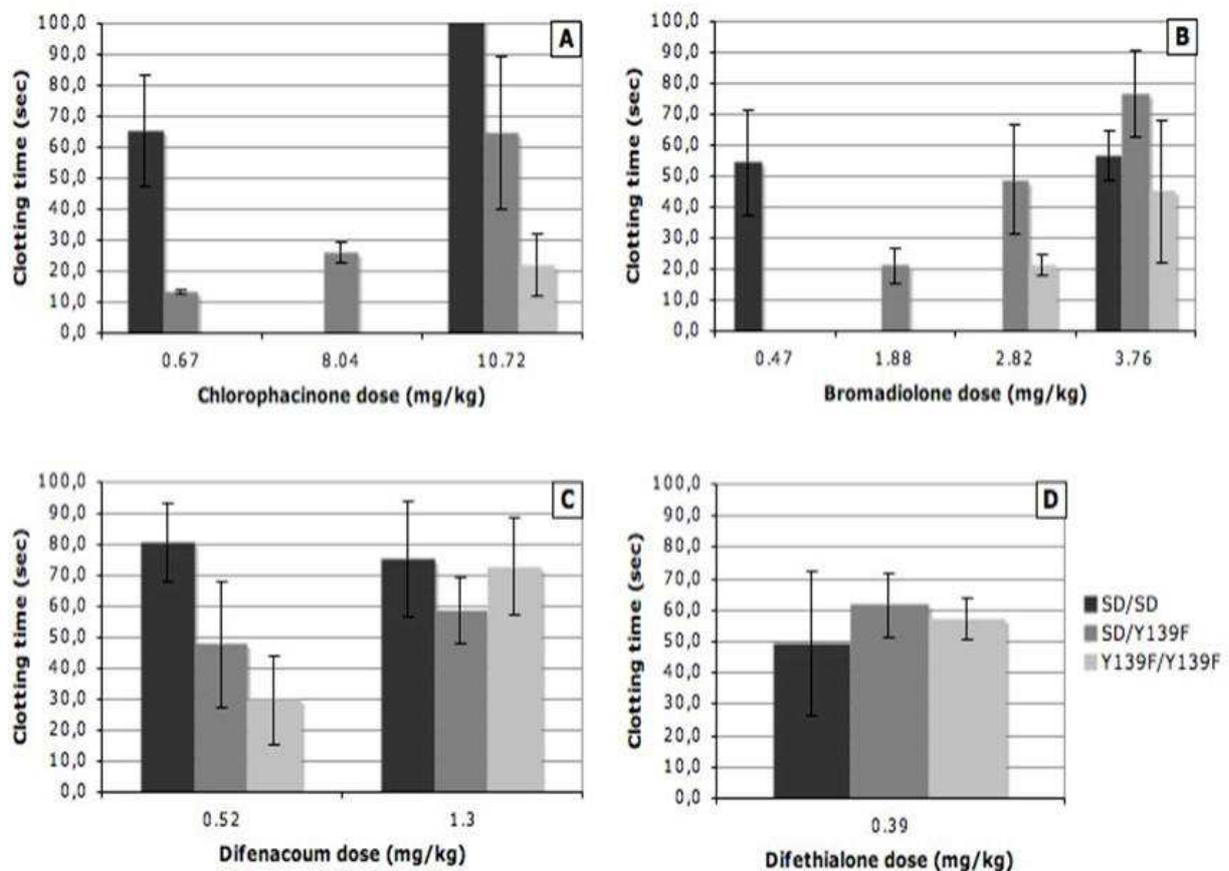
Par la suite, cette répartition devint plus compliquée (Grandemange *et al.*, 2010). En effet, l'étude de la distribution de la résistance en France couplée au génotypage de *vkorc1* permit de montrer la complexité de la répartition géographique des mutations. Ainsi Y139F est la mutation principale retrouvée en France, mais d'autres mutations sont présentes sur le territoire, comme Y139C, qui nous intéressera dans ce travail.



**Figure 17 :** Répartition géographique des différentes mutations (d'après E. Benoit)

Afin d'évaluer l'implication de ces SNP (Single nucleotide polymorphism) 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 (figure 18). Néanmoins, l'expression en cellules HEK étant faibles, l'exploration fonctionnelle a été très limitée (une seule concentration de coumafène à 60  $\mu$ 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'introgression 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.



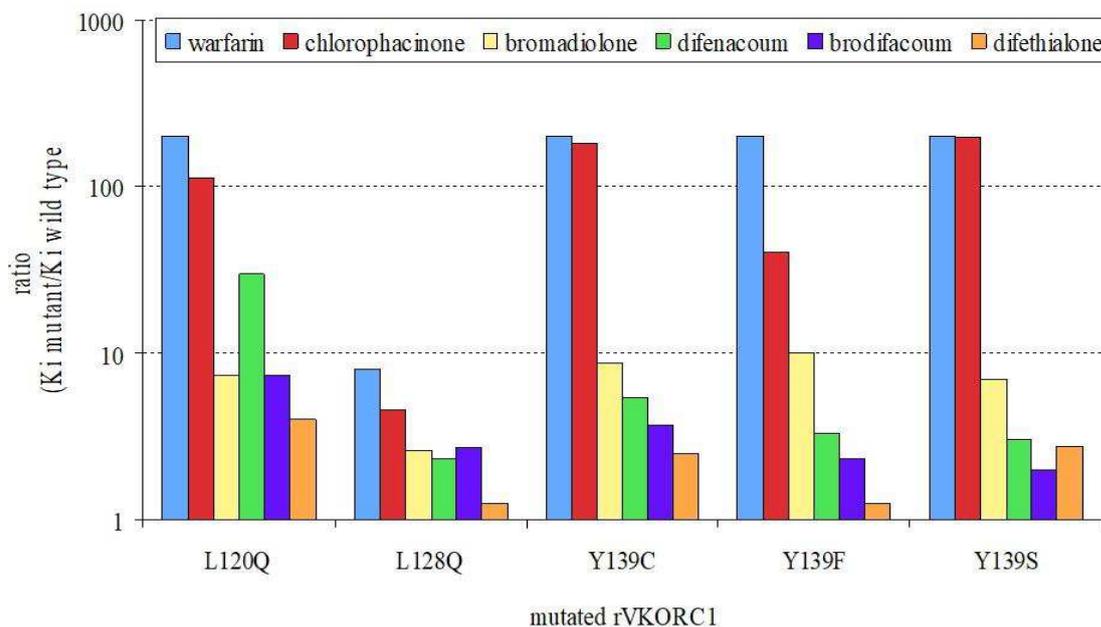
Grandemange *et al.* *Pharmacogenet. Genomics*, 2009

**Figure 18 :** Temps de prothrombine comparés face à différents anticoagulants, pour différents phénotypes issus de la mutation Y139F

La même étude a été réalisée les mutations Y139C et L120Q. Ces lignées démontrent le rôle causal de ces mutations dans le phénomène de la résistance des rongeurs.

L'expression de VKORC1 recombinante a également été utilisée pour évaluer les conséquences des mutations du gène VKORC1 retrouvées chez les rongeurs.

Les 3 principales mutations décrites chez le rat, Y139F, Y139C et L120Q ont été évaluée en système *Pichia pastoris* (figure 19). Les constantes d'inhibition obtenues in vitro sont très proches des facteurs de résistance observés in vivo sur les animaux des lignées introgressées.



**Figure 19 :** Utilisation des protéines recombinantes exprimées en *Pichia pastoris* pour l'évaluation du rôle des mutations du gène VKORC1. Rapport des constantes d'inhibition observées pour un AVK pour une mutation sur la constante d'inhibition observée pour la forme non mutée.

Les mutations analysées modifient non seulement la sensibilité de VKORC1 aux AVKs mais aussi diminuent fortement l'efficacité enzymatique de VKORC1. De plus, ces mutations provoquent l'apparition d'un métabolite de la vitamine K époxyde inattendu, la vitamine K hydroxylée en 3. Ce métabolite est éliminé et participe à la déplétion du cycle de la vitamine K. Les animaux porteurs de cette mutation présentent ainsi, en l'absence de supplémentation alimentaire par de la vitamine K3 une subcarence en vitamine K (figure 20).

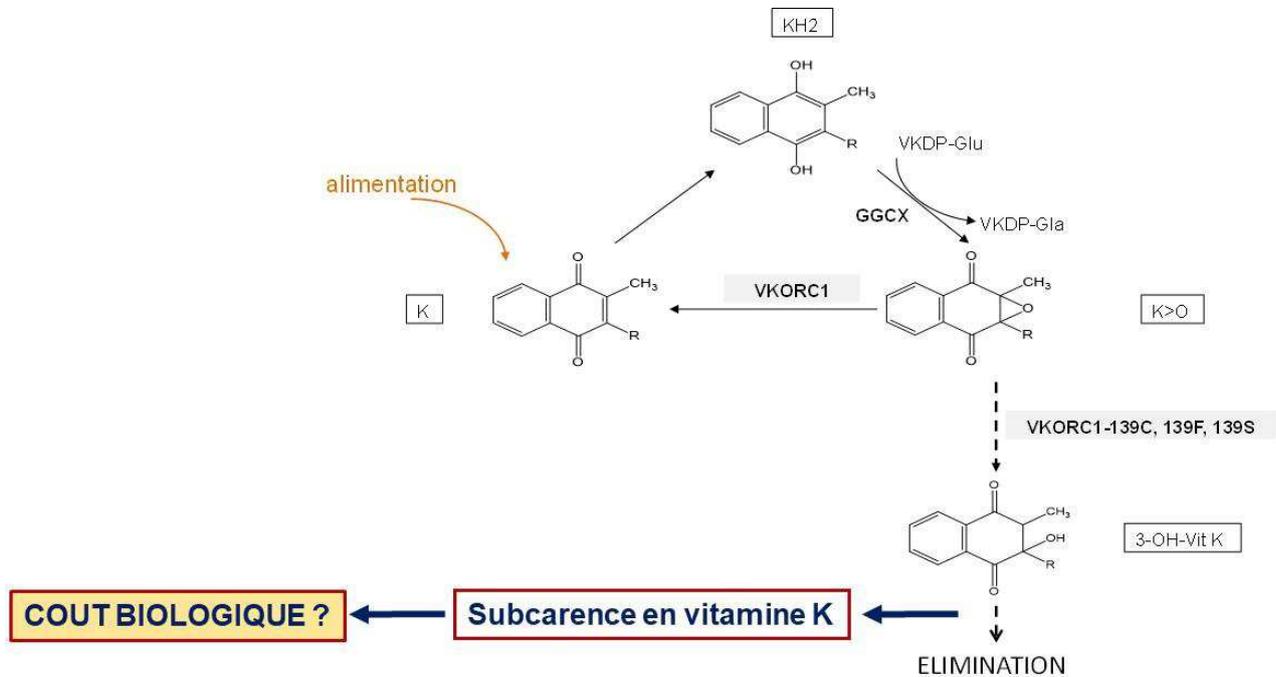


Figure 20 : Schéma explicatif de la formation de vitamine K hydroxylée en 3 induisant une subcarence en vitamine K

#### b. VKOR-like : une résistance supérieure

Les études réalisées sur VKORC1L1 jusqu'à présent s'accordent à dire que cette enzyme semble significativement plus résistante que la VKORC1 pour la plupart des AVK classiquement utilisés (Czogalla et al., 2018, Hammed et al., 2013) (tableau 1).

Tableau 1 : Quelques exemples d'inhibition comparée de VKORC1 et VKORC1L1 (d'après Czogalla et al., 2018)

Molécule anticoagulante	IC50 de VKORC1 (nM)	IC50 de VKORC1L1 (nM)
Warfarin (coumafène)	1.9 (1.8-2.1)	25.2 (23.1-27.4)

Dicoumarol	5.0	100.0
Fluindione	4.8 (4.3-5.2)	268.5 (198.4-363.4)

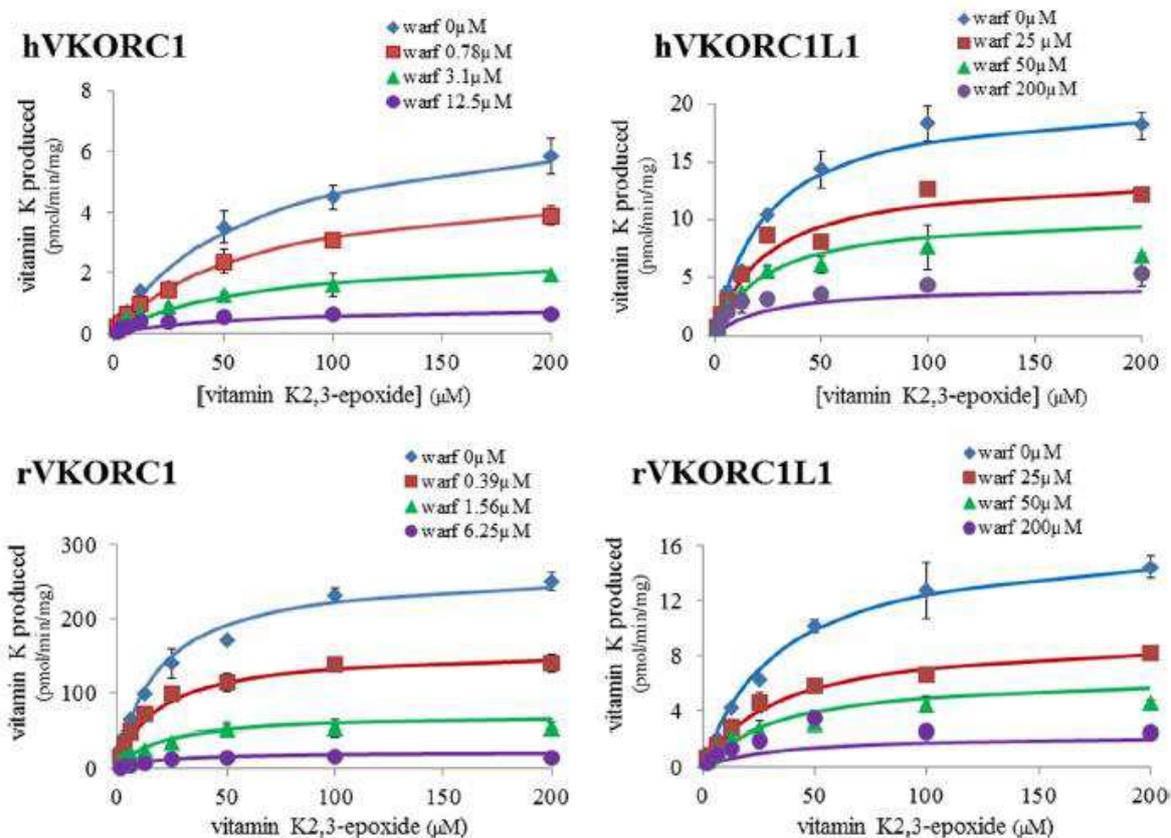


Figure 21 : Comparaison d'inhibition de l'activité de VKORC1 et VKORC1L1 par différentes concentrations de warfarine (d'après Hammed et al., 2013)

Le constat majeur est que la VKORC1L1 est en général nettement plus résistante que VKORC1 sauvage. Or, nous verrons dans la partie suivante que le but de ce travail est de réaliser une inhibition sélective de la VKOR-like et non de la VKORC1. Ce qui apparaît compliqué avec une sensibilité très supérieure de VKORC1 aux AVK courants.

Il nous est alors apparu que le moyen le plus simple de réussir à réaliser une inhibition sélective, compte-tenu de ce qui a été vu dans la section précédente, serait de comparer l'inhibition de l'activité de VKORC1L1 à celle d'une VKORC1 mutée.

## Partie II : Partie expérimentale



## I. Objectif(s) de l'étude

Le ou les rôle(s) de la VKOR-like dans l'organisme sont encore inconnus. L'objectif de ce travail est donc d'identifier les fonctions de cette enzyme, et ce, en réalisant une inhibition sélective. C'est-à-dire que l'on souhaite trouver des inhibiteurs spécifiques de la VKOR-like qui n'inhibent pas VKORC1. On pourrait ainsi, après synthèse – si cela est possible – de ces inhibiteurs potentiels, inhiber les fonctions de VKORC1L1 dans des populations de rats dès leur naissance, afin d'identifier les troubles physiologiques que cela entrainerait au sein de leurs organismes.

La difficulté principale qui se pose est que la VKORC1 sauvage est inhibée par la plupart des anticoagulants. Aussi avons-nous décidé de réaliser nos tests de comparaison d'inhibition non pas avec VKORC1 sauvage mais avec la VKORC1 mutée Y139C. Celle-ci étant résistante à de nombreux AVK, il sera beaucoup plus aisé de réaliser une inhibition comparative entre Y139C et la VKOR-like. De plus, dans la mesure où le laboratoire dans lequel j'ai réalisé mes travaux (USC 1233 de l'INRA) possède une lignée de rats de type Sprague Dawley introgressée avec le gène VKORC1 muté Y139C il sera ainsi facile de réaliser dans l'avenir des tests sur cette lignée de rats mutés.

Afin d'être efficace, la recherche d'une molécule efficace se fera par screening d'une banque de molécules, synthétisées par Mme Florence POPOWYCZ de l'INSA de Lyon, d'abord par une estimation de l'IC50 puis par une détermination précise de la constante d'inhibition des molécules semblant réaliser un knock-out acceptable de VKORC1L1.

## II. Matériels et méthodes

### Caractérisation de l'activité enzymatique de la VKORC1-Like

La séquence nucléotidique codant la protéine VKORC1-like de rat (ou de souris en raison d'une identité de 100% entre les séquences en acides aminés) a été optimisée par GenScript USA Inc. (Etats-Unis) afin d'éviter au maximum les codons rares et de permettre une expression élevée dans la levure *Pichia Pastoris*. Ce gène synthétique fusionné à une séquence codant l'épitope c-myc a ensuite été synthétisé par GenScript USA Inc, puis inséré dans le vecteur pPICZ-B par utilisation des sites de restriction EcoRI et XbaI. Le vecteur

pPICZ-B-VKORC1L1 a ensuite été amplifié, puis purifié par utilisation du kit de midi-préparation de Qiagen (Courtaboeuf, France). L'ensemble de ces travaux a été effectué avant mon arrivée au laboratoire.

#### a. Transformation des levures *Pichia pastoris*

Afin d'exprimer la protéine rVKORC1-L1 par la levure *pichia pastoris*, le gène codant la protéine d'intérêt doit être introduit dans le génome de la levure. Ceci est réalisé par transformation des levures compétentes SMD 1168 puis recombinaison. Les levures compétentes sont transformées grâce au kit de transformation *Pichia EasyComp*<sup>TM</sup> (Invitrogen, Gröningen, Pays-Bas), selon les instructions du fournisseur.

Pour cela, le plasmide (5 µg) est préalablement linéarisé à l'aide d'une enzyme de restriction Pme I (20 unités) durant 4h à 37°C. L'ADN plasmidique est ensuite précipité en présence d'éthanol absolu à -20°C pendant 12 heures, puis récupéré par centrifugation à 13 000g pendant 20 min. Le culot d'ADN plasmidique est ensuite lavé par ajout d'éthanol à 70%, puis re-précipité par centrifugation à 13 000 g pendant 20 min et séché sous-vide.

Les étapes suivantes sont ensuite effectuées en conditions stériles assurées par l'utilisation d'un bec bunsen. Le culot d'ADN plasmidique est resuspendu dans 5 µL d'eau stérile, puis mis au contact de 50 µL de levures *Pichia pastoris*, préalablement rendues compétentes. 1 mL de solution 2 (il s'agit d'une solution de polyéthylène glycol) est ajouté et l'ensemble est incubé 1h à 30°C tout en inversant les tubes toutes les 15 minutes. La transformation est ensuite 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 composé de 1 % (p/v) d'extrait de levure, de 2 % (p/v) peptone, et de 2 % (p/v) D-glucose), puis placées sous agitation à 30°C pendant environ 3 heures. Les levures sont alors collectées par centrifugation à 3 000 g pendant 5 min, lavées par 2 rinçages successifs avec la solution 3 (solution saline disponible dans le kit de transformation). Après resuspension dans la même solution saline, les levures sont ensuite 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 décrit ci-dessus.

## b. Mise en culture des levures

La levure *Pichia pastoris* est une levure méthylotrophique, c'est-à-dire qu'elle est capable d'utiliser le méthanol comme seule source carbonée *via* l'alcool oxydase, première enzyme de la voie de métabolisation du méthanol. Son expression est contrôlée par le promoteur du gène *aox1*, fortement et exclusivement inductible par le méthanol. Le gène codant la protéine d'intérêt est également sous contrôle du promoteur *aox1*. Le méthanol permet donc d'induire l'expression de la protéine recombinante, ici la VKORC1L1.

Les levures sont cultivées dans du milieu BMGY constitué de 1 % d'extrait de levure, de 2 % de peptone, de 0,1 M de phosphate (pH 5,0), de 1 % de glycérol et de 1,34 % de *Yeast Nitrogen Base* (YNB) pendant environ 48 h sous agitation à 30 °C, en ajoutant 2% de glycérol toutes le 5 à 6h. Les levures sont alors centrifugées à 3 000 g pendant 10 min à température ambiante, puis 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 (figure 22) et la production de la protéine d'intérêt est induite par ajout de méthanol (1 %) matin, midi et soir. Après 48h d'induction, les levures sont collectées par centrifugation et stockées à -20°C.



Figure 22 : Levures sous agitation à 30°C

### c. Préparation des fractions microsomales de levures recombinantes

La protéine VKORC1 étant une protéine membranaire, insérée dans la membrane du réticulum endoplasmique, on suppose qu'il en est de même pour la VKORC1-like, du fait de leur forte homologie. A partir des levures recombinantes cultivées, la fraction microsomale (correspondant à des vésicules de fragments de réticulum endoplasmique) est donc préparée selon le même protocole mis en place pour l'étude de la rVKORC1.

Brièvement, les culots de levures sont repris dans du tampon de broyage 50 mM de phosphate de potassium (pH 7,4) contenant du KCl 1,15%. Les levures sont ensuite broyées à l'aide d'un broyeur Brandt par des billes de zircon mises sous agitation constante à 3500 rpm durant 15 min à 4°C. Le lysat est ensuite centrifugé à 10 000 *g* durant 10 min à 4°C, ce qui permet l'élimination des débris cellulaires, des noyaux et des mitochondries. Le surnageant est ensuite centrifugé à 100 000 *g* pendant 1 h à 4°C. Les microsomes (culot) sont ensuite repris et homogénéisés dans un tampon 50 mM HEPES (pH 7,4) contenant du glycérol 20%. Les microsomes sont ensuite aliquotés dans des tubes Eppendorf et conservés à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

Toutes ces étapes sont schématisées de manière plus simple dans l'annexe I.

### d. Dosage de la concentration protéique des fractions microsomales

Le dosage des protéines s'effectue selon la méthode de Bradford. Il s'agit d'un dosage colorimétrique basé sur le changement d'absorbance à 595nm du bleu de Coomassie G250, après complexation avec les acides-aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présent dans la ou les protéines. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de colorant lié, et donc à la concentration des protéines présentes dans l'échantillon. Cette méthode est très sensible puisqu'elle permet de détecter de 2 à 5µg de protéines, et elle est aussi très rapide.

La concentration en protéines est calculée par rapport à une gamme d'albumine sérique bovine (BSA, fraction V, Sigma) de 0 à 10 µg traitée dans les mêmes conditions que les échantillons. La gamme est réalisée en double.

Les échantillons sont dilués de façon à ce que l'absorbance après ajout du réactif de Bradford soit compris dans la gamme (dilution au 1/25<sup>ème</sup>). Deux prises d'essais (10 et 20 µL) sont systématiquement réalisées, puis complétées à 100µL avec de l'eau. 1 mL de Réactif de Bradford est ensuite ajouté. Après au moins 10 minutes d'incubation (la coloration étant stable pendant 1 heure) la lecture des absorbances est réalisée à 595 nm sur un spectrophotomètre UV-visible. La concentration protéique des échantillons est déduite de la gamme d'étalonnage.

e. [Analyse par western blot de l'expression de la protéine recombinante rVKORC1-like dans la fraction microsomale](#)

Electrophorèse : Le Western Blot est réalisé après séparation des protéines microsomales (25 µg de protéines totales déposés par puits) en fonction de leur masse moléculaire, par électrophorèse sur gel dénaturant de polyacrylamide (12 % pour l'analyse de la VKORC1-like, dont le poids moléculaire est d'environ 20kDa) dans des conditions réductrices (en présence de β-mercaptoéthanol).

Préparation des échantillons : Les échantillons sont dilués dans du bleu de Laemmli, de façon à obtenir des concentrations finales de 2,5 µg/µL. Les protéines sont ensuite dénaturées et linéarisées par ébullition (permettant la rupture des liaisons faibles intramoléculaires), par action conjointe de β-Mercaptoéthanol (permettant la réduction des ponts disulfures) et de Sodium-dodécyl-sulfate (permettant de charger les protéines négativement), puis séparées au sein du gel par action d'un champ électrique (80V pendant 15 min, puis 160V pendant environ 45 min).

Transfert : Le Western Blot consiste à transférer les protéines présentes sur un gel d'électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose ou de Polyvinylidène fluoride (PVDF) de chez Millipore™.

Immunorévélation : La membrane obtenue subit alors divers traitements immunochimiques. Cette méthode permet la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique. Il est possible grâce à cette technique de détecter la présence et l'expression d'une protéine dans un tissu, mais également d'évaluer sa taille, sa concentration, les variations de cette concentration, effectuer des comparaisons de concentrations entre différents groupes, etc.

Les rVKORC1 et rVKORC1-like étant exprimées sous forme de protéines de fusion avec l'épitope c-myc, la détection est réalisée à l'aide d'un anticorps spécifique anti-cmyc. L'utilisation du même anticorps pour l'étude des VKORC1 et VKORC1-like permettra la normalisation des constantes catalytiques  $V_{max}$  et donc leur comparaison.

Après transfert, la membrane est immédiatement plongée dans une solution saturante de PBS (*Phosphate Buffer Saline*) contenant 5% de lait, afin de saturer l'ensemble des sites de la membrane sur lesquelles aucune protéine ne s'est fixée. Après rinçage dans du PBS, la membrane est mise au contact du premier anticorps dilué 10 000 fois (anticorps polyclonaux de souris anti-c-myc, Invitrogen) pendant une nuit à 4°C. Après une série de rinçage dans du PBS-T (*Phosphate Buffer Saline Tween*), la membrane est hybridée avec le second anticorps dilué 5 000 fois dans du PBS-lait 5% (anticorps anti-immunoglobulines de souris conjugués à la phosphatase alcaline, Sigma, St Quentin Fallavier, France) pendant 1 h.

Enfin, après plusieurs rinçages dans le PBST et un rinçage dans l'eau, la révélation se fait en mettant en contact la membrane avec une solution de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT), substrat de la phosphatase alcaline. Après hydrolyse, le produit insoluble, présentant une coloration bleu/violet, précipite sur la membrane en lieu et place de la cible. La membrane est lavée pendant quelques secondes dans du méthanol pour éliminer les bruits de fond avant d'être séchée sur papier filtre (annexe II).

f. [Activité enzymatique de la protéine recombinante VKORC1-like exprimée dans la fraction microsomale](#)

L'activité de la protéine recombinante rVKORC1-like a systématiquement été caractérisée comparativement à la rVKORC1.

L'incubation standard est réalisée dans un tampon Hepes 200 mM (pH 7,4) contenant du KCl 150 mM, en présence d'un agent réducteur, le dithiothréitol (1 mM), de 20-50 µg de fractions microsomales et du substrat de la réaction, l'époxyde de vitamine K (200 µM pour une réaction standard) dans un volume final de 1 mL. Le mélange est incubé pendant 30 min à 37°C et la réaction est arrêtée par ajout de 4 mL d'un mélange isopropanol/hexane (1 : 1). Le mélange réactionnel est alors centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm.

La phase organique est collectée, puis évaporée à sec sous azote. Le résidu sec est immédiatement repris dans 200µl d'isopropanol. Le produit de la réaction, c'est-à-dire la vitamine K, est ensuite analysé par LC/MS.

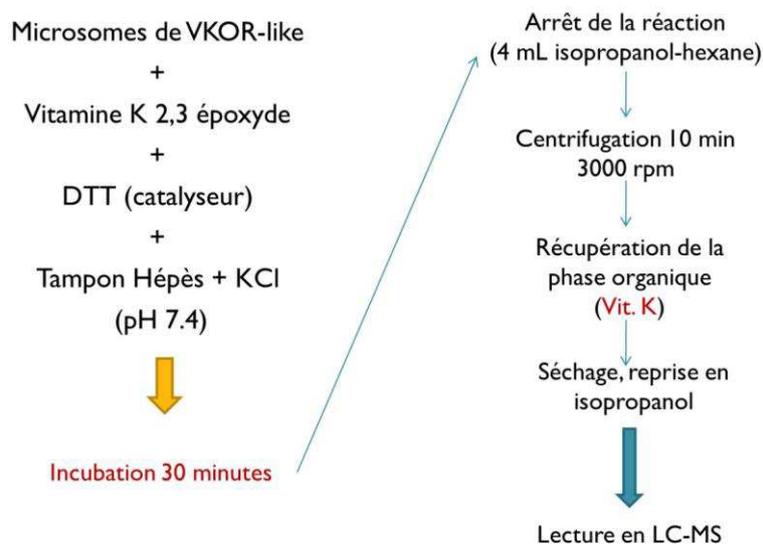


Figure 23 : Schématisation des expériences d'activité enzymatique

La détermination des constantes cinétiques  $K_m$  et  $V_{max}$  est réalisée par mesure de l'activité dans les conditions standard décrites précédemment après addition de concentrations croissantes de substrat KOX (de 0 à 200 µM). Les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  sont évaluées à l'aide du logiciel d'ajustement non linéaire, SigmaPlot 9.0 (Erkraft, Allemagne) à partir de l'équation de Michaelis-Menten :

$$V = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$$

où  $V$  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.

#### g. [Inhibition de la VKOR-like](#)

Les anticoagulants étant des inhibiteurs non-compétitifs de la VKORC1 et de la VKORC1-like (après vérification de la non-compétition de l'anticoagulant vis-à-vis de cette

enzyme, par réalisation de cinétique enzymatique en fonction de la concentration de substrat en présence de différentes concentrations d'anticoagulants), la détermination des constantes d'inhibition  $K_i$  est réalisée par mesure de l'activité dans les conditions standard décrites précédemment après addition de concentrations croissantes d'inhibiteur.

Les valeurs de  $K_i$  sont évaluées par régression non-linéaire à partir de l'équation d'inhibition non-compétitive :

$$v = \frac{V_{max}}{1 + [I]/K_i} \times \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

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

### III. Résultats

Nous avons dans un premier temps vérifié la fonctionnalité de nos préparations de microsomes de levures recombinantes exprimant VKORC1L1. La production de Vitamine K quinone à partir de vitamine K époxyde est à la fois proportionnelle à la quantité de microsomes incubée (figure 24) mais aussi au temps d'incubation (résultats non montrés).

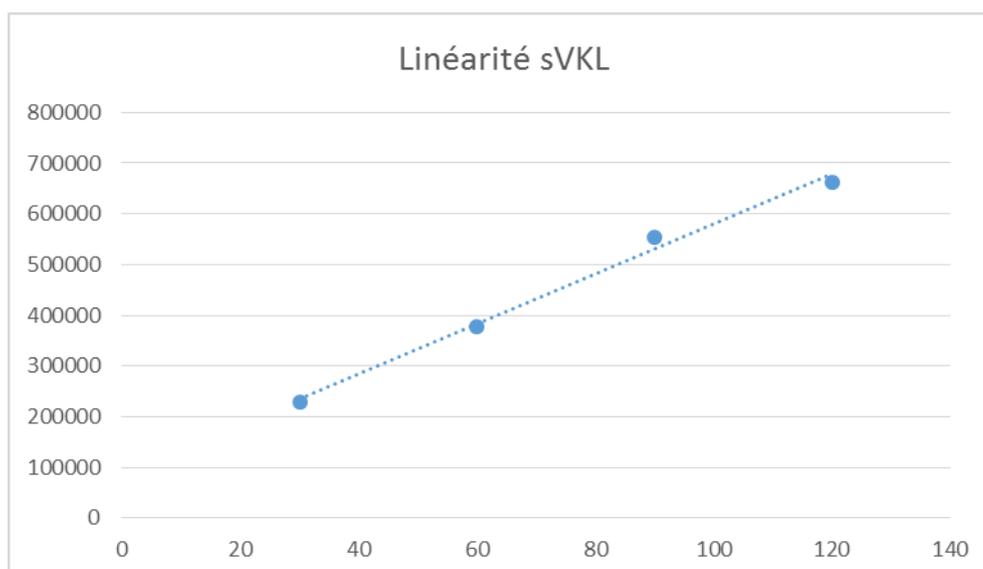


Figure 24 : Linéarité en fonction du temps de l'activité de la VKOR-like

La Km de la réaction est évaluée pour un temps d'incubation donné et une quantité définie de protéines microsomales en faisant varier la concentration en substrat, la vitamine K epoxyde.

En utilisant l'équation de Michaelis-Menten, la concentration pour laquelle la vitesse de la réaction correspond à la moitié de la vitesse maximale ( $V_{max}/2$ ) correspond à la Km. Cette Km a été évaluée et est estimée, par régression non linéaire, à 25  $\mu\text{M}$  pour VKORC1L1 recombinante.

L'inhibition des activités VKORC1 et VKORC1L1 est réalisée en présence de différentes concentrations d'inhibiteur. La mesure de la vitamine K quinone produite est mesurée et la relation entre l'activité de l'enzyme et la concentration en inhibiteur est modélisée en fonction de l'équation de Michaelis-Menten pour un inhibiteur non compétitif.

$$v = \frac{V_{max}}{1 + [I]/K_i} \times \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

La concentration permettant d'inhiber 50% de l'activité est alors calculée par régression non linéaire. Cette concentration correspond à l'IC50 (Concentration Inhibitrice 50%).

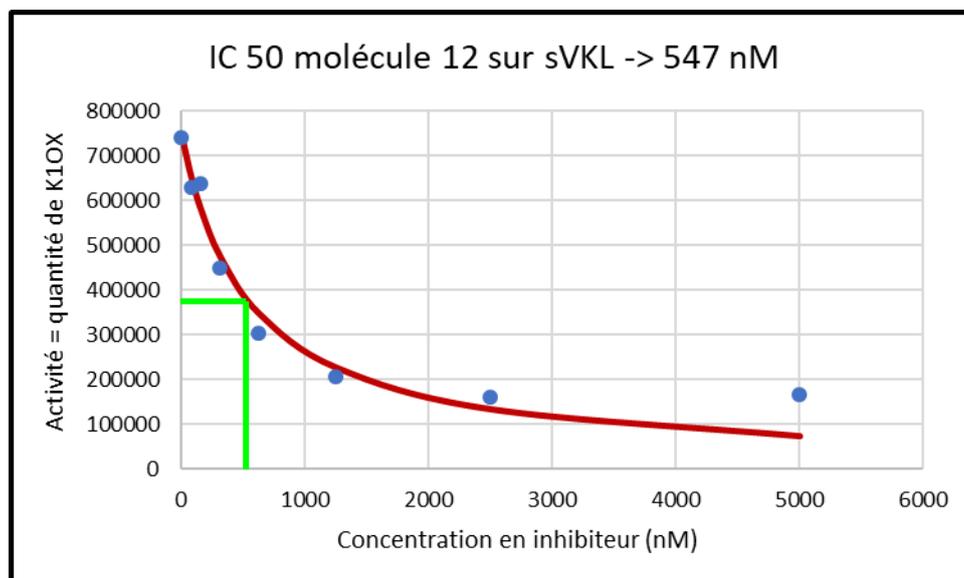
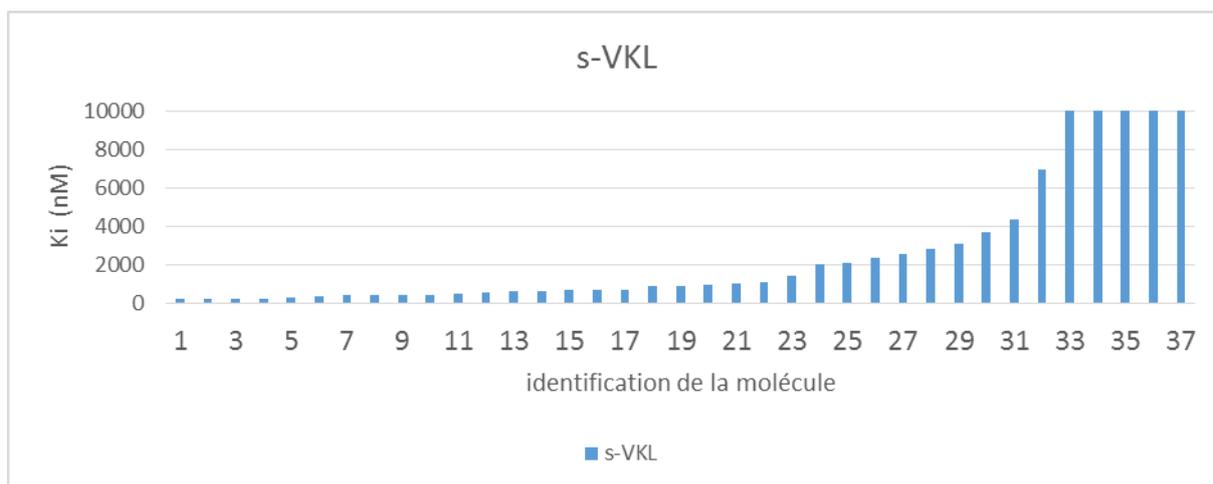


Figure 25 : Courbe d'inhibition de la molécule n°12 sur la VKORC1L1 recombinante

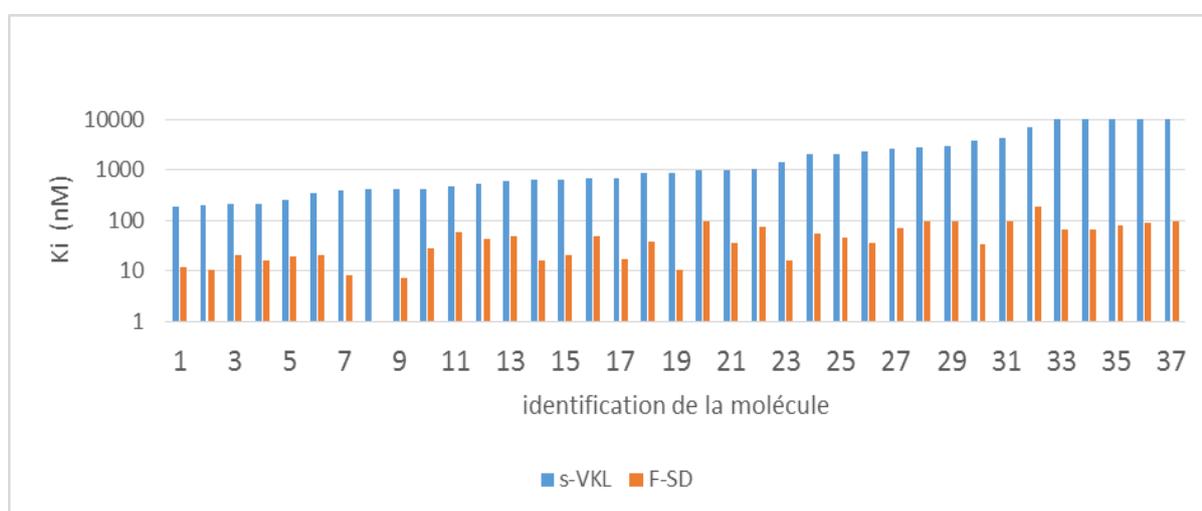
L'IC50 a été estimée pour près de 120 molécules de la banque chimique vis-à-vis de la VKORC1L1 recombinante et cette opération a été confirmée en augmentant le nombre de concentrations d'inhibiteurs et en doublant tous les points d'analyses pour les molécules a priori les plus inhibitrices suite à cette estimation.

Les 37 molécules présentant une activité inhibitrice de VKORC1L1 ont été sélectionnées.



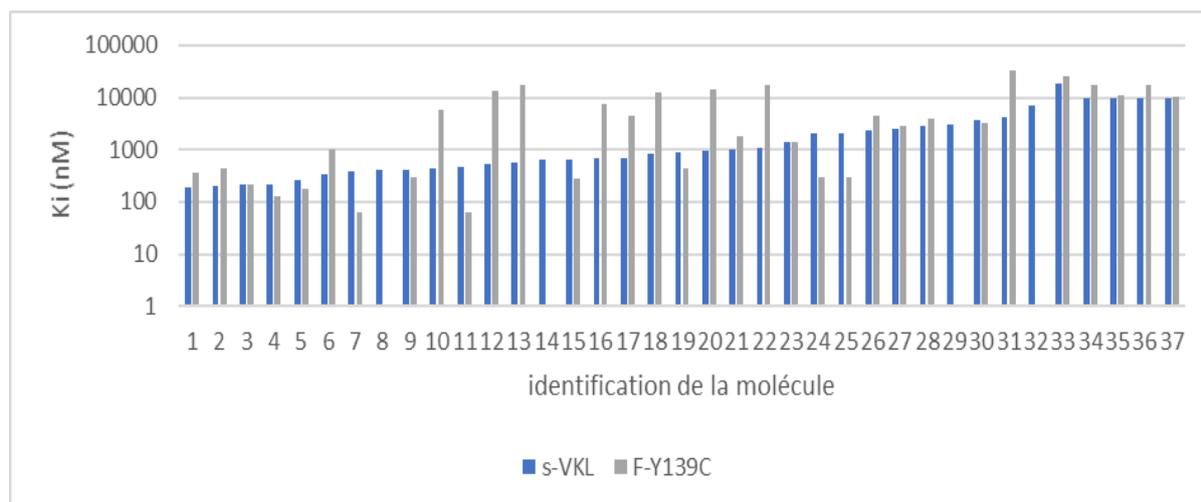
**Figure 26 :** Histogramme des IC50 de VKORC1L1 recombinante en fonction des inhibiteurs

L'évaluation de l'activité inhibitrice a ensuite été réalisée sur ce même protocole en présence de microsomes de foies de rats SD (Sprague Dawley) dont le gène VKORC1 n'est pas muté. Le graphique suivant représente, en utilisant une échelle logarithmique, les IC50 obtenues pour chacune de ces 37 molécules en utilisant comme source d'enzyme soit la VKORC1L1 recombinante, soit les microsomes de foie de rats SD.



**Figure 27 :** Histogramme comparatif des IC50 de VKORC1L1 et de VKORC1 sauvage

Enfin, l'évaluation de l'activité inhibitrice a ensuite été réalisée sur ce même protocole en présence de microsomes de foies de rats SD (Sprague Dawley) dont le gène VKORC1 est porteur de la mutation Y139C. Le graphique suivant représente, en utilisant à nouveau une échelle logarithmique, les IC50 obtenues pour chacune de ces 37 molécules en utilisant comme source d'enzyme soit la VKORC1L1 recombinante, soit les microsomes de foie Y139C.



**Figure 28 :** Histogramme comparatif des IC50 de VKORC1L1 et de VKORC1-Y139C

#### **IV. Discussion**

Notre objectif était de définir un inhibiteur de VKORC1L1 qui puisse inhiber cette enzyme sans inhiber VKORC1 et ce, dans le but d'objectiver les fonctions biologiques de cette enzyme. Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé une banque de molécules chimiques produite par Mme Florence Popowycz, Professeur à l'INSA de Lyon. Cette banque a été produite dans le cadre de travaux communs entre Mme Popowycz, l'Unité Rongeurs Sauvages de Vetagro Sup (USC 1233) et un industriel. Cette banque est confidentielle et nous ne pouvons donc donner les structures des molécules constituant la banque. Néanmoins, cette banque a été développée dans le cadre de l'étude de molécules inhibitrices de l'enzyme VKORC1. Les molécules sont des dérivés coumariniques ou

analogues à des coumariniques. L'une des structures de base sur lesquelles nous avons travaillé est celle présentée en figure 29.

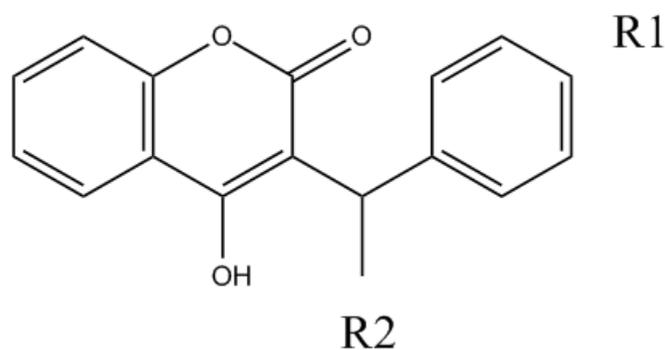


Figure 29 : Base de travail sur un noyau coumarinique

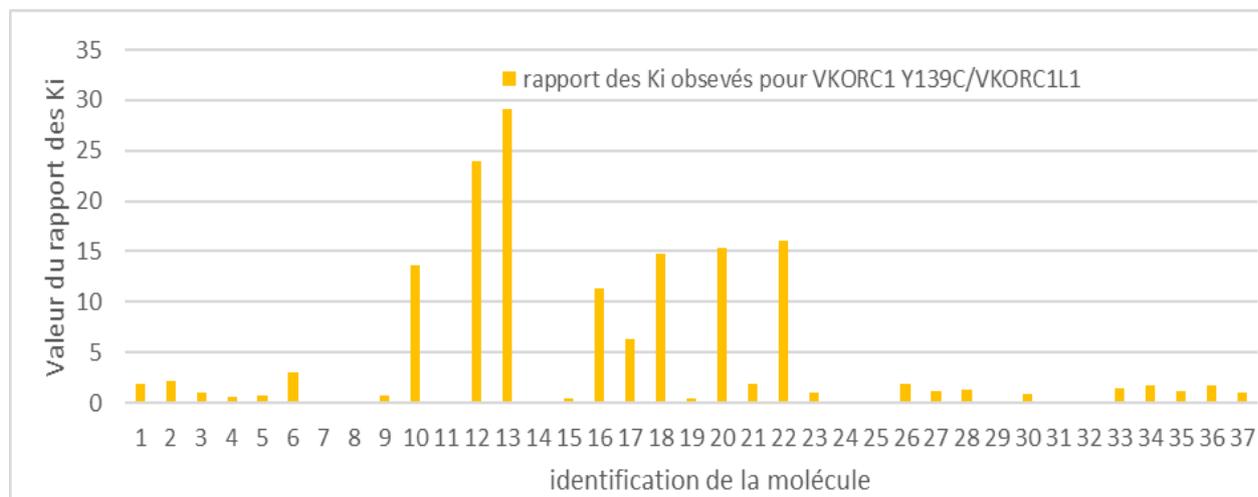
Les substitutions du noyau coumariniques (ici R1 et R2) sont très diverses.

Les IC50 obtenues correspondent au Ki de la réaction. En effet, il est facile de montrer que pour un inhibiteur non compétitif, l'IC50, correspond au KI. Les Ki obtenues pour VkorC1-L1 pour les 37 molécules sélectionnées varient entre 190 nM et plus de 20 µM. Cependant, aucune des 37 molécules testées ne présente une Ki pour VKORC1L1 inférieure à la Ki pour VKORC1. Il apparaît donc peu vraisemblable d'obtenir une molécule spécifiquement inhibitrice de VKORC1L1 et non de VKORC1 sur cette base.

Il apparaît impossible d'inhiber spécifiquement VKORC1L1 sans inhiber l'enzyme VkorC1 sauvage. Suite à ce constat, nous avons exploré la possibilité d'inhiber spécifiquement VKORC1L1 chez des rats porteurs d'une mutation de VKORC1 très résistante aux anticoagulants coumariniques, la mutation Y139C. Cette mutation, observée chez des rats sauvages a été introgressée chez des rats SD sur plus de 10 générations par le laboratoire de Rongeurs Sauvages de Vetagro Sup. Les rongeurs obtenus présentent donc un génome contenant plus de 99% du génome de rats SD et un fragment du chromosome 1, homozygote, contenant le gène muté. Si nous sommes capables d'inhiber spécifiquement VKORC1L1 sans inhiber VKORC1 Y139C, nous pourrions alors utiliser cette lignée introgressée pour évaluer les fonctions de VKORC1L1.

La figure 28 présentée dans la partie Résultats de ce travail montrait que pour certaines molécules, les Ki obtenues pour l'enzyme VKORC1 Y139C était supérieures à celles obtenues pour VKORC1L1.

La figure 30 ci-dessous montre le rapport des Ki obtenues pour VKORC1 Y139C sur les Ki obtenues pour VKORC1L1.



**Figure 30 : Rapport des Ki observés pour VKORC1 Y139C/VKORC1L1**

On observe que pour 7 molécules, ce rapport des Ki est supérieur à 10 et pour deux molécules il est même supérieur à 20.

Ainsi pour la molécule n°13, la Ki pour VKORC1-L1 est de 586 nM alors que celle pour VKORC1 Y139C est supérieure à 17 µM. Cela signifie qu'il faut 29 fois moins de cette molécule inhibitrice pour inhiber VKORC1L1 que pour VKORC1 Y139C, on pourrait donc ainsi hypothétiquement réaliser une inhibition spécifique (ou sélective).

Ces molécules ont, de plus, des caractéristiques structurales assez particulières qui pourraient permettre d'envisager quelques molécules nouvelles potentiellement encore plus intéressantes.

Nous disposons donc de 7 molécules qui possèdent une Ki pour VKORC1L1 allant de 480 nM à près de 1100 nM. Ces molécules devront, après administration, atteindre donc des concentrations inhibitrices de l'ordre de plusieurs fois la Ki dans des tissus extra hépatiques sans atteindre des concentrations inhibitrices de VKORC1 dans le foie. Si nous obtenons, par une voie d'administration adaptée ces concentrations, alors nous pourrions espérer observer les conséquences fonctionnelles directes de l'inhibition de VKORC1L1.

Le rôle de VKORC1L1 apparaît important dans les tissus extra hépatiques comme le souligne Hamed et al. en 2013. Parmi les rôles de la vitamine K non assurés par le foie, il y a la gamma-carboxylation de l'ostéocalcine et de la MGP.

L'ostéocalcine gamma carboxylée se lie à l'hydroxyapatite osseuse et participe à la régulation de la croissance osseuse, par arrêt de celle-ci, comme dit dans la partie bibliographique. Le knock-out de l'OC, que cela soit chez le rat (Lambert et al., 2016), ou la souris (Lee et al., 2007) augmente l'accrétion osseuse sans diminuer les capacités de résorption (Ducy et al., 1996).

Des propriétés endocrines ont été attribuées à l'ostéocalcine non gamma-carboxylée. L'uc-ostéocalcine (under carboxylated) serait impliquée dans le contrôle de la sécrétion de l'insuline et de l'adiponectine. L'inhibition de VKORC1L1 pourrait participer à la production d'uc-ostéocalcine. Il serait donc être extrêmement intéressant d'analyser les production d'uc-ostéocalcine, d'insuline et d'adiponectine lors de l'utilisation d'une des molécules sélectionnées. Les perspectives thérapeutiques, notamment chez les patients atteints d'ostéoporose (dans le cas de l'exemple de la fonction régulatrice de la croissance osseuse de l'ostéocalcine), sont à partir de là très intéressantes.

La MGP est une protéine exprimée dans la média des artères et les chondrocytes qui se lie au calcium présent dans ces tissus et permet de prévenir la calcification de ces tissus. Ainsi, il a été montré que chez des rats porteurs de la mutation VKORC1-Y139C, il apparaît un mécanisme de catabolisme accéléré de la vitamine K (Matagrín et al., 2013). La subcarence en vitamine K apparue chez ces rongeurs permet l'apparition de calcification de la média des artères (Michaux A et al. 2018, Scientific report, accepté pour publication).

Il est donc possible que, le cycle de la vitamine K dans les tissus extra hépatiques étant en partie assuré par la VKORC1-L1, on puisse observer une aggravation de cette calcification de la média des artères en présence de tels inhibiteurs. Il serait alors possible d'obtenir des rongeurs présentant des lésions de médiocalcose de façon contrôlée, ce qui permettrait de disposer d'un modèle animal permettant d'évaluer les conséquences physiopathologiques de ces lésions.

## CONCLUSION

Il est établi que la vitamine K est un micro-nutriment essentiel pour les organismes mammifères. Son implication dans l'activation de protéines vitamine K-dépendantes hépatiques, impliquées dans la cascade de la coagulation, mais aussi extra-hépatiques, impliquées notamment dans la régulation de la prolifération osseuse ou encore du phénomène de calcification vasculaire, en font un élément central du métabolisme. Son système de recyclage, permettant une économie formidable de ce nutriment, met en jeu une enzyme nommée VKORC1 pour *Vitamine K epoxyde reductase complexe 1*, exprimée dans le foie. Si la bibliographie liée à cette enzyme est assez conséquente et en dresse un bilan assez complet, ce n'est pas le cas de la VKOR-like, ou VKORC1L1, une enzyme issue d'un gène paralogue à celui de la VKORC1, et exprimée dans les tissus extra-hépatiques. Si des études *in vitro* ont montré que VKORC1L1 semble avoir les mêmes propriétés catalytiques que VKORC1 au niveau de la gamma-carboxylation des protéines vitamine K-dépendantes, son rôle dans l'organisme reste une immense inconnue.

Afin de pouvoir l'identifier, il est important de pouvoir cibler précisément cette enzyme. Aussi avons-nous cherché, dans ce travail, à trouver un moyen de réaliser un K-O (Knock-Out) chimique de cette enzyme pour pouvoir identifier la ou les fonctions impactées et ainsi les implications métaboliques de cette protéine dans l'organisme. Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences d'activité enzymatique sur cette enzyme en présence de différentes molécules contenant un noyau coumarinique. Le problème majeur a été de réussir à trouver, au sein de notre chimiothèque, des molécules inhibant l'activité de VKORC1L1, sans influencer l'activité de la VKORC1. En effet, cette dernière, dans son phénotype sauvage, a été inhibée par toutes les molécules testées qui possédaient une activité inhibitrice de VKORC1L1. Il était alors délicat de trouver une molécule adéquate. C'est pourquoi nous avons choisi de réaliser nos comparaisons d'activité non pas entre VKORC1L1 et VKORC1 mais entre VKORC1L1 et VKORC1 mutée Y139C. Cette mutation confère à l'enzyme une résistance aux molécules anticoagulantes supérieure à celle du phénotype sauvage. Le fait que le laboratoire USC 1233 d'études des Rongeurs Sauvages possède une lignée introgressée avec ce gène muté était alors un avantage certain. Le screening de la banque de molécules à notre disposition a alors permis de faire émerger 7 molécules d'intérêt, présentant une inhibition sélective de la VKORC1L1 à des doses bien inférieures à celles nécessaires pour inhiber VKORC1-Y139C.

La difficulté qui va se présenter par la suite sera de réussir à synthétiser ces molécules pour que leur administration à des populations de rats permette d'atteindre des concentrations efficaces dans les tissus extra-hépatiques, suffisantes pour inhiber VKOR-like, mais en même temps sans atteindre une concentration hépatique susceptible d'impacter la VKORC1-Y139C. Si cet objectif peut être atteint, alors il sera enfin possible d'appréhender les rôles de VKOR-like dans l'organisme.

## BIBLIOGRAPHIE

- Azuma, K., Tsukui, T., Ikeda, K., Shiba, S., Nakagawa, K., Okano, T., Urano, T., Horie-Inoue, K., Ouchi, Y., Ikawa, M., et al. (2014). Liver-specific  $\gamma$ -glutamyl carboxylase-deficient mice display bleeding diathesis and short life span. *PLoS One* 9, e88643.
- Bell, R.G., and Matschiner, J.T. (1970). Vitamin K activity of phylloquinone oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 141, 473–476.
- Berkner, K.L., Runge, K.W., 2004. The physiology of vitamin K nutrition and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J. Thromb. Haemost.* 2, 2118–2132.
- 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., van der Schouw, Y.T., 2009. High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification. *Atherosclerosis* 203, 489–493.
- Boyle, C. M., 1960. Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* to anticoagulant poisons. *Nature* 188: 517.
- Buitenhuis, H.C., Soute, B.A.M., and Vermeer, C. (1990). Comparison of the vitamins K1, K2 and K3 as cofactors for the hepatic vitamin K-dependent carboxylase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1034, 170–175.
- Cain, D., Hutson, S.M., Wallin, R., 1997. Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 272, 29068–29075.
- Campbell, H. A., and Link, K. P., 1941. Studies on the Hemorrhagic Sweet Clover Disease. IV. The Isolation and Crystallization of the Hemorrhagic Agent. *J. Biol. Chem.* 138, 21–33.
- Cao, Z., van Lith, M., Mitchell, L.J., Pringle, M.A., Inaba, K., Bulleid, N.J., 2016. The membrane topology of vitamin K epoxide reductase is conserved between human isoforms and the bacterial enzyme. *Biochem. J.* 473, 851–858.
- Caspers, M., Czogalla, K.J., Liphardt, K., Müller, J., Westhofen, P., Watzka, M., Oldenburg, J., 2015. Two enzymes catalyze vitamin K 2,3-epoxide reductase activity in mouse : VKORC1 is highly expressed in exocrine tissues while VKORC1L1 is highly expressed in brain. *Thromb. Res.* 135, 977–983.
- Chatron, N., 2017. *VKORC1 et résistance aux antivitamines K : étude par modélisation moléculaire*. Thèse de doctorat en biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 199p.
- Chatron, N., Chalmond, B., Trouvé, A., Benoit, E., Caruel, H., Lattard, V., and Tchertanov, L. (2017). Identification of the functional states of human vitamin K epoxide reductase from molecular dynamics simulations. *RSC Adv.* 7, 52071–52090.
- Chatrou, M.L.L., Reutelingsperger, C.P., and Schurgers, L.J. (2011). Role of vitamin K-

- dependent proteins in the arterial vessel wall. *Hamostaseologie* 31, 251–257.
- Chung, J.-E., Lee, K.E., Chang, B.C., Gwak, H.S., 2018. Polymorphisms of vitamin K-related genes (EPHX1 and VKORC1L1) and stable warfarin doses. *Gene* 641, 68–73.
- Czogalla, K.J., Biswas, A., Höning, K., Hornung, V., Liphardt, K., Watzka, M., and Oldenburg, J. (2016). Warfarin and vitamin K compete for binding to Phe55 in human VKOR. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 77–85.
- Czogalla, K.J., Liphardt, K., Höning, K., Hornung, V., Biswas, A., Watzka, M., Oldenburg, J., 2018. VKORC1 and VKORC1L1 have distinctly different oral anticoagulant dose-response characteristics and binding sites. *Blood Adv* 2, 691–702.
- Dam, H., 1935. The antihemorrhagic vitamin of the chick. *Biochem J* 29, 1273–1285.
- Damale, M.G., Harke, S.N., Kalam Khan, F.A., Shinde, D.B., Sangshetti, J.N., 2014. Recent advances in multidimensional QSAR (4D-6D) : a critical review. *Mini Rev Med Chem* 14, 35–55.
- De Vilder, E.Y.G., Debacker, J., and Vanakker, O.M. (2017). GGCX-Associated Phenotypes: An Overview in Search of Genotype-Phenotype Correlations. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Desideri, D., Aldighieri R., Lovet M.L., and Tardieu A., 1978. Note préliminaire sur la mise en évidence, à Marseille, d'une résistance au coumafène chez *Rattus rattus*. *Bull. Soc. Path. Exotique* 71, 210-215.
- Dihingia, A., Kalita, J., and Manna, P. (2017). Implication of a novel Gla-containing protein, Gas6 in the pathogenesis of insulin resistance, impaired glucose homeostasis, and inflammation : A review. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 128, 74–82.
- Du, Q.-S., Huang, R.-B., Chou, K.-C., 2008. Recent advances in QSAR and their applications in predicting the activities of chemical molecules, peptides and proteins for drug design. *Curr. Protein Pept. Sci.* 9, 248–260.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., et al. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382, 448–452.
- Fasco MJ, Preusch PC, Hildebrandt E, Suttie JW. Formation of hydroxyvitamin K by vitamin K epoxide reductase of warfarin-resistant rats, 1983. *J Biol Chem.* 258(7), 4372–80.
- Ferron, M., Hinoi, E., Karsenty, G., and 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. U. S. A.* 105, 5266–5270.
- Friedman, P.A., Przysiecki, C.T., 1987. Vitamin K-dependent carboxylation. *International Journal of Biochemistry* 19, 1–7.
- 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., Furie, B.C., 1999. Vitamin K-Dependent Biosynthesis of  $\gamma$ -Carboxyglutamic Acid. *Blood* 93, 1798–1808.
- Goodstadt, L., and Ponting, C.P. (2004). Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *Trends Biochem. Sci.* 29, 289–292.
- Grandemange A., Kohn M. H., Lasseur R., Longin-Sauvageon C., Berny P. and Benoît E., 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.
- Grandemange A., Lasseur R., Longin-Sauvageon C., Benoît E. and Berny P., 2010. Distribution of VKORC1 single nucleotide polymorphism in wild *Rattus norvegicus* in France. *Pest. Manag. Sci.* 66, 270-276 .
- Greaves J. and Ayres P. "Heritable resistance to warfarin in rats". *Nature* (1967) 215 ; 877-878
- Greaves, J. H. Resistance to anticoagulant rodenticides, 1994. *Rodent Pests and their Control.* A. P. Buckle and R. H. Smith editions. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. p 197-217.
- Greaves, J.H., Shepherd, D.S., and Gill, J.E., 1982. An investigation of difenacoum resistance in Norway rat populations in Hampshire. *Ann. appl. Biol.* 100, 581-587.
- Greaves, J. H., and Ayres, P.B., 1982. Multiple allelism at the locus controlling warfarin resistance in the Norway rat. *Genet. Res., Camb.* 40, 59-64.
- Greaves, J.H., Shepherd, D.S., and Quy, R., 1982. Field trials of second-generation anticoagulants against difenacoum-resistant Norway rat populations. *J. Hyg., Camb.* 89, 295-301.
- Hammed, A., 2013. *Résistance de cible aux antivitamines K : Analyses des conséquences catalytiques de différentes mutations de VKORC1 et étude du rôle d'une nouvelle enzyme, la VKORC1L1.* Thèse de doctorat en biochimie. Université Claude Bernard, 155 p.
- Hammed, A., Matagrín, B., Spohn, G., Prouillac, C., Benoit, E., Lattard, V., 2013. VKORC1L1, an enzyme rescuing the vitamin K 2,3-epoxide reductase activity in some extrahepatic tissues during anticoagulation therapy. *J. Biol. Chem.* 288, 28733–28742.
- Hauschka, P.V., Lian, J.B., and Gallop, P.M. (1975). Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 3925–3929.
- Hey, H., Brasen, C.L., 2015. Vitamin K2 influences several diseases. *Ugeskr. Laeg.* 177, V12140700.

- Hinoi, E., Gao, N., Jung, D.Y., Yadav, V., Yoshizawa, T., Myers, M.G., Chua, S.C., Kim, J.K., Kaestner, K.H., and Karsenty, G. (2008). The sympathetic tone mediates leptin's inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity. *J. Cell Biol.* *183*, 1235–1242.
- 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.
- Hodroge, A., Matagrín, B., Moreau, C., Fourel, I., Hamed, A., Benoit, E., 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.
- Hsiao, F.-C., Lin, Y.-F., Hsieh, P.-S., Chu, N.-F., Shieh, Y.-S., Hsieh, C.-H., Lee, C.-H., and Hung, Y.-J. (2013). Circulating growth arrest-specific 6 protein is associated with adiposity, systemic inflammation, and insulin resistance among overweight and obese adolescents. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *98*, E267-274.
- Hung, Y.-J., Lee, C.-H., Chu, N.-F., and Shieh, Y.-S. (2010). Plasma protein growth arrest-specific 6 levels are associated with altered glucose tolerance, inflammation, and endothelial dysfunction. *Diabetes Care* *33*, 1840–1844.
- 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, 2008. *J. Toxicol. Sci.* *33*, 283-291.
- Jackson, W. B., and Kaukeinen, D. E., 1972. Resistance of wild Norway rats in North Carolina to warfarin rodenticide. *Science* *176*, 1343-1344.
- Jackson, W. B., and Ashton, A. D., 1979. Present distribution of anticoagulant resistance in the United States. J. W. Suttie (Ed.). *Vitamin K metabolism and vitamin K-dependent proteins*. Univ. Park Press, Baltimore, 572p.
- Jin, D.-Y., Tie, J.-K., Stafford, D.W., 2007. 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* *46*, 7279–7283.
- Kaipatur, N.R., Murshed, M., and McKee, M.D. (2008). Matrix Gla protein inhibition of tooth mineralization. *J. Dent. Res.* *87*, 839–844.
- Koshihara, Y., Hoshi, K., Shiraki, M., 1993. Vitamin K2 (menatetrenone) inhibits prostaglandin synthesis in cultured human osteoblast-like periosteal cells by inhibiting prostaglandin H synthase activity. *Biochem. Pharmacol.* *46*, 1355–1362.
- Lacombe, J., Rishavy, M.A., Berkner, K.L., Ferron, M., 2018. VKOR paralog VKORC1L1 supports vitamin K-dependent protein carboxylation in vivo. *JCI Insight*, *3*(1), e96501.
- Lambert, Laura J., Anil K. Challa, Aidi Niu, Lihua Zhou, Janusz Tucholski, Maria S. Johnson, Tim R. Nagy, et al., 2016. Increased Trabecular Bone and Improved Biomechanics in an

- Osteocalcin-Null Rat Model Created by CRISPR/Cas9 Technology. *Disease Models & Mechanisms* 9, no 10, 1169-79.
- Lasseur R., Longin-Sauvageon C., Videmann B., Billeret M., Berny P. and Benoît E. Warfarin resistance in a French strain of rats, 2005. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19, 379-385.
- Laurance, S., Lemarié, C.A., and Blostein, M.D. (2012). Growth arrest-specific gene 6 (gas6) and vascular hemostasis. *Adv. Nutr. Bethesda Md* 3, 196–203.
- Le Ru, A., Jacob, D., Transfiguracion, J., Ansorge, S., Henry, O., Kamen, A., 2010. Scalable production of influenza virus in HEK-293 cells for efficient vaccine manufacturing. *Vaccine* 28, 3661–71.
- 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.
- Lee, C.-H., Chu, N.-F., Shieh, Y.-S., and Hung, Y.-J. (2012). The growth arrest-specific 6 (Gas6) gene polymorphism c.834+7G>A is associated with type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 95, 201–206.
- Li, J., Lin, J.C., Wang, H., Peterson, J.W., Furie, B.C., Furie, B., Booth, S.L., Volpe, J.J., Rosenberg, P.A., 2003. Novel role of vitamin k in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons. *J. Neurosci.* 23, 5816–5826.
- Li, J., Wang, H., Rosenberg, P.A., 2009. Vitamin K prevents oxidative cell death by inhibiting activation of 12-lipoxygenase in developing oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* 87(9), 1997-2005.
- Li, T., Chang, C.-Y., Jin, D.-Y., Lin, P.-J., Khvorova, A., Stafford, D.W., 2004. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427, 541–544.
- Li, W., Schulman, S., Dutton, R.J., Boyd, D., Beckwith, J., and Rapoport, T.A. (2010). Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase. *Nature* 463, 507–512.
- Link, K. P., 1959. The discovery of dicoumarol and its sequels. *Circulation* 19, 97-107.
- Lund, M., 1967. The resistance to anticoagulants. *Dan Pest Infest Lab* 47, 611–618.
- Lund, M., 1981. Comparative effect of the three rodenticides warfarin, difenacoum and brodifacoum on eight rodent species in short feeding periods. *J. Hyg.*, 101-107.
- Luo, G., Ducy, P., McKee, M.D., Pinero, G.J., Loyer, E., Behringer, R.R., and Karsenty, G., 1997. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386, 78–81.
- MacNicoll, A.D. and Gill, J.E., 1987. The occurrence and significance of rodenticide-resistance in the UK. *Stored products pest control : British Crop Protection Monograph No. 37 (Ed. T.J. Lawson)*, 89-95.

- Malashkevich, V.N., Almo, S.C., and Dowd, T.L. (2013). X-ray crystal structure of bovine 3 Glu-osteocalcin. *Biochemistry (Mosc.)* 52, 8387–8392.
- Matagrín, B., Hamed, A., Michaux, A., Hodroge, A., Benoit, E., Lattard, V., 2016. Identification of Key Functional Residues in the Active Site of Vitamin K Epoxide Reductase-like Protein (VKORC1L1). *Biochemistry & Molecular Biology Journal* 2(3).
- Matagrín, B., Hodroge, A., Montagut-Romans, A., Andru, J., Fourel, I., Besse, S., Benoit, E., Lattard, V., 2013. 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* 3, 144–150.
- Michaux, A., 2018. *Carence en vitamine K et polymorphisme du gène Vkorc1 chez le rat : vers un nouveau modèle d'étude des calcifications vasculaires*. Thèse de doctorat en biochimie. Université Claude Bernard, 161 p.
- Moreau, C., Lorient, M.-A., Siguret, V., 2012. Vitamin K antagonists: from discovery to pharmacogenetics. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 70, 539–551.
- Myint, K.Z., Xie, X.-Q., 2010. Recent Advances in Fragment-Based QSAR and Multi-Dimensional QSAR Methods. *International Journal of Molecular Science* 11(10), 3846–3866.
- Nelsestuen, G.L., Zytkevich, T.H., Howard, J.B., 1974. The mode of action of vitamin K. Identification of gamma-carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. *J. Biol. Chem.* 249, 6347–6350.
- Oldenburg, J., Bevans, C.G., Müller, C.R., 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.
- Oldenburg, J., Watzka, M., Bevans, C.G., 2015. VKORC1 and VKORC1L1 : Why do Vertebrates Have Two Vitamin K 2,3-Epoxide Reductases ? *Nutrients* 7, 6250–6280.
- Ophof, A. J., and Langeveld, D. W., 1969. Warfarin resistance in the Netherlands. *Proc. Rodent Biol. Contr. Meet., Berlin, Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-u.-Lufthyg.* 32, 39-48.
- Oury, F., Sumara, G., Sumara, O., Ferron, M., Chang, H., Smith, C.E., Hermo, L., Suarez, S., Roth, B.L., Ducy, P., et al. (2011). Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* 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., 2005. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics* 170, 1839-1847.
- Price, P.A., Otsuka, A.A., Poser, J.W., Kristaponis, J., Raman, N., 1976. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proceedings of the National Academy of Science of the U S A* 73(5), 1447–1451.

- Price, P.A., Urist, M.R., and 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.
- Proudfoot, D., and Shanahan, C.M. (2006). Molecular mechanisms mediating vascular calcification : role of matrix Gla protein. *Nephrol. Carlton Vic* 11, 455–461.
- Reddi, K., Henderson, B., Meghji, S., Wilson, M., Poole, S., Hopper, C., Harris, M., Hodges, S.J., 1995. Interleukin 6 production by lipopolysaccharide-stimulated human fibroblasts is potently inhibited by naphthoquinone (vitamin K) compounds. *Cytokine* 7, 287–290.
- Reedstrom, C.K., Suttie, J.W., 1995. Comparative distribution, metabolism, and utilization of phylloquinone and menaquinone-9 in rat liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 209, 403–409.
- Rishavy M. A., Usubalieva 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, 2010. *J. Biol. Chem.* 286, 7267-7278.
- Rishavy, M.A., Berkner, K.L., 2012. Vitamin K Oxygenation, Glutamate Carboxylation, and Processivity: Defining the Three Critical Facets of Catalysis by the Vitamin K-Dependent Carboxylase<sup>12</sup>. *Adv Nutr* 3(2), 135–148.
- Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V., Conzelmann, E., Hörtnagel, K., Pelz, H.-J., Lappegard, K., Seifried, E., Scharrer, I., Tuddenham, E.G.D., Müller, C.R., Strom, T.M., Oldenburg, J., 2004. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427, 537–541.
- Rost, S., Fregin, A., Hünerberg, M., Bevans, C.G., Müller, C.R., and Oldenburg, J., 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.
- Rost S., Pelz H. J., Menzel S., MacNicoll A. D., León V., Song K. J., Jäkel T., Oldenburg J. and Müller C. R., 2009. Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice – a response to 50 years of selection pressure by warfarin ?. *BMC Genet.* 10 ; 4.
- Rowe, F.P., Plant, C.J., and Bradfield, A., 1981. Trials of the anticoagulant rodenticides bromadiolone and difenacoum against the house mouse (*Mus musculus* L.). *J. Hyg. Camb.*, 87, 171-177.
- Schneider, C., King, R.M., and Philipson, L. (1988). Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* 54, 787–793.
- Schofield F.W. “Hemorrhagic sweet clover disease in cattle”. *Can. Vet. Rec.* (1922) 3, 74-75.
- Shah, D.V., and Suttie, J.W., 1974. The vitamin K dependent, in vitro production of prothrombin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 1397-1402.

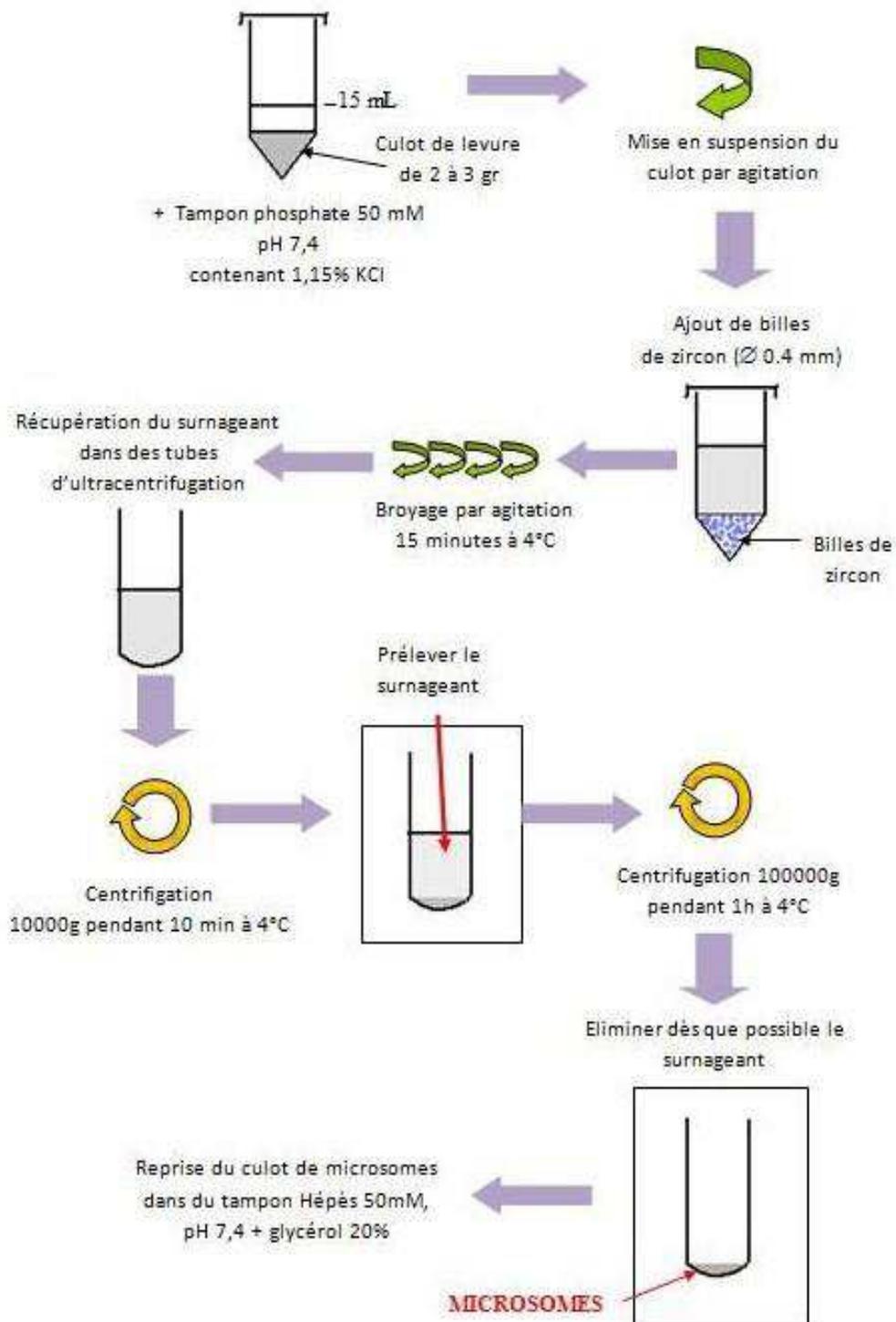
- Shearer, M.J., Newman, P., 2014. Recent trends in the metabolism and cell biology of vitamin K with special reference to vitamin K cycling and MK-4 biosynthesis. *J. Lipid Res.* 55, 345–362.
- Shearer, M.J., Okano, T., 2018. Key Pathways and Regulators of Vitamin K Function and Intermediary Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*
- Silverman, R. (1981). Chemical-model studies for the mechanism of vitamin-K epoxide reductase. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 5939–5941.
- Spronk, H.M.H., Soute, B. a. M., Schurgers, L.J., Thijssen, H.H.W., De Mey, J.G.R., Vermeer, C., 2003. Tissue-specific utilization of menaquinone-4 results in the prevention of arterial calcification in warfarin-treated rats. *J. Vasc. Res.* 40, 531–537.
- Stafford, D.W., 2005. The vitamin K cycle. *J. Thromb. Haemost.* 3, 1873–1878.
- Stahmann, M. A., Huebner, C. F., and Link, K. P., 1941. Studies on the Hemorrhagic Sweet Clover Disease. V. Identification and Synthesis of the Hemorrhagic Agent. *J. Biol. Chem.* 138, 513–527.
- 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
- Sunnerhagen, M., Drakenberg, T., Forsen, S., and Stenflo, J. (1996). Effect of Ca<sup>2+</sup> on the structure of vitamin K-dependent coagulation factors. *Haemostasis* 26 *Suppl* 1, 45–53.
- 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
- Thomas, D.D.H., Krzykowski, K.J., Engelke, J.A., Groblewski, G.E., 2004. Exocrine pancreatic secretion of phospholipid, menaquinone-4, and caveolin-1 in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 974–979.
- Thomas, P., Smart, T.G., 2005. HEK293 cell line : A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, Electrophysiological Methods in Neuropharmacology* 51, 187–200.
- Tie, J.-K., Jin, D.-Y., Stafford, D.W., 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.
- Tie, J.-K., Jin, D.-Y., Stafford, D.W., 2012. Human vitamin K epoxide reductase and its bacterial homologue have different membrane topologies and reaction mechanisms.

- J. Biol. Chem.* 287, 33945–33955.
- Tie, J.-K., Nicchitta, C., von Heijne, G., Stafford, D.W., 2005. Membrane topology mapping of vitamin K epoxide reductase by in vitro translation/cotranslocation. *J. Biol. Chem.* 280, 16410–16416.
- Tie, J.-K., Stafford, D.W., 2017. Functional Study of the Vitamin K Cycle Enzymes in Live Cells. *Methods Enzymol* 584, 349–394.
- Tie, J.-K., Stafford, D.W., 2008. Structure and function of vitamin K epoxide reductase. *Vitam. Horm.* 78, 103–130.
- Van Horn, W.D., 2013. Structural and functional insights into human vitamin K epoxide reductase and vitamin K epoxide reductase-like1. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48, 357–372.
- Vasse M. “Protein Z, a protein seeking a pathology”. *J. Thromb . Haemost.* (2008) 100 ; 548-556
- Verma, J., Khedkar, V.M., Coutinho, E.C., 2010. 3D-QSAR in drug design--a review. *Curr Top Med Chem* 10, 95–115.
- Vermeer, C., Hendrix, H., and Daemen, M. (1982). Vitamin K-dependent carboxylases from non-hepatic tissues. *FEBS Lett.* 148, 317–320.
- Viegas, C.S.B., Cavaco, S., Neves, P.L., Ferreira, A., João, A., Williamson, M.K., Price, P.A., Cancela, M.L., and Simes, D.C. (2009). Gla-Rich Protein Is a Novel Vitamin K-Dependent Protein Present in Serum That Accumulates at Sites of Pathological Calcifications. *Am. J. Pathol.* 175, 2288–2298.
- Wajih, N., Hutson, S.M., Wallin, R., 2007. Disulfide-dependent protein folding is linked to operation of the vitamin K cycle in the endoplasmic reticulum. A protein disulfide isomerase-VKORC1 redox enzyme complex appears to be responsible for vitamin K1 2,3-epoxide reduction. *J. Biol. Chem.* 282, 2626–2635.
- Westhofen, P., Watzka, M., Marinova, M., Hass, M., Kirfel, G., Müller, J., Bevans, C.G., Müller, C.R., 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.
- Wu, S.M., Morris, D.P., and Stafford, D.W. (1991a). Identification and purification to near homogeneity of the vitamin K-dependent carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2236–2240.
- Wu, S.M., Cheung, W.F., Frazier, D., and Stafford, D.W. (1991b). Cloning and expression of the cDNA for human gamma-glutamyl carboxylase. *Science* 254, 1634–1636.
- Wu, S., Chen, X., Jin, D.-Y., Stafford, D.W., Pedersen, L.G., Tie, J.-K., 2018. Warfarin and vitamin K epoxide reductase: a molecular accounting for observed inhibition. *Blood First Edition Paper*, prepublished online May 9, 2018.

- Yen, C.S., and Mack, D.O. (1980). Solubilized rat liver vitamin K carboxylase demonstrates little selectivity between vitamin K1 and the menaquinones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 165, 306–308.
- Yin, T., Hanada, H., Miyashita, K., Kokubo, Y., Akaiwa, Y., Otsubo, R., Nagatsuka, K., Otsuki, T., Okayama, A., Minematsu, K., Naritomi, H., Tomoike, H., Miyata, T., 2008. No association between vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) and the variability of warfarin dose requirement in a Japanese patient population. *Thromb. Res.* 122, 179–184.
- Zebboudj, A.F., Shin, V., and Boström, K. (2003). Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J. Cell. Biochem.* 90, 756–765.
- Zhu, A., Sun, H., Raymond, R.M., Furie, B.C., Furie, B., Bronstein, M., Kaufman, R.J., Westrick, R., and Ginsburg, D. (2007). Fatal hemorrhage in mice lacking gamma-glutamyl carboxylase. *Blood* 109, 5270–5275.

# ANNEXES

## Annexe I : Production des fractions microsomales



**Annexe II : Résultat du western-blot de VKORC1 et VKORC1-L1**





**CREPIN Gary**

## **Une approche QSAR pour une inhibition sélective de la VKOR-like**

**Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire :** Lyon, 14 septembre 2018

### **RESUME :**

La vitamine K est un micro-nutriment essentiel à l'organisme, en tant que cofacteur de l'activation de nombreuses protéines vitamine K-dépendantes. Parmi celles-ci on peut compter certains facteurs de coagulation (II, VII, IX et X) produits dans le foie, mais aussi des protéines extra-hépatiques impliquées notamment dans le contrôle de la croissance osseuse, la lutte contre les calcifications vasculaires ou encore le métabolisme énergétique.

La vitamine K est activement recyclée dans l'organisme, grâce à l'action d'une enzyme : la vitamine K époxyde réductase ou VKORC1. C'est cette enzyme qui va être la cible des traitements anticoagulants utilisés en thérapeutique chez l'homme, et comme rodenticides partout dans le monde.

Un gène paralogue à celui codant cette enzyme a été découvert, qui code pour une enzyme proche, à l'activité enzymatique similaire, que l'on nomme VKOR-like ou VKORC1L1, surtout exprimée dans les tissus hépatiques. Mais le rôle de cette enzyme est aujourd'hui inconnu.

Le but de ce travail a été de trouver une molécule inhibitrice capable de réaliser un KO chimique sur la VKOR-like, sans inhiber l'activité de la VKORC1, et ce dans le but de découvrir la ou les fonctions de la VKOR-like dans l'organisme.

Nos travaux *in vitro* ont permis de faire émerger 7 molécules d'intérêt qui semblent répondre à nos attentes.

Il restera à savoir si ces résultats seront applicables *in vivo*, c'est-à-dire s'il sera possible d'administrer ces molécules à une population de rat et atteindre des concentrations efficaces dans les tissus extra-hépatiques, sans que leur concentration hépatique n'affectent l'activité de la VKORC1.

### **MOTS CLES :**

- Vitamines K
- Inhibiteurs
- Coagulation du sang
- Calcification
- Carboxylation
- QSAR
- Antivitamines K

### **JURY :**

Président :	Monsieur le Professeur Serge NATAF
1er Assesseur :	Monsieur le Professeur Etienne BENOIT
2ème Assesseur :	Monsieur le Professeur Thierry BURONFOSSE
Membre invité :	Madame le Docteur Virginie LATARD

**DATE DE SOUTENANCE :** 14 septembre 2018