

Nouvelles cibles de médicaments antithrombotiques en cours de développement

Nicolas Ballois

▶ **To cite this version:**

Nicolas Ballois. Nouvelles cibles de médicaments antithrombotiques en cours de développement. Sciences pharmaceutiques. 2015. hal-01733732

HAL Id: hal-01733732
https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733732

Submitted on 14 Mar 2018

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE DE LORRAINE
2015

FACULTE DE PHARMACIE

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement

le 2 Octobre 2015, sur un sujet dédié aux :

NOUVELLES CIBLES DE MEDICAMENTS ANTITHROMBOTIQUES EN COURS DE DEVELOPPEMENT

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Nicolas BALLOIS

né le 29 Août 1989

Membres du Jury

Président :	Pr. Béatrice FAIVRE	Professeur des Universités, Université de Lorraine
Juges :	Dr. Julien PERRIN	Maître de Conférences Universitaire, Université de Lorraine
	Dr. Michèle MARTIN	Assistante Hospitalo-Universitaire, Université de Lorraine
	Dr. Philippe LADURE	Pharmacien, laboratoires PIERRE FABRE

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2014-2015

DOYEN
Francine PAULUS
Vice-Doyen
Béatrice FAIVRE
Directeur des Etudes
Virginie PICHON
Conseil de la Pédagogie
Président, Brigitte LEININGER-MULLER
Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier
Président, Béatrice DEMORE
Commission Prospective Facultaire
Président, Christophe GANTZER
Vice-Président, Jean-Louis MERLIN
Commission de la Recherche
Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine	Béatrice FAIVRE
Responsables de la filière Industrie	Isabelle LARTAUD, Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable de la filière Hôpital	Béatrice DEMORE
Responsable Pharma Plus ENSIC	Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable Pharma Plus ENSAIA	Raphaël DUVAL
Responsable de la Communication	Marie-Paule SAUDER
Responsable de la Cellule de Formation Continue et individuelle	Béatrice FAIVRE
Responsable de la Commission d'agrément des maîtres de stage	Béatrice FAIVRE
Responsables des échanges internationaux	Bertrand RIHN
Responsable ERASMUS	Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES
Chantal FINANCE
Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES
Jeffrey ATKINSON
Max HENRY
Gérard SIEST
Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES
Roger BONALY
Pierre DIXNEUF
Marie-Madeleine GALTEAU
Thérèse GIRARD
Michel JACQUE
Pierre LABRUDE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
Maurice PIERFITTE
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANTS HONORAIRES
Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES
Monique ALBERT
Mariette BEAUD
Gérald CATAU
Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Jean-Louis MONAL
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Christine PERDICAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ENSEIGNANTS	*Section CNU**	*Discipline d'enseignement*
PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS		
Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	*82*	*Thérapie cellulaire*
Chantal FINANCE	*82*	*Virologie, Immunologie*
Jean-Louis MERLIN	*82*	*Biologie cellulaire*
Alain NICOLAS	*80*	*Chimie analytique et Bromatologie*
Jean-Michel SIMON	*81*	*Economie de la santé, Législation pharmaceutique*
PROFESSEURS DES UNIVERSITES		
Jean-Claude BLOCK	*87*	*Santé publique*
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	*86*	*Pharmacologie*
Raphaël DUVAL	*87*	*Microbiologie clinique*
Béatrice FAIVRE	*87*	*Biologie cellulaire, Hématologie*
Luc FERRARI	*86*	*Toxicologie*
Pascale FRIANT-MICHEL	*85*	*Mathématiques, Physique*
Christophe GANTZER	*87*	*Microbiologie*
Frédéric JORAND	*87*	*Eau, Santé, Environnement*
Isabelle LARTAUD	*86*	*Pharmacologie*
Dominique LAURAIN-MATTAR	*86*	*Pharmacognosie*
Brigitte LEININGER-MULLER	*87*	*Biochimie*
Pierre LEROY	*85*	*Chimie physique*
Philippe MAINCENT	*85*	*Pharmacie galénique*
Alain MARSURA	*32*	*Chimie organique*
Patrick MENU	*86*	*Physiologie*
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	*86*	*Chimie thérapeutique*
Bertrand RIHN	*87*	*Biochimie, Biologie moléculaire*
MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS		
Béatrice DEMORE	*81*	*Pharmacie clinique*
Julien PERRIN	*82*	*Hématologie biologique*
Marie SOCHA	*81*	*Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique*
Nathalie THILLY	*81*	*Santé publique*
MAITRES DE CONFÉRENCES		
Sandrine BANAS	*87*	*Parasitologie*
Xavier BELLANGER	*87*	*Parasitologie, Mycologie médicale*
Emmanuelle BENOIT	*86*	*Communication et Santé*
Isabelle BERTRAND	*87*	*Microbiologie*
Michel BOISBRUN	*86*	*Chimie thérapeutique*
François BONNEAUX	*86*	*Chimie thérapeutique*
Ariane BOUDIER	*85*	*Chimie Physique*
Cédric BOURA	*86*	*Physiologie*
Igor CLAROT	*85*	*Chimie analytique*
Joël COULON	*87*	*Biochimie*
Sébastien DADE	*85*	*Bio-informatique*
Dominique DECOLIN	*85*	*Chimie analytique*
Roudayna DIAB	*85*	*Pharmacie galénique*
Natacha DREUMONT	*87*	*Biochimie générale, Biochimie clinique*
Joël DUCOURNEAU	*85*	*Biophysique, Acoustique*

ENSEIGNANTS (suite)	*Section CNU**	*Discipline d'enseignement*
Florence DUMARCAY	*86*	*Chimie thérapeutique*
François DUPUIS	*86*	*Pharmacologie*
Adil FAIZ	*85*	*Biophysique, Acoustique*
Anthony GANDIN	*87*	*Mycologie, Botanique*
Caroline GAUCHER	*85/86*	*Chimie physique, Pharmacologie*
Stéphane GIBAUD	*86*	*Pharmacie clinique*
Thierry HUMBERT	*86*	*Chimie organique*
Olivier JOUBERT	*86*	*Toxicologie, Sécurité sanitaire*
Francine KEDZIEREWICZ	*85*	*Pharmacie galénique*
Alexandrine LAMBERT	*85*	*Informatique, Biostatistiques*
Julie LEONHARD	*86*	*Droit en Santé*
Faten MERHI-SOUSSI	*87*	*Hématologie*
Christophe MERLIN	*87*	*Microbiologie environnementale*
Maxime MOURER	*86*	*Chimie organique*
Coumba NDIAYE	*86*	*Epidémiologie et Santé publique*
Francine PAULUS	*85*	*Informatique*
Caroline PERRIN-SARRADO	*86*	*Pharmacologie*
Virginie PICHON	*85*	*Biophysique*
Sophie PINEL	*85*	*Informatique en Santé (e-santé)*
Anne SAPIN-MINET	*85*	*Pharmacie galénique*
Marie-Paule SAUDER	*87*	*Mycologie, Botanique*
Rosella SPINA	*86*	*Pharmacognosie*
Gabriel TROCKLE	*86*	*Pharmacologie*
Mihayl VARBANOV	*87*	*Immuno-Virologie*
Marie-Noëlle VAULTIER	*87*	*Mycologie, Botanique*
Emilie VELOT	*86*	*Physiologie-Physiopathologie humaines*
Mohamed ZAIOU	*87*	*Biochimie et Biologie moléculaire*
Colette ZINUTTI	*85*	*Pharmacie galénique*
PROFESSEUR ASSOCIE		
Anne MAHEUT-BOSSER	*86*	*Sémiologie*
PROFESSEUR AGREGE		
Christophe COCHAUD	*11*	*Anglais*

**Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

À **Madame Béatrice FAIVRE**, Professeur des Universités en Hématologie, Docteur en Pharmacie

Pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse,
Pour vos enseignements,

Veuillez trouver ici l'expression de ma plus respectueuse gratitude.

À **Monsieur Julien PERRIN**, Maître de Conférences en Hématologie, Praticien Hospitalier, Docteur en Pharmacie

Pour vos enseignements,
Pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse,
Pour le temps que vous avez accepté de me consacrer,
Pour vos conseils, votre disponibilité et votre confiance,
Pour avoir partager votre musique, et écouter la mienne

Veuillez trouver ici l'expression de mes plus sincères et respectueux remerciements.

À **Madame Michèle MARTIN**, Assistante Hospitalo-Universitaire, Docteur en Médecine

Pour me faire l'honneur et l'amitié de juger cette thèse,
Pour vos conseils et votre aide depuis ce stage d'initiation à la recherche,
Pour votre gentillesse, vos excellents conseils et votre rigueur,

Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

À **Monsieur Philippe LADURE**, Directeur adjoint de la Recherche et Développement de l'Institut de Recherche Pierre Fabre, Docteur en Pharmacie

Pour me faire l'honneur de juger cette thèse,
Pour l'intérêt que vous avez manifesté pour mon travail,
Pour votre aide, vos conseils et votre implication,

Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

À mes amis « pharmaciens en herbe », pour leur soutien, leur amitié et leur aide précieuse au cours de ces années Pharma. Merci à Axelle, Cécile, Delphine, Mathilde, Pauline et Loïc.

À JEF et Margaux, pour leur bonne humeur quotidienne, et leur contribution à ce travail.

Aux Osuliens, depuis cette première répétition de septembre 2009, et pour tous les concerts qui ont suivi. Merci pour votre confiance, votre amour de la musique, votre folie, vos bémols. Merci pour ce que vous m'avez apporté. Une pensée particulière pour Mathilde, Hélène, Vincent et Paul.

Aux « Agros » et « Taupins » qui m'ont aidé à arriver là où je suis : Anne, Sebastian, Arnaud, Guillaaaaaaume, Perrine, Mathilde, Célia, Virginie, Emmanuel, Quentin, Julie, Aurélie et Aurore. Merci et à bientôt.

À tous mes autres amis, de midi et de minuit, pour leur soutien, leur amour et leur tolérance. Merci pour tout ce que vous m'apportez.

À Pierre Marcolini, Jeff de Bruges, Neuhaus et Léonidas, pour votre indéfectible soutien à chaque instant de la rédaction de cette thèse.

À mes parents et à mon frère, pour leur exigence, leur confiance et leur amour. Merci.

À Camomille, pour son amour, sa passion, sa patience, ses passions, ses Pouics, ses Cookies-Wookies, pour tout le bonheur partagé jusque là, et celui à venir. Merci également pour tes relectures minutieuses et ton aide dans ce travail de thèse.

The last but not the least. À Midona et Mélusine, pour leur réconfort, leur amour et pour les aventures qui nous attendent.

À mes grands-parents,
Huguette, Françoise, Claude et Aimé,
Je dédie cette thèse

TABLE DES MATIERES

Liste des figures ..... - 5 -

Liste des tableaux ..... - 7 -

Abréviations ..... - 8 -

PREMIERE PARTIE : Hémostase, thrombose et médicaments antithrombotiques

1- L'hémostase ..... - 16 -

1.1 Le maintien de l'hémostase ..... - 16 -

1.1.1 Le maintien de l'intégrité vasculaire ..... - 16 -

1.1.2 Hémostase primaire ..... - 17 -

1.1.3 Coagulation ..... - 18 -

1.1.3.1 Activation de la coagulation ..... - 18 -

1.1.3.2 La régulation de la coagulation ..... - 20 -

1.1.4 La fibrinolyse ..... - 21 -

1.1.4.1 L'activation de la fibrinolyse ..... - 21 -

1.1.4.2 Inhibition de la fibrinolyse ..... - 22 -

1.2 La thrombose ..... - 23 -

1.2.1 La thrombose veineuse ..... - 24 -

1.2.2 La thrombose artérielle ..... - 24 -

1.2.3 Facteurs favorisant les thromboses ..... - 25 -

2- Prise en charge médicamenteuse du risque de thrombose ..... - 27 -

2.1 Les antiplaquettaires ..... - 27 -

2.1.1 Les inhibiteurs de la voie du TxA_2 ..... - 28 -

2.1.2 Les antagonistes du récepteur à ADP ..... - 29 -

2.1.3 Inhibiteurs de la phosphodiesterase de la voie de l'AMPc ..... - 29 -

2.1.4 Les inhibiteurs d'intégrine GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) ..... - 29 -

2.2 Traitements anticoagulants ..... - 30 -

2.2.1 Les héparines ..... - 30 -

2.2.1.1 Les héparines standards ..... - 31 -

2.2.1.2 Les héparines de bas poids moléculaire ..... - 31 -

2.2.1.3 Les inhibiteurs sélectifs du FXa ..... - 32 -

2.2.1.4 Avantages et inconvénients des héparinothérapies ..... - 32 -

2.2.2 Les antagonistes de la vitamine K ..... - 33 -

2.2.3 Les inhibiteurs directs du facteur Xa et de la thrombine ..... - 34 -

2.4 Les thrombolytiques ..... - 35 -

DEUXIEME PARTIE : Cibles et profil de l'antithrombotique idéal

1- Portrait de l'antithrombotique « idéal » ..... - 39 -

1.1 Caractéristiques ..... **- 39 -**

1.2 Identifier une cible pharmacologique ..... **- 40 -**

2. Cibles antithrombotiques potentielles ..... - 41 -

2.1 L'hémostase primaire ..... **- 42 -**

2.1.1 Généralités ..... - 42 -

2.1.2 Adhésion plaquettaire ..... - 43 -

2.1.2.1 Le facteur von Willebrand ..... - 43 -

2.1.2.2 Le complexe GPIb plaquettaire ..... - 45 -

2.1.2.3 La GPVI et le collagène sous-endothélial ..... - 46 -

2.1.3 L'activation plaquettaire ..... - 46 -

2.1.3.1 Les récepteurs PAR-1 et PAR-4 ..... - 46 -

2.1.3.2 Le récepteur EP_3 ..... - 48 -

2.1.4 L'agrégation plaquettaire ..... - 49 -

2.1.5 Synthèse ..... - 50 -

2.2 La coagulation ..... **- 50 -**

2.2.1 Généralités ..... - 50 -

2.2.2 Initiation ..... - 51 -

2.2.2.1 Le complexe FT-FVIIa ..... - 51 -

2.2.2.2 Le TFPI ..... - 51 -

2.2.3 L'amplification ..... - 52 -

2.2.3.1 Le FIX ..... - 52 -

2.2.3.2 Le FXIa ..... - 53 -

2.2.4 Propagation ..... - 54 -

2.2.4.1 Les exosites 1 et 2 de la thrombine ..... - 54 -

2.2.4.2 Promouvoir l'activité du cofacteur II de l'héparine (HCII) ..... - 54 -

2.2.4.3 Le complexe protéine C/protéine S ..... - 55 -

2.3 Potentielles cibles de la fibrinolyse ..... **- 55 -**

2.3.1 Inhiber le PAI-1 ..... - 56 -

2.3.2 Inhiber le TAFI ..... - 56 -

2.3.3 Cibler la fibrine ..... - 56 -

3. Des oligonucléotides - médicaments ..... - 58 -

3.1 Définition – Les aptamères ..... **- 58 -**

3.2 Synthèse des aptamères ..... **- 60 -**

3.3 Conclusion ..... **- 63 -**

TROISIEME PARTIE : Médicaments antithrombotiques en développement

1- Panomara des antithrombotiques en développement ..... - 66 -

1.1 Méthodologie ..... - 66 -

1.2 Résultats ..... - 66 -

2- Hémostase primaire ..... - 68 -

2.1 Cibler le facteur von Willebrand ..... - 68 -

2.1.1 ARC1779 ..... - 68 -

2.1.2 Caplacizumab ..... - 71 -

2.1.3 AJW200 ..... - 73 -

2.2 Antagonistes du récepteur GPIb plaquettaire ..... - 73 -

2.3 Antagonistes du récepteur au thromboxane A_2 ..... - 74 -

2.3.1 Terutroban ..... - 74 -

2.3.2 Picotamide ..... - 78 -

2.3.3 Z-335 ..... - 79 -

2.3.4 Synthèse ..... - 79 -

2.4 Bloquer le récepteur EP_3 ..... - 80 -

2.5 Antagoniser le récepteur PAR-1 ..... - 82 -

2.6 Inhiber les autres glycoprotéines de surface thrombocytaires ..... - 84 -

2.6.1 Revacept ..... - 84 -

2.6.2 DZ-697b ..... - 87 -

2.7 Les antagonistes du récepteur $5HT_{2A}$ thrombocytaire ..... - 87 -

2.8 Synthèse ..... - 88 -

3- Coagulation ..... - 90 -

3.1 Inhibition de la phase d'initiation ..... - 90 -

3.1.1 Molécules ciblant le FVIIa ..... - 90 -

3.1.1.1 Tifacogin ..... - 90 -

3.1.1.2 rNAPc2 ..... - 91 -

3.1.1.3 Facteur VIIai ..... - 92 -

3.2 Inhibition de la phase d'amplification ..... - 93 -

3.2.1 Cibler le FIX et le FIXa ..... - 93 -

3.2.1.1 IXai ..... - 93 -

3.2.1.2 SB249417 ..... - 93 -

3.2.1.3 TTP889 ..... - 94 -

3.2.1.4 Pegnivacogin ..... - 94 -

3.2.1.5 Synthèse ..... - 98 -

3.2.2 Facteur XIa ..... - 99 -
3.2.2.1 BMS262084 ..... - 99 -
3.2.2.2 ISIS-416858 ..... - 99 -
3.3 Inhibition de la propagation ..... - 102 -
3.3.1 Molécules ciblant la thrombine ..... - 102 -
3.3.1.1 Historique ..... - 102 -
3.3.1.2 ARC183 ..... - 102 -
3.3.1.3 NU172 ..... - 103 -
3.3.1.4 Odiparcil ..... - 104 -
3.3.2 Analogue recombinant de la thrombomoduline ..... - 105 -
3.3.3 Inhiber le FVIII ..... - 107 -
3.3.4 La Protéine C recombinante ..... - 108 -
3.4 Conclusion ..... - 109 -
4- Fibrinolyse ..... - 111 -
4.1 Molécules promouvant la fibrinolyse endogène ..... - 111 -
4.1.1 Les inhibiteurs du TAFIa ..... - 111 -
4.1.2 Les inhibiteurs du PAI-1 ..... - 111 -
4.2 Molécules thrombolytiques ..... - 112 -
4.2.1 La plasmine et ses dérivés ..... - 112 -
4.2.1.1 Plasmine ..... - 113 -
4.2.1.2 Micro-plasmine ..... - 114 -
4.2.2 Alfiméprase ..... - 115 -
4.2.3 Troplasminogène alpha 118
4.3 Conclusion 119

QUATRIEME PARTIE : Conclusion et perspectives

Liste des Annexes 125
Bibliographie 142

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de la paroi vasculaire ..... - 16 -

Figure 2 : Schéma de l'hémostase primaire ..... - 18 -

Figure 3 : Détail de la cascade de la coagulation ..... - 20 -

Figure 4 : Mécanisme d'action des protéines C et S ..... - 21 -

Figure 5 : Mise en place et inhibition de la fibrinolyse ..... - 22 -

Figure 6 : Etapes de formation d'une plaque d'athérome ..... - 25 -

Figure 7 : Cibles des médicaments antiplaquettaires commercialisés dans l'Union Européenne ..... - 28 -

Figure 8 : Cibles pharmacologiques des anticoagulants actuellement commercialisés en France ..... - 30 -

Figure 9 : Schéma de la structure chimique d'une héparine ..... - 30 -

Figure 10 : Structure de Fondaparinux ..... - 32 -

Figure 11 : Phases préclinques de sélection d'un candidat médicament ..... - 41 -

Figure 12: Structure du facteur Von Willebrand et de ses sites de liaison ..... - 43 -

Figure 13 : Valeurs de forces de cisaillements dans différents types de vaisseaux sanguins ..... - 45 -

Figure 14 : Conséquences de l'activation du récepteur PAR-1 par la thrombine ..... - 47 -

Figure 15 : Schéma de synthèse des nouvelles cibles antiplaquettaires ..... - 50 -

Figure 16 : Principe de la méthode conventionnelle du SELEX ..... - 61 -

Figure 17 : Principe de la méthode du CE-SELEX ..... - 62 -

Figure 18 : Requête créée pour l'extraction de PharmaProjects d'une liste de molécules antithrombotiques en développement clinique ..... - 66 -

Figure 19 : Cibles antithrombotiques majoritairement exploitées pour les molécules en cours de développement clinique ..... - 67 -

Figure 20 : Répartition des médicaments antithrombotiques selon leur stade de développement clinique ..... - 67 -

Figure 21 : Procédés d'obtention des molécules antithrombotiques en cours de développement clinique ..... - 68 -

Figure 22 : Séquence de ARC1779 ..... - 68 -

Figure 23 : Mode d'action de Caplacizumab ..... - 71 -

Figure 24 : Formule de Terutroban ..... - 75 -

Figure 25 : Formule de Picotamide ..... - 78 -

Figure 26 : Formule de Z-335 et de son métabolite ..... - 79 -

Figure 27 : Synthèse des antiplaquettaires ciblant la voie du TxA_2 ..... - 80 -

Figure 28 : Formule de DG-041 ..... - 81 -

Figure 29 : Formule de Vorapaxar (ZONTIVITY®) ..... - 82 -

Figure 30 : Formule de Atopaxar (E5555) ..... - 83 -

Figure 31 : Schéma de Revacept ..... - 85 -

Figure 32 : Mécanisme d'action de Revacept ..... - 85 -

Figure 33 : Formule de Temanogrel ..... - 88 -

Figure 34 : Synthèse des antiplaquettaires en cours de développement clinique, et de leurs cibles pharmacologiques ..... - 89 -

Figure 35 : Mécanisme d'action de rNAPc2 ..... - 91 -

Figure 36 : Structure de Pegnivacogin (RB006) et de Anivamersen (RB007) ainsi que de leur hybridation ..... - 94 -

Figure 37 : Effet de l'administration de différentes doses de REG1 ..... - 97 -

Figure 38 : Schéma général des domaines du FIXa ciblés par les molécules antithrombotiques ..... - 98 -

Figure 39 : Formule de BMS-262084 ..... - 99 -

Figure 40 : Mécanisme d'action de ISIS-416858 ..... - 100 -

Figure 41 : Formule d'Odiparcil ..... - 104 -

Figure 42 : Mécanisme d'action de RECOMODULIN ..... - 105 -

Figure 43 : Structure de la PC/PCa ..... - 108 -

Figure 44 : Synthèse des molécules anticoagulantes faisant actuellement l'objet de recherche clinique, et de leurs cibles pharmacologiques ..... - 110 -

Figure 45 : Formules de Diaplasinin et Tiplasinin ..... - 112 -

Figure 46 : Schéma de la plasmine et de la micro-plasmine ..... - 113 -

Figure 47 : Synthèse des molécules thrombolytiques en cours de dévelopement clinique et de leurs cibles pharmacologiques ..... -119-

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les facteurs de la coagulation ..... - 19 -

Tableau II : Méthodes d'obtention des HBPM commercialisées en France ..... - 31 -

Tableau III : Propriétés des AVK ..... - 33 -

Tableau IV : Propriétés des AOD ..... - 35 -

Tableau V : Caractéristiques de l'antithrombotique idéal ..... - 39 -

Tableau VI : Synthèse des essais cliniques évaluant ARC1779 ..... - 70 -

Tableau VII : Synthèse des essais cliniques évaluant Terutroban (S18886) ..... - 77 -

Tableau VIII : Synthèse des essais cliniques évaluant REG1 ..... - 96 -

Tableau IX : Résultats de l'essai de phase II évaluant ISIS-416858 (Büller *et al.,* 2015) ..... - 101 -

Tableau X : Aptamères ciblant la thrombine en phase de développement clinique ..... - 104 -

Tableau XI : Synthèse des essais cliniques pour Alfiméprase ..... - 117 -

ABRÉVIATIONS

5-HT : 5-Hydroxy-Tryptamine

ACC : *American College of Cardiology*

ACS : *Acute Coronary Syndrome* – syndrome coronaire aigu

ADEP : *Atherosclerotic Disease Evolution by Picotamide*

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

ADP : Adénosine Di-Phosphate

Akt : protéine kinase B

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale de la Sécurité des Médicaments et des produits de santé

AMPc : Adénosine Mono-Phosphate cyclique

AOD : Anticoagulants Oraux Directs

ARN : Acide Ribo-Nucléique

ARNm : Acide Ribo-Nucléique messager

ASO : *Allele Specific Oligonucleotide* – oligonucléotide spécifique d'allèle

AT : Anti-Thrombine

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

AVK : Antagonistes de la Vitamine K

BMS : Bristol-Myers Squibb

CAD : *Coronary Artery Disease* – maladie artérielle coronarienne

CD39 : Cluster de Differentiation 39

CDC : *Centers for Disease Control and prevention* – centres pour le contrôle et la prévention des maladies

CE-SELEX : *Capillary Electrophoresis-SELEX* – SELEX par électrophorèse capillaire

CIVD : Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée

CNIL : Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés

COX : Cyclo-Oxygénase

CPP : Comité de Protection des Personnes

CRP : *C Reactive Protein* - protéine C réactive

CYP3A4 : Cytochrome P450 3A4

Da : Daltons

DAS : Données Actuelles de la Science

DMLA : Déficience Maculaire Liée à l'Âge

ECG : Electro-Cardio-Gramme

EGF : *Epidermal Growth Factor* - facteur de croissance épidermique

EMA : *European Medicines Agency* – agence européenne du médicament

EP : Embolie Pulmonaire

EP_3 receptor : récepteur 3 à la Prostaglandine E

EPCR : *Endothelial Protein C Receptor* - récepteur endothélial de la protéine C

Fc : Fragment constant

FDA : *Food and Drug Administration*

FT : Facteur Tissulaire

GAG : Glycos-Amino-Glycane

Gla domain : domaine gamma-carboxyglutamique

GP : Glyco-Protéine

GPCR : *G Protein-Coupled Receptor* – récepteur couplé à la protéine G

GSK : Glaxo-Smith-Kline

HBPM : Héparines de Bas Poids Moléculaire

HCII : Cofacteur II de l'Héparine

HER2 : *Human Epithelial growth factor Receptor 2* – récepteur 2 au facteur de croissance épithélial humain

HNF : Héparines Non-Fractionnées

HMWK : *High Molecular Weight Kininogen* - Kininogène de haut poids moléculaire

IDM : Infarctus Du Myocarde

IMC : Indice de Masse Corporelle

IMPD : *Investigational Medicinal Product Dossier*

INR : *International Normalized Ratio* – ratio international normalisé

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

ICP : Intervention Coronarienne Percutanée

IgG : Immunoglobuline G

ISRS : Inhibiteurs Sélectifs de la Recapture de la Sérotonine

IV : Intra-Veineux

K_d : constante de dissociation

kDa : kilo Daltons

LNA : *Locked Nucleic Acids* – acides nucléiques fermés

LDL-CT : *Low Density Lipoprotein-Cholesterol* – cholesterol, lipoprotéine de faible densité

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinases*

NAPc2 : *Nematode Anticoagulant Protein c2*

MCP1 : *Monocyte Chemotactic Protein 1*

PAI-1 : *Plasminogen Activator Inhibitor 1* – inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1

PAR : *Protease Activated Receptor* – récepteur activé par une protéase

PC : Protéine C

PCR : *Polymerase Chain Reaction* – polymérisation par réaction en chaîne

PDGF : *Platelet Derived Growth Factor* – facteur de croissance dérivant des plaquettes

PEG : Poly-Ethylène-Glycol

PERFORM : *Prevention of cerebrovascular and cardiovascular Events of ischemic origin with teRutroban in patients with history oF ischemic strOke or tRansient ischeMic attack*

PGE_2 : ProstaGlandine E_2

PGH_2 : ProstaGlandine H_2

PGI_2 : Prostacycline

PGG_2 : ProstaGlandine G_2

PL : Phospholipides

PS : Protéine S

PTT : Purpura Thrombotique Thrombopénique

RT-PCR : *Reverse Transcriptase-PCR*

sb : simple-brin

SC : Sous-Cutané

SELEX : *Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment* – évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel

SERM : *Selective Estrogen Receptor Modulator* – modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes

sICAM : *soluble Intracellular Adhesion Molecule*

SME : Signaux Micro-Emboliques

TAFI : *Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor* – inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine

TAIPAD : *Thromboxane Antagonism In Peripheral Arterial Disease study*

TC+A : Temps de Céphaline Activée

TFPI : *Tissue Factor Pathway Inhibitor* – inhibiteur de la voie du facteur tissulaire

TIH : Thrombopénie Induite par les Héparines

TP : Taux de Prothrombine

t-PA : *tissue Plasminogen Activator* – activateur tissulaire du plasminogène

TQ : Temps de Quick

TRA-CER : *Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction*

TRAP : *Thrombin Receptor Activating Peptide* – peptide activant le récepteur à la thrombine

TVP : Thrombose Veineuse Profonde

TxA_2 : Thromboxane A_2

u-PA : Pro-Urokinase

VE : Voie Extrinsèque

VEGF : *Vascular Endothelium Growth Factor* – facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VI : Voie Intrinsèque

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

vWF : Facteur von Willebrand

XNA : Acide Xéno-Nucléique

INTRODUCTION

Les pathologies cardiovasculaires représentent près de 30 % des causes de décès dans le monde, en première place devant les pathologies cancéreuses (CDC, 2014). La thrombose est une pathologie cardiovasculaire. Il s'agit de l'occlusion d'un vaisseau sanguin par un caillot dont la formation est permise par des éléments constitutifs du sang. Thrombose veineuse et artérielle se distinguent à la fois sur le plan physiopathologique et sur la prise en charge thérapeutique. Actuellement, les principales classes de médicaments permettant de prévenir la thrombose sont les antiplaquettaires, les héparines, les antagonistes de la vitamine K (AVK) et les inhibiteurs directs de la thrombine et du facteur Xa encore appelés anticoagulants oraux directs (AOD). Quant aux médicaments thrombolytiques, ils permettent un traitement curatif du caillot déjà formé.

Avec le vieillissement de la population des pays dits « développés », l'incidence des pathologies thrombotiques augmente exponentiellement avec l'âge pour les deux sexes. Cette tendance s'explique par plusieurs phénomènes, notamment de plus nombreuses comorbidités (obésité, augmentation de la tension artérielle, dyslipidémies), l'augmentation de la prévalence de l'athérosclérose, une plus grande immobilité des individus, la prise de certains médicaments tels que les modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes chez les femmes (SERM) (Lowe, 2004). L'augmentation de la concentration plasmatique de certains facteurs de la coagulation avec l'âge est également observée (Previtali *et al.,* 2011).

La thrombose artérielle est actuellement à l'origine de dix millions de décès par an dans le monde, avec une augmentation de 25 à 35 % ces vingt dernières années. Le nombre de décès consécutifs à une thrombose veineuse est sensiblement le même. Les cardiopathies ischémiques telles que l'infarctus du myocarde sont la première cause de décès dans le monde (Rosendaal et Raskob, 2014).

Devant la multiplicité des thérapies antithrombotiques actuellement disponibles, il pourrait paraitre peu pertinent de poursuivre la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques antithrombotiques, et *a fortiori* le développement de molécules associées. Si l'arsenal thérapeutique pour la maladie thrombotique existe, il y a des inconvénients à l'utilisation de ces différentes classes pharmacologiques. Par ailleurs, les médicaments actuellement disponibles n'exploitent pas toutes les cibles potentielles antithrombotiques connues à ce jour. L'intérêt du développement de nouvelles molécules résiderait en la possibilité de s'affranchir des effets indésirables et des difficultés d'utilisation tels que le risque hémorragique lors de la prise d'antithrombotiques, la thrombopénie induite par les héparines, le suivi régulier de l'INR (*Intertional Normalized Ratio*) et les adaptations posologiques des AVK rendant l'observance d'autant plus difficile, ou encore l'absence d'antidote lors de la prise d'anticoagulants oraux directs (AOD).

Notons qu'en 2013, les AVK représentaient la première cause d'hospitalisation pour cause de iatrogénie en France. Près de 13 % des hospitalisations pour effets indésirables à l'administration d'un médicament sont imputés aux AVK. Ils sont responsables de 5 000 accidents hémorragiques d'évolution fatale par an en France. En 2012, 1,7 % des bénéficiaires du régime général de la Sécurité Sociale étaient traités par AVK. Depuis, ce pourcentage a tendance a diminué au profit des AOD (Boudali, 2013 ; Abane *et al.,* 2014).

Dans la suite de ce manuscrit seront présentés les mécanismes de l'hémostase, la physiopathologie de la thrombose artérielle et de la thrombose veineuse, les classes pharmacologiques des médicaments antithrombotiques actuellement disponibles en soulignant les avantages et inconvénients de leur utilisation. Dans une deuxième partie, le profil de « l'antithrombotique idéal » sera dressé. Il sera alors discuté de la pertinence de potentielles cibles pharmacologiques, au regard des connaissances actuelles de la physiologie de l'hémostase. Les molécules antithrombotiques en cours de développement clinique seront ensuite présentées selon leur cible pharmacologique en explicitant les données actuellement disponibles pour les essais cliniques en cours.

PREMIERE PARTIE

HEMOSTASE, THROMBOSE ET MEDICAMENTS ANTITHROMBOTIQUES

"Heparin is the drug we love to hate"
A. Michael LINCOFF, MD
CLEVELAND CLINICAL FOUNDATION, OHIO

1- L'HEMOSTASE

1.1 Le maintien de l'hémostase

L'hémostase est un phénomène physiologique essentiel à l'organisme assurant l'intégrité du système vasculaire, la bonne circulation du flux sanguin, et par là-même l'apport en nutriments à l'ensemble des cellules de l'organisme. Son fonctionnement est finement régulé par de nombreux médiateurs aux rôles parfois paradoxaux. A la suite d'une rupture de l'intégrité vasculaire, l'hémostase est classiquement décomposée en trois processus : l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse.

Une brèche vasculaire déclenche plusieurs phénomènes :

- la réduction du flux sanguin par une vasoconstriction
- la formation d'un clou plaquettaire
- l'activation et l'agrégation plaquettaire
- la génération de thrombine qui permet de renforcer le clou plaquettaire
- la fibrinolyse qui détruit le caillot formé

Si l'hémostase est un phénomène indispensable à la survie, un dysfonctionnement de ce système complexe peut conduire à la formation d'un thrombus ou au contraire à une hémorragie (Turpie et Esmon, 2011).

1.1.1 Le maintien de l'intégrité vasculaire

Les parois vasculaires de l'organisme présentent une *intima*, directement au contact du flux sanguin (figure 1). L'*intima* est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales séparée du sous-endothélium par une lame basale.

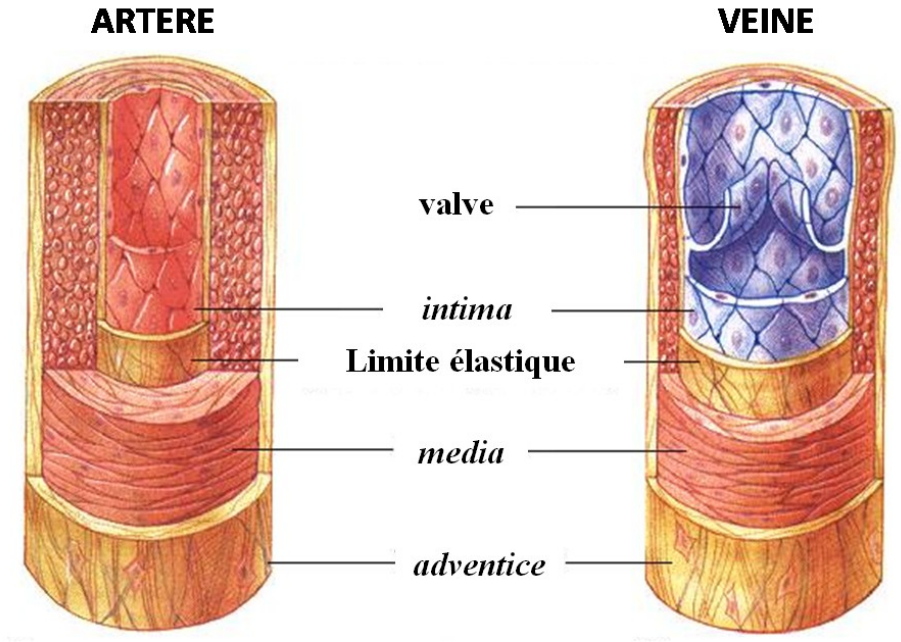


Figure 1 : Structure de la paroi vasculaire (Corbett, 1995)

L'endothélium vasculaire joue un rôle primordial dans le maintien de l'intégrité de la circulation sanguine *via* :

- les **prostacyclines (PGI_2)** : libérées lorsque la pression sanguine est trop élevée dans un vaisseau. Elles ont un rôle vasodilatateur.

- le **facteur de Von Willebrand** (**vWF**) : une glycoprotéine synthétisée par l'endothélium et stockée au niveau des corps de Weibel-Palade. Son rôle est fondamental dans l'adhésion plaquettaire. De plus, le vWF circule dans le plasma lié au FVIII, ce qui protège ce dernier de la protéolyse.

- l'**héparane sulfate** : cofacteur de l'antithrombine, inhibant la propagation du thrombus. Il est secrété à la surface de l'endothélium de part et d'autre du thrombus formé.

- la **protéine C** : activée par le complexe thrombomoduline/thrombine. Elle inactive, en présence de son cofacteur la protéine S, le FVa et le FVIIIa.

- le **t-PA** : libéré par l'endothélium, son rôle est de permettre la conversion du plasminogène en plasmine qui lyse la fibrine formée par le mécanisme de coagulation.

- l'**inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1)** qui retarde la lyse du thrombus formé.

De plus, l'endothélium vasculaire libère des substances telles que le monoxyde d'azote (NO) et l'ectonucléotidase CD39 qui empêchent l'activation plaquettaire en limitant leur adhésion à la paroi vasculaire (Mackman, 2008). Certains agents du sous-endothélium jouent également un rôle dans le maintien de l'hémostase. C'est le cas du collagène de type IV, un activateur plaquettaire particulièrement thrombogène.

1.1.2 Hémostase primaire

Les plaquettes circulent à l'état inactivé dans le système vasculaire, sous forme discoïde. Elles jouent un rôle de sentinelles vis-à-vis de l'intégrité vasculaire. Celles-ci vont s'activer à différentes occasions : lors d'une brèche vasculaire, lors de modifications de la pression sanguine ou lorsque des substances activatrices se trouvent au contact de ces thrombocytes (Turpie et Esmon, 2011).

Lors d'une brèche vasculaire, le collagène sous-endothélial est mis à nu, au contact des plaquettes, ce qui provoque leur **adhésion** en présence du facteur von Willebrand (vWF) qui sert de ciment entre la GPIb plaquettaire et le collagène sous-endothélial (figure 2).

La première couche de plaquettes étant en place, l'**agrégation** plaquettaire peut alors avoir lieu par recrutement des thrombocytes circulants. Ceux-ci se fixent à la monocouche thrombocytaire *via* GPIIb/IIIa (ou intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$), un récepteur de surface thrombocytaire permettant l'agrégation plaquettaire. Ce thrombus est alors fragile.

Les plaquettes changent de forme, s'**activent** et libèrent leurs granules dont certaines permettront la solidification du caillot, c'est-à-dire l'agrégation irréversible (figure 2, Boneu et Cazenave, 1982). L'activation plaquettaire est permise lorsque la thrombine, une sérine-protéase, active le PAR-1 thrombocytaire (*protease activated receptor 1*). Les granules libérées permettent également de promouvoir le recrutement, l'adhésion, l'agrégation et enfin l'activation des plaquettes (Mackman, 2008 ; Broos *et al.,* 2011).

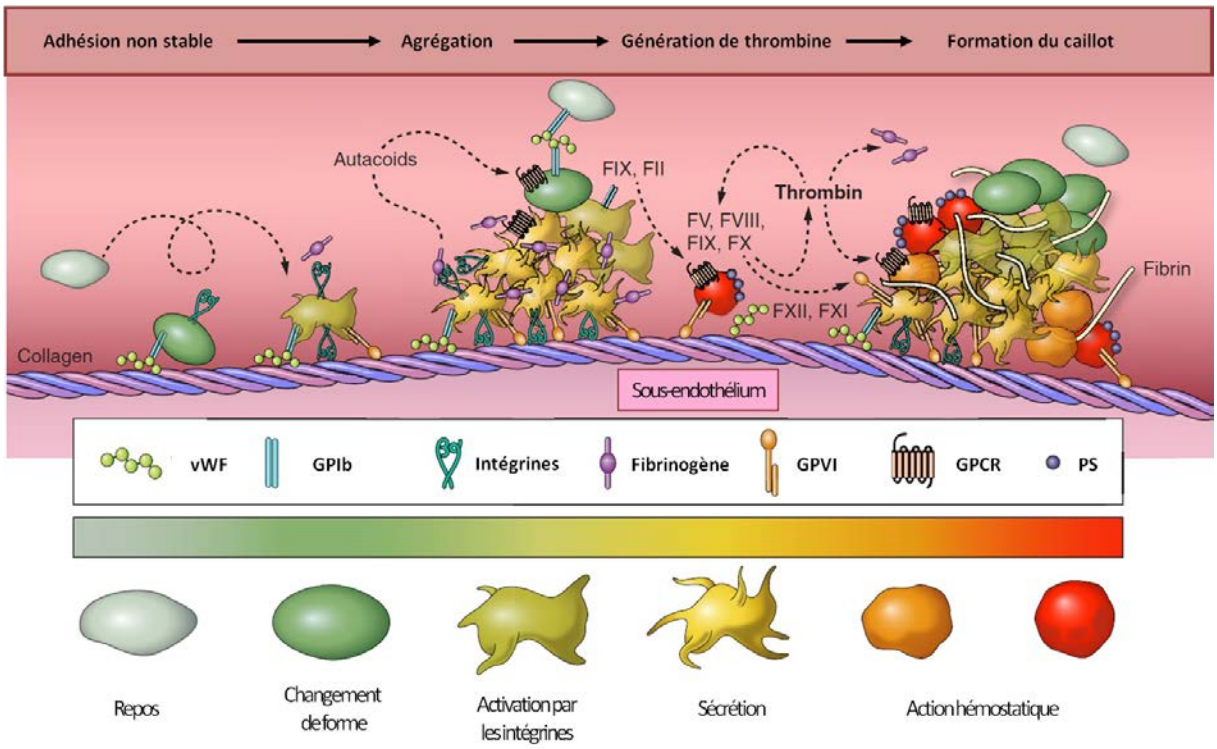


Figure 2 : Schéma de l'hémostase primaire (Versteeg *et al.,* 2013)

Cette étape constitue la formation du clou plaquettaire, encore appelé thrombus blanc (Boneu et Cazenave, 1982).

1.1.3 Coagulation

1.1.3.1 Activation de la coagulation

La coagulation est un processus au cours duquel les facteurs de la coagulation inactivés sont activés et interagissent entre eux, permettant la formation de la fibrine qui va renforcer le clou plaquettaire. Le détail des caractéristiques des facteurs de la coagulation est présenté dans le tableau I :

Tableau I : Les facteurs de la coagulation (d'après Boneu et Cazenave, 1982 ; Hoffbrand et Moss, 2011)

	NOM	Vitamine-K dépendant ?	DEMI-VIE
Facteur I	fibrinogène	non	4-6 jours
Facteur II	prothrombine	oui	3-4 jours
Facteur V	proaccélérine	non	12-36 heures
Facteur VII	proconvertine	oui	4-6 heures
Facteur VIII	anti-hémophile A	non	10-16 heures
Facteur IX	anti-hémophile B	oui	24 heures
Facteur X	Stuart	oui	1-2 jours
Facteur XI	Rosenthal	non	1-2 jours
Facteur XII	Hageman	non	2-3 jours
Facteur XIII	stabilisant la fibrine	non	3-7 jours

L'enzyme centrale de la coagulation est la thrombine qui permet la conversion du fibrinogène en fibrine, constituant principal d'un caillot ou thrombus (figure 3). La coagulation se compose de trois phases :

- l'**initiation** débute lorsque le facteur tissulaire, présent en très faibles quantités, est exposé au flux sanguin et se trouve au contact d'une sérine protéase circulante, le FVIIa (facteur VII activé) de la voie extrinsèque. Facteur tissulaire et FVIIa forment alors la tenase extrinsèque qui active une petite quantité de FX et de FIX. Le FXa se lie au FVa plaquettaire ; il se forme alors le complexe prothrombinase (FVa, FXa, Ca^{2+}, phospholipides) qui active la prothrombine en thrombine.

Le FT est une protéine membranaire sous-endothéliale retrouvée sur les fibroblastes et les péricytes de la media et de l'adventice des cellules musculaires lisses de la paroi des vaisseaux sanguins (Turpie et Esmon, 2011). En conditions physiologiques, l'endothélium joue un rôle de barrière entre le FT sous-endothélial et le sang circulant afin de d'éviter l'activation de la voie extrinsèque.

- l'**amplification** débute lorsque les premières traces de thrombine, formées au cours de la phase d'initiation, activent et recrutent de nouvelles plaquettes. Ceci a pour effet l'activation du FV, FVIII et du FXI. Quant au FXIa, il active le FIX (Boneu et Cazenave, 1982). L'activation du FV et du FVIII conduit à la génération explosive de la thrombine. Il s'agit donc d'une auto-amplification (Turpie et Esmon, 2011).

- la **propagation** débute par l'activation du FXI à la surface des plaquettes. Le FXIa active à son tour le FIX (Turpie et Esmon, 2011). L'association du FIXa et FVIIIa, en présence de Ca^{2+}, forment la tenase intrinsèque. Cette dernière active le FX qui se complexe au FVa formant ainsi la prothrombinase responsable de la génération explosive de la thrombine. Le mécanisme permettant l'activation de FX par la tenase intrinsèque est appelé Boucle de Josso (Hemker, Henrik et Beguin, 1994).

A la fin de ce processus, le caillot se forme. La thrombine clive le fibrinogène en fibrine qui renforce le clou plaquettaire (figure 3). Par la suite, le réseau de fibrine est stabilisé par le FXIIIa qui est activé par la thrombine (Hoffman, 2003).

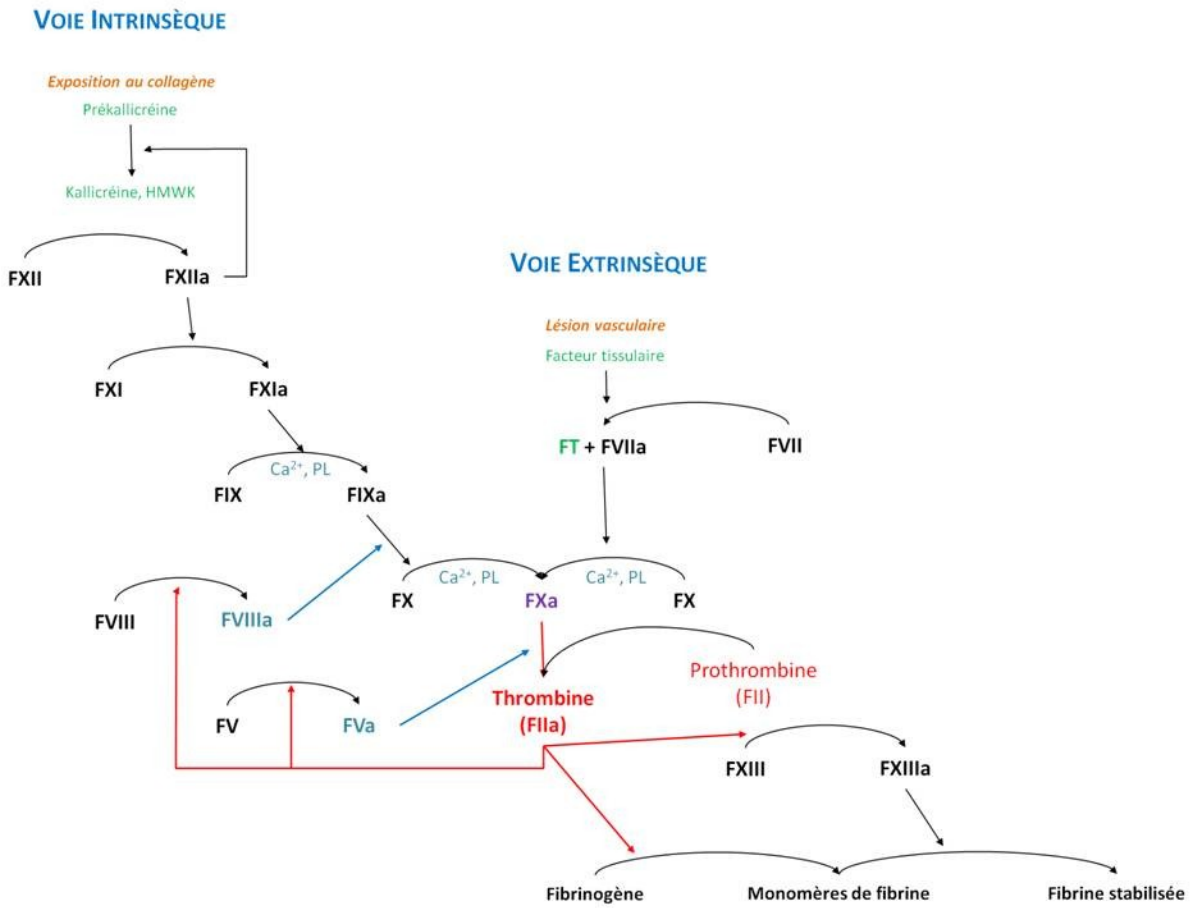


Figure 3 : Détail de la cascade de la coagulation (d'après Hemker, Coenraad et Beguin, 1994)
HMWK : *High Molecular Weight Kininogen* : Kininogène de haut poids moléculaire ; **PL :** Phospholipides

Enfin, de récents travaux mettent en évidence le rôle d'ARNm libérés par les cellules lésées qui pourraient déclencher la coagulation en activant le FXII (Kannemeier *et al.,* 2007).

1.1.3.2 La régulation de la coagulation

La coagulation est un phénomène finement régulé. Les inhibiteurs de la coagulation permettent de limiter l'extension du caillot en inhibant les facteurs activés de la coagulation. Parmi les inhibiteurs de la coagulation, le **TFPI** (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*) est libéré par l'endothélium et forme le complexe FT-FXa-FVIIa-TFPI ce qui inhibe le FT, le FXa et le FVIIa. Le TFPI empêche donc la génération de FXa et FIXa, ce qui en fait un inhibiteur de la phase d'initiation de la coagulation (Boneu et Cazenave, 1982).

L'**antithrombine** est une serpine, une glycoprotéine d'origine hépatique dont l'action consiste en l'inhibition de la thrombine libre et du FXa ainsi que des facteurs IXa, XIa et XIIa en formant un complexe équimolaire de ces facteurs, ce qui inhibe leur activité (Turpie et Esmon, 2011). Elle représente 75 % de la capacité du plasma à inhiber la thrombine ce qui en fait son inhibiteur principal. Son action inhibitrice est considérablement accélérée en présence de glycosaminoglycanes tels que l'héparane sulfate endothélial. En revanche, elle est inactive sur la thrombine liée à la fibrine (Boneu et Cazenave, 1982).

La formation du **complexe thrombine-thrombomoduline** à la surface de l'endothélium tend à diminuer la quantité de thrombine libre et donc à empêcher la fibrinolyse et l'activation plaquettaire. En effet, le complexe thrombine-thrombomoduline masque l'accès du site de liaison du fibrinogène sur la thrombine, de même qu'il masque le récepteur plaquettaire de la thrombine (Turpie et Esmon, 2011).

Enfin, le **système de la protéine C** (PC), protéine d'origine hépatique, est un système inhibiteur des facteurs V et VIII. La PC est activée par la thrombine lorsqu'elle est liée à la thrombomoduline (Boneu et Cazenave, 1982). La PC, vitamine K-dépendante, est clivée par le complexe thrombine-thrombomoduline, ce qui l'active en PCa après liaison au récepteur endothélial de la protéine C (EPCR). La PCa inhibe alors les facteurs V et VIII au contact de son cofacteur, la protéine S, ce qui diminue la vitesse de génération de la thrombine (figure 4, Martinelli, De Stefano et Mannucci, 2014).

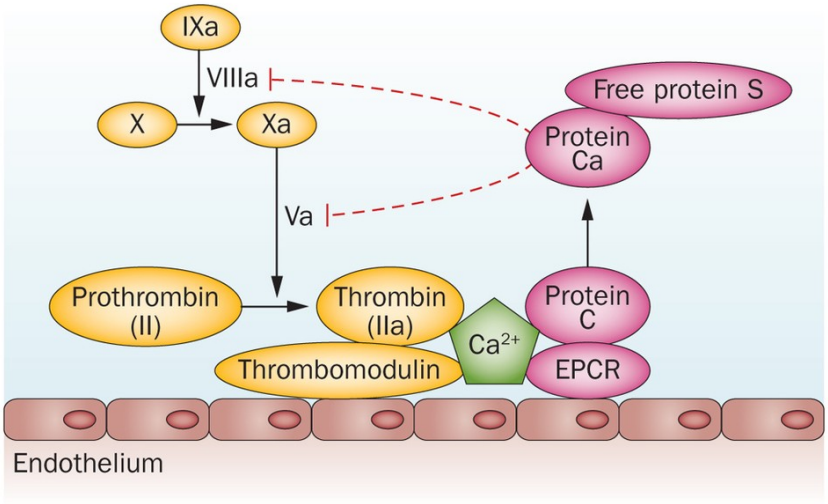


Figure 4 : Mécanisme d'action des protéines C et S (Martinelli, De Stefano et Mannucci, 2014)
EPCR : Récepteur endothélial de la protéine C

Enfin, l'**α2-macroglobuline** est une glycoprotéine endothéliale qui inhibe notamment la thrombine et la kallicréine. De même, l'**α1-antitrypsine** inhibe la thrombine, la kallicréine et le FXIa, mais de manière très faible (Boneu et Cazenave, 1982).

1.1.4 La fibrinolyse

La fibrinolyse se décompose en deux phases : l'**initiation** et la **propagation**. Elle consiste en l'activation du plasminogène en plasmine qui protéolyse la fibrine et le fibrinogène. La protéolyse du fibrinogène génère des fragments X (inhibant les plaquettes), Y (inhibant la thrombine), D et E. Ces fragments peuvent se complexer avec la fibrine empêchant leur polymérisation et sont appelés produits de dégradation du fibrinogène. Enfin, la plasmine dégrade la GPIb thrombocytaire, réduisant la durée de vie des thrombocytes (Boneu et Cazenave, 1982).

1.1.4.1 L'activation de la fibrinolyse

Il existe plusieurs voies d'activation de la fibrinolyse :

- le **t-PA**, une sérine-estérase libérée par les cellules endothéliales, initie la conversion du plasminogène en se liant avec celui-ci à la surface de la fibrine, ce qui permet la formation de la plasmine. Par la suite, il y a formation d'un complexe ternaire entre le site de liaison lysine du plasminogène, le t-PA et les résidus lysine C-terminaux de la fibrine partiellement dégradée (figure 5). Ceci augmente l'efficacité catalytique de la formation de plasmine (Boneu et Cazenave, 1982).

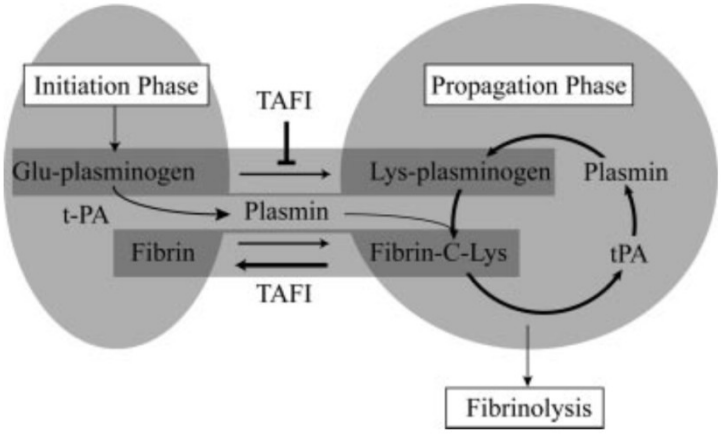


Figure 5 : Mise en place et inhibition de la fibrinolyse (Mosnier, Meijers et Bouma, 2001)

- la pro-urokinase (**u-PA**) est activée par le système contact de la coagulation. Elle est notamment libérée par les cellules endothéliales et présente quelques analogies structurales avec le t-PA et le plasminogène. Cette glycoprotéine monocaténaire est activée en glycoprotéine bicaténaire à fonction sérine-estérase par la kallicréine et la plasmine adsorbées à la surface de la fibrine. Elle active le plasminogène (Boneu et Cazenave, 1982). Cette voie d'activation est secondaire par rapport à celle du t-PA.

- Le **système contact** de la coagulation est activé lorsque le facteur XII est adsorbé sur une surface électronégative (figure 3). Le FXIIa active alors la pré-kallikréine en kallikréine et le plasminogène en plasmine. Toutefois, la contribution de ce système est discutée (Boneu et Cazenave, 1982).

1.1.4.2 Inhibition de la fibrinolyse

Il existe au moins trois niveaux pour la régulation de la fibrinolyse :

- Inhibition des activateurs du plasminogène : l'enzyme **PAI-1** (*plasminogen activator inhibitor*-1) inhibe le t-PA et l'urokinase en formant un complexe avec le site sérine de ces enzymes. Son rôle est de prévenir l'activation intempestive de la fibrinolyse. Le PAI-1 provient des granules alpha des thrombocytes libérées lorsqu'elles sont activées.

- Inhibition directe de la plasmine libre par l'**α2-antiplasmine** qui forme un complexe avec celle-ci. L'α2-antiplasmine est inactive sur la plasmine adsorbée à la surface de la fibrine car son site sérine est déjà occupé par la fibrine. L'α2-macroglobuline inhibe également la plasmine mais non spécifiquement.

- *Via* la **thrombine** qui active également le facteur XIII et le TAFI qui concourent à stabiliser le réseau de fibrine.

Le TAFI (*Thrombin-Activitable Fibrinolysis Inhibitor*) est une enzyme découverte récemment (Bajzar et Nesheim, 1993), activée par une faible concentration de thrombine, en présence de thrombomoduline (Mosnier, Meijers et Bouma, 2001), ou par de fortes concentrations en thrombine (Mosnier et Bouma, 2006). Le TAFIa empêche le rétrocontrôle positif de la plasmine générant la phase de propagation de la fibrinolyse (figure 5). En protéolysant les résidus lysine C-terminaux de la fibrine partiellement dégradée, le TAFIa empêche la conversion du plasminogène en plasmine (Mosnier et Bouma, 2006).

1.2 La thrombose

La thrombose, du grec *thrombôsis* pour « faire coaguler » se définit comme un « phénomène pathologique consistant en la formation d'un thrombus (caillot sanguin formé de fibrine, de globules blancs et de plaquettes) dans une artère ou dans une veine » (Collectif Larousse, 2010). Lorsque le thrombus se forme, il s'étend rapidement de long des vaisseaux. Il existe physiologiquement des mécanismes inhibiteurs de la propagation du thrombus.

Thromboses veineuse et artérielle sont physiopathologiquement différentes, même si elles ont toutes deux pour origine l'activation des phénomènes de l'hémostase. Ces pathologies sont des causes majeures de morbidité et de mortalité à l'échelle mondiale. Des traitements anticoagulants sont utilisés aussi bien en prévention que pour le traitement de nombreux contextes thrombotiques (Mackman, 2008).

Rudolf Virchow, médecin franco-prussien né en 1821, associa dans son travail observations cliniques et expérimentations. Il s'intéressa à comprendre les mécanismes de formation de caillots de sang chez des patients victimes d'embolie pulmonaire (Monsuez, 2012). Il décrit alors le développement d'un caillot comme la formation d'un réseau fibreux. Il inventera les termes de « thrombose » et d'« embolie ». C'est également à cette période qu'il donne une liste des facteurs favorisant la thrombose veineuse (Kumar *et al.,* 2010) :

- la stase du sang dans les vaisseaux : **facteurs rhéologiques et hémodynamiques**
- la lésion ou le dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire : **facteurs vasculaires**
- l'hypercoagulabilité du sang : **facteurs sanguins**

Ces trois facteurs sont aujourd'hui connus sous le nom de **Triade de Virchow**. Elle permet d'expliquer toute situation thrombotique. Un thrombus se forme lorsque :

- l'endothélium vasculaire est endommagé, mettant le collagène sous-endothélial au contact direct du flux sanguin. Le collagène déclenche alors l'agrégation plaquettaire. Par ailleurs, le facteur tissulaire sous-endothélial sera également exposé et pourra activer le FVIIa et donc la voie extrinsèque de la coagulation. Il

y aura alors formation de thrombine et donc de fibrine qui renforce le clou plaquettaire (Turpie et Esmon, 2011)

- il y a un excès de facteurs ou un déficit en inhibiteurs de la coagulation
- lorsqu'il y a une insuffisance veineuse, notamment au niveau des veines des membres inférieurs

1.2.1 La thrombose veineuse

La thrombose veineuse est la troisième cause de mortalité par pathologie cardiovasculaire au niveau mondial (Mackman, 2008). Elle est à l'origine de pathologies telles que la thrombose veineuse profonde (TVP) et l'embolie pulmonaire (EP). La TVP survient fréquemment dans les grandes veines des membres inférieurs telles que la grande saphène. La TVP consiste en la formation d'un caillot à proximité d'une valvule vasculaire.

Plus généralement, les causes d'une TVP s'expliquent par la Triade de Virchow :

- **facteurs hémodynamiques** : stase veineuse prolongée due à un alitement, la compression des membres inférieurs, l'insuffisance veineuse chronique, dilatation veineuse, l'hypertension veineuse conduisant à un léger dépôt de thrombine à la surface de l'endothélium ce qui déclenche la coagulation.

- **facteurs vasculaires** : lésion endothéliale par de légers traumatismes.

- **facteurs sanguins** : hypercoagulabilité acquise ou innée par excès de facteurs, défaut d'inhibiteurs ou manque de facteurs de fibrinolyse, notamment en post-chirurgie.

Le thrombus formé dans ces conditions est particulièrement riche en fibrine et piège des hématies, d'où son nom de thrombus rouge. S'il y a fragmentation du caillot, notamment à l'occasion de turbulences, celui-ci risque de migrer vers la veine cave, l'oreillette puis le ventricule gauche pour finir dans l'artère pulmonaire et aboutir à une embolie pulmonaire (Turpie et Esmon, 2011).

1.2.2 La thrombose artérielle

La thrombose artérielle est la principale cause d'infarctus du myocarde et elle est à l'origine de près de 80 % des AVC. Ces deux pathologies représentent les deux causes principales de décès dans les pays dits « développés ».

La rupture d'une plaque athéromateuse présente dans une artère est la cause principale de thrombose artérielle et crée une lésion pariétale. La formation d'une plaque d'athérome a fréquemment lieu au niveau d'un embranchement vasculaire, notamment au niveau des artères coronaires.

Une plaque d'athérome se forme par accumulation sous endothéliale de lipoprotéines de faible densité (LDL-CT) qui vont s'oxyder. La région devient inflammatoire, ce qui provoque une vasoconstriction du vaisseau. Il y a également formation de fibres de collagène

et calcification. Cette structure complexe s'avère très instable et risque à tout moment de se rompre, provoquant un infarctus dy myocarde (IDM) ou un accident vasculaire cérébrale (AVC) (figure 6, Libby, Ridker et Hansson, 2011).

Au moment de la rupture de plaque, l'endothélium lésé est au contact du sang, ce qui déclenche la coagulation. Il se forme alors un thrombus blanc car les plaquettes sont au contact du collagène sous-endothélial et en présence du vWF, ce qui favorise leur agrégation (Mackman, 2008).

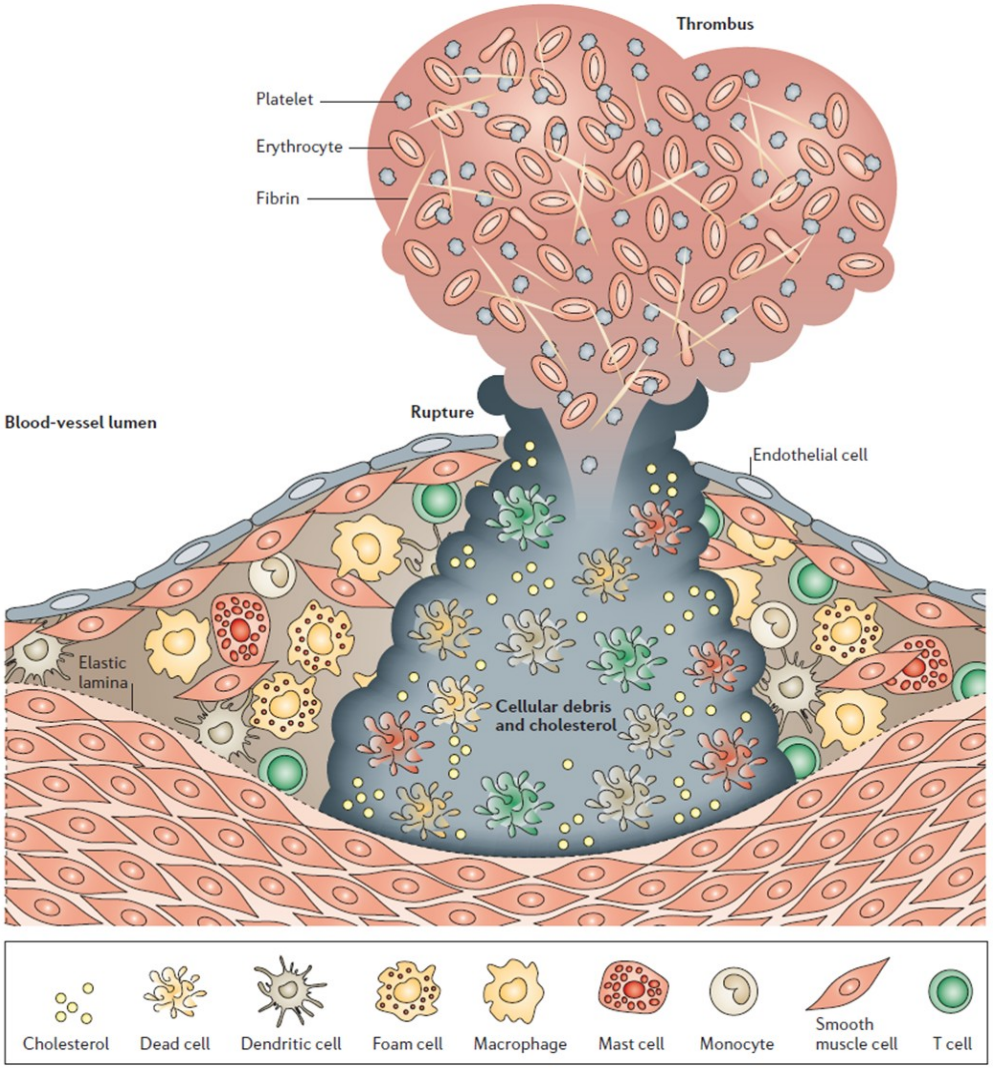


Figure 6 : Etapes de formation d'une plaque d'athérome (Hansson et Libby, 2006)

Le thrombus, d'abord mural, pourra aboutir à une occlusion totale du vaisseau à mesure que les plaquettes s'agrègent, ce qui provoque l'ischémie des tissus en aval. Les hématies viennent ensuite s'agréger au niveau du thrombus, ce qui forme le thrombus rouge (Elalamy et Hatmi, 2002).

1.2.3 Facteurs favorisant les thromboses

Les facteurs favorisant la thrombose peuvent être constitutifs ou acquis au cours de l'existence. Une liste de ces facteurs est présentée ci-dessous (Mackman, 2008 ; Hoffbrand et Moss, 2011) :

- Dyslipidémies

- Hypertension
- Diabète de type II
- Hyperuricémie
- Polyglobulie
- Hyperhomocystéinémie
- Consommation de tabac
- Obésité (IMC ≥ 30)
- ECG anormal
- Taux plasmatiques élevés en PCR, interleukine 6, fibrinogène, phospholipase A_2
- Anticoagulants lupiques
- Maladies affectant le collagène vasculaire
- Maladie de Behçet
- Varices
- Syndrome néphrotique
- Intervention chirurgicale
- Grossesse

A ces facteurs de risques, s'ajoutent des pathologies de l'hémostase, encore appelées thrombophilies. Parmi les plus fréquentes, citons le facteur V de Leiden, provoqué par une mutation du gène codant pour le FV (Arg506Gln). Cette mutation induit une résistance du FVa à l'action des protéines C et S (Orfanakis et Deloughery, 2013). C'est la plus fréquente des thrombophilie et elle concerne 5 à 10 % des populations caucasiennes (Dahlback, Carlsson et Svensson, 1993).

Citons également le syndrome des anticorps antiphospholipides. Des anticorps développés par les patients modulent l'action des cellules endothéliales, des monocytes, des plaquettes avec un effet prothrombotique. Ils interagissent également avec certains facteurs de la coagulation provoquant une résistance à la fibrinolyse du thrombus (Orfanakis et Deloughery, 2013).

De plus, certaines situations physiologiques ou pathologiques prédisposent à la thrombose veineuse : personnes âgées, femmes enceintes, augmentation du taux plasmatique de FVIII, de fibrinogène ou d'homocystéine (Hoffbrand et Moss, 2011).

Un des facteurs de risques principaux de la thrombose veineuse est la survenue d'un cancer, quelle que soit sa nature. Le lien entre cancer et thrombose a été pour la première fois décrit en 1865 par Trousseau. Les mécanismes mis en jeu sont encore mal connus. Des anomalies de l'hémostase sont retrouvées chez 90 % des patients atteints de cancer, mais seuls 15 % présentent des manifestations cliniques de leur hypercoagulabilité : accidents thromboemboliques, coagulation intravasculaire disséminée, thromboses veineuses. La thrombose représente la deuxième cause de décès chez les patients présentant un cancer, toutes localisations confondues (Orfanakis et Deloughery, 2013). Il faut distinguer d'une part les troubles hémostatiques imputables à la physiopathologie, et d'autre part ceux dus à la prise en charge thérapeutique.

Parmi les origines de cette hypercoagulabilité, citons l'immobilisation prolongée, les emboles vasculaires constituées de cellules néoplasiques, l'interaction des cellules tumorales

avec la paroi vasculaire, la compression induite par la tumeur provoquant une stase, l'atteinte de l'endothélium vasculaire par un cathéter, son irritation par la chimiothérapie, une intervention chirurgicale et des métastases (Gouin-Thibaut et Samama, 2000).

De plus, l'administration de thalidomide et de lenalidomide, indiqués dans le myélome multiple, induit un risque de thrombose veineuse profonde et d'embolie pulmonaire (Thériaque.org, 2015).

2- PRISE EN CHARGE MEDICAMENTEUSE DU RISQUE DE THROMBOSE

Les traitements anticoagulants sont prescrits pour prévenir ou traiter la thrombose. Ces médicaments sont utilisés dans de nombreux contextes pathologiques risquant de conduire à une thrombose artérielle ou veineuse (Turpie et Esmon, 2011).

Les différences physiopathologiques entre thrombose artérielle et thrombose veineuse, présentées ci-dessus, expliquent une prise en charge différente. Schématiquement, les antiplaquettaires sont utilisés pour la thrombose artérielle, tandis que les anticoagulants (héparines, AVK, AOD) sont administrés en prévention de la thrombose veineuse. Enfin, les thrombolytiques permettent la lyse, en urgence, d'un thrombus déjà formé (Mackman, 2008).

2.1 Les antiplaquettaires

Il est aujourd'hui admis que la prévention de la thrombose artérielle s'appuie principalement par la prescription d'antiplaquettaires. Mais ces molécules peuvent également être utilisées pour le traitement aigu de la thrombose artérielle (Mackman, 2008). Les antiplaquettaires actuellement disponibles ont plusieurs cibles pharmacologiques. Certains inhibent l'activation plaquettaire tandis que d'autre ciblent l'agrégation plaquettaire (Turpie et Esmon, 2011). Actuellement, il n'existe pas d'antiplaquettaire interagissant avec l'adhésion endothéliale des thrombocytes. La figure 7 représente les cibles pharmacologiques des antiplaquettaires actuellement commercialisés dans l'Union Européenne.

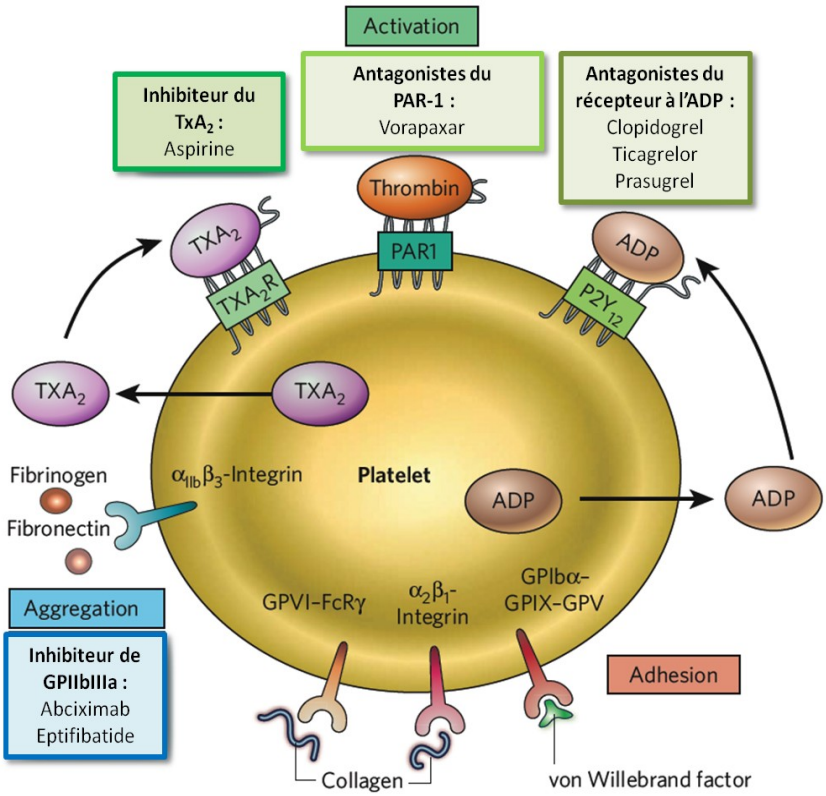


Figure 7 : Cibles des médicaments antiplaquettaires commercialisés dans l'Union Européenne (d'après Mackman, 2008)

2.1.1 Les inhibiteurs de la voie du TxA_2

Le thromboxane A_2 (TxA_2) est une prostaglandine à effet vasodilatateur et est un potentiel activateur plaquettaire. Sa synthèse dans les thrombocytes nécessite la cyclooxygénase-1 (COX-1) plaquettaire. L'acide acétylsalicylique, ou aspirine (KARDEGIC®), est un inhibiteur non sélectif mais irréversible de cyclooxygénase par acétylation de cette dernière. Ceci explique son indication dans la prévention primaire de l'infarctus du myocarde (Mackman, 2008). Dans cette indication, la posologie journalière de l'aspirine (160 mg par jour) est inférieure à la posologie habituellement prescrite pour un traitement à visée antalgique (au maximum 3 g par jour). Les principaux inconvénients à une utilisation prolongée de l'aspirine sont la survenue d'ulcères gastriques et d'hémorragie (Elalamy et Hatmi, 2002).

Si son utilisation dans la prévention de la thrombose artérielle ne fait plus débat, son intérêt dans la thrombose veineuse reste discuté. L'usage d'acide acétylsalicylique réduirait de 40 % le risque relatif de thrombose veineuse et diminuerait significativement la mortalité par embolie pulmonaire. Son intérêt dans cette indication est aujourd'hui toujours discuté, en particulier dans la prévention primaire et secondaire de thrombose veineuse de patients bénéficiant d'un acte de chirurgie orthopédique (Cohen *et al.,* 2015).

Flurbiprofène (CEBUTID®) peut également être prescrit dans les mêmes indications que l'acide acétylsalicylique, puisqu'il inhibe, mais de manière réversible, les cyclooxygénases.

2.1.2 Les antagonistes du récepteur à ADP

Une autre cible de médicaments antiplaquettaires est le récepteur à l'ADP, $P2Y_{12}$. Ce récepteur est responsable de l'amplification de l'activation plaquettaire. Les inhibiteurs de la voie de l'ADP se divisent en deux familles :

- **les thiénopyridines** spécifiques de $P2Y_{12}$: Ticlopidine (TICLID®), Clopidogrel (PLAVIX®) et Prasugrel (EFIENT®)

- **les cyclopentyltriazolopyrimidines** qui inhibent réversiblement le récepteur $P2Y_{12}$: Ticagrelor (BRILIQUE®)

Cette classe pharmacologique est davantage utilisée pour le traitement du syndrome coronaire aigu dont l'étiologie peut être un angor instable (Mackman, 2008). Les principaux effets indésirables de cette classe sont observés pour le Ticagrelor qui, en plus du risque de saignement, expose à des dyspnées et à la bradycardie (Durand *et al.,* 2013).

2.1.3 Inhibiteurs de la phosphodiesterase de la voie de l'AMPc

Dipyridamole (PERSANTINE®) limite la recapture de l'ADP par les plaquettes. L'augmentation de la concentration sanguine en ADP augmente l'activation de l'adénylate cyclase, et donc la formation d'AMPc plaquettaire. L'augmentation de la concentration intraplaquettaire en AMPc relève le seuil d'activation des plaquettes.

Par ailleurs, dipyridamole inhibe faiblement la phosphodiesterase de la voie de l'AMPc ce qui limite la dégradation de cette dernière. L'augmentation de la concentration intraplaquettaire en AMPc inhibe la libération des granules contenant l'ADP. Notons que le mécanisme d'action du dipyridamole est toujours sujet à controverses (Patrono *et al.,* 2011). Son utilisation est limitée au diagnostic et à la localisation d'ischémie myocardique par test d'effort électrocardiographique.

2.1.4 Les inhibiteurs d'intégrine GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)

Cette classe pharmacologique compte trois représentants : l'anticorps monoclonal Abciximab (REOPRO®), Eptifibatide (INTEGRILIN®) qui est un peptide cyclique, et le peptidomimétique Tirofiban (AGRASTAT®). Ces médicaments inhibent l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou GPIIb/IIIa ; autrement dit, ils inhibent l'agrégation plaquettaire *stricto sensu* ce qui empêche la liaison des plaquettes activées à des ligands tels que le fibrinogène (Mackman, 2008).

Ces molécules administrées par voie intra-veineuse sont strictement réservées à des situations d'urgence thérapeutiques telles que la pose d'un *stent,* une angioplastie ou encore le traitement d'un syndrome coronaire aigu. Par ailleurs, l'utilisation de ces molécules expose à un risque de thrombopénie, notamment avec REOPRO®, ainsi qu'à un risque élevé d'hémorragie (Thériaque.org, 2015).

2.2 Traitements anticoagulants

De même que les antiplaquettaires permettent de prévenir la thrombose artérielle, la prophylaxie de la thrombose artérielle requiert des molécules ciblant les protéines impliquées dans la coagulation (Mackman, 2008). Le rôle des anticoagulants est d'inhiber l'action des protéases de la cascade de la coagulation précédemment présentée. Les cibles pharmacologiques des médicaments anticoagulants présentés par la suite, sont détaillées en figure 8.

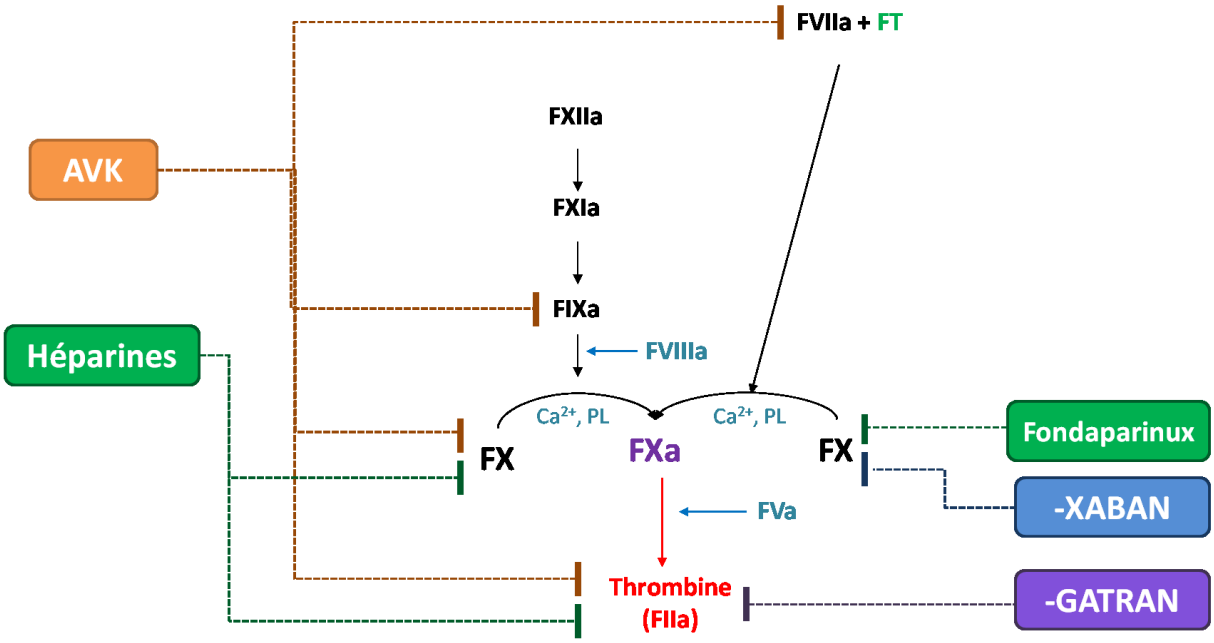


Figure 8 : Cibles pharmacologiques des anticoagulants actuellement commercialisés en France (d'après Mackman, 2008)

2.2.1 Les héparines

C'est en 1916 qu'ont été mises pour la première fois en évidence les propriétés anticoagulantes de cette substance d'origine biologique qu'est l'héparine. Depuis, il a été démontré que l'héparine est un mélange de glycosaminoglycanes se liant à l'antithrombine (AT) *via* un motif pentasaccharidique, ce qui accroit considérablement le pouvoir de cette dernière à se lier à la thrombine ainsi qu'au FXa (Rosenberg et Rosenberg, 1984). La formation de la fibrine est ainsi inhibée, empêchant la formation d'un thrombus, ou au moins son extension. Ainsi, les héparines sont utilisées en prévention et en traitement curatif de la thrombose (Hirsh et Raschke, 2004).

Structuralement, ce sont des polyholosides hétérogènes sulfatés acides. Les chaînes polyholosidiques sont constituées majoritairement de disaccharides trisulfatés : l'acide iduronique lié en 1-4 au glucosamine tel que présenté en figure 9.

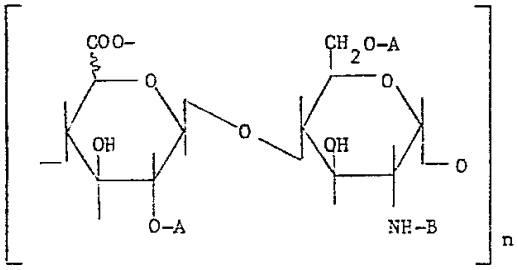


Figure 9 : Schéma de la structure chimique d'une héparine (Naggi et Torri, 1984)
A : H ou SO_3^- ; **B** : SO_3^- ou $COCH_3$

Les héparines inhibent de manière réversible la thrombine et le FXa (figure 8). Les héparines non fractionnées (HNF) ont un effet sur la thrombine et le FXa, les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) en revanche sont plus actives sur le FXa que sur la thrombine du fait de la longueur de leur chaîne polyholosidique.

2.2.1.1 Les héparines standards

Les héparines standards ou non fractionnées (HNF) ont pour indications principales la thromboprophylaxie préalable à une intervention chirurgicale cardiovasculaire ainsi que la prévention de la thrombose veineuse. Les HNF se lient également aux cellules endothéliales et aux plaquettes ce qui explique leurs propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques incertaines. C'est la raison pour laquelle les héparines de bas poids moléculaires ont été développées (Hirsh et Raschke, 2004).

Parmi les HNF actuellement commercialisées, on distingue (Durand *et al.,* 2013):

- l'héparine sodique administrée par voie IV dont le délai d'action est de quelques minutes et la durée d'action de 3 heures,
- la CALCIPARINE® ou héparine calcique, administrée par voie sous-cutanée, dont le délai d'action est d'une à deux heures et la durée d'action de l'ordre de 10 heures.

2.2.1.2 Les héparines de bas poids moléculaire

Les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) possèdent les mêmes indications que les HNF. Cependant, les patients présentent moins d'hémorragies avec les HBPM qu'avec les HNF (Mackman, 2008). Ces dernières présentent des profils pharmacodynamiques et pharmacocinétiques plus prévisibles que les HNF. Elles ont été obtenues par dépolymérisation des chaines des HNF, par voie chimique ou enzymatique.

Les HBPM actuellement sur la marché en France et leur moyen d'obtention sont présentés dans le tableau II :

Tableau II : Méthodes d'obtention des HBPM commercialisées en France (Hirsh et Raschke, 2004)

MEDICAMENT	METHODE DE PREPARATION
Nadroparine (FRAXIPARINE)	Dépolymérisation dans l'acide nitrique
Enoxaparine (LOVENOX)	Benzylation suivie d'une dépolymérisation alcaline
Dalteparine (FRAGMINE)	Dépolymérisation dans l'acide nitrique
Tinzaparine (INNOHEP)	Dépolymérisation par heparanase
Danaparoide (ORGARAN)	Procédé enzymatique depuis la muqueuse intestinale animale

Avec le développement des HBPM dans les années 1980, il a été mis en évidence l'importance de la taille de la chaine osidique dans l'inhibition de la thrombine et celle de la présence de la séquence pentasaccharidique pour l'inhibition du FXa (Hirsh et Raschke, 2004).

Les avantages des HBPM par rapport aux HNF sont :

- une administration possible par voie sous-cutanée, une seule fois par jour sans contrôle biologique,
- une efficacité équivalente aux HNF et une sécurité à l'administration au moins équivalente, au regard des essais cliniques (Hirsh et Raschke, 2004)

En revanche, il est admis que les HNF sont préférables aux HBPM pour les patients présentant une insuffisance rénale, du fait de leur voie d'élimination.

2.2.1.3 Les inhibiteurs sélectifs du FXa

Des molécules récentes telles que Fondaparinux (ARIXTRA®, figure 10) ou Idraparinux (non commercialisé à ce jour) sont des pentasaccharides de synthèse dont la structure a été conçue d'après celle du site de liaison de l'héparine à l'antithrombine (Turpie *et al.,* 2003), c'est-à-dire une séquence pentasaccharidique dans laquelle une unité glutamine se lie seule à l'AT (Rosenberg et Rosenberg, 1984). Ces molécules ciblent le FXa, mais ne sont pas capables de cibler la thrombine en raison de leur relative petite taille empêchant de stabiliser l'interaction entre la thrombine et l'antithrombine.

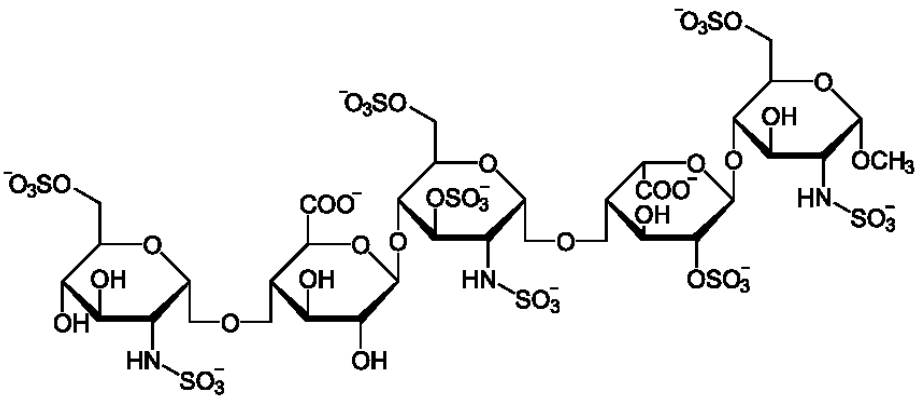


Figure 10 : Structure de Fondaparinux

Fondaparinux possède des indications dans la prévention et le traitement de la thrombose veineuse et de l'embolie pulmonaire. Cette molécule est également indiquée pour les patients présentant un syndrome coronarien aigu (Hirsh et Raschke, 2004 ; Durand *et al.,* 2013). Les propriétés pharmacocinétiques de Fondaparinux, bien que peu connues à ce jour, autorisent une seule administration par jour par voie sous-cutanée (Cegarra-Sanmartín *et al.,* 2014).

2.2.1.4 Avantages et inconvénients des héparinothérapies

En plus d'un risque hémorragique accru, lors de l'instauration d'une héparinothérapie, un suivi de la numération plaquettaire est nécessaire afin de s'assurer que le patient ne présente pas de thrombopénie induite par héparine (TIH). La TIH est rare mais grave. Il s'agit d'une réaction immunitaire aboutissant à la formation d'anticorps spécifiques du complexe héparine-facteur 4 plaquettaire. Elle survient pour 3 % des patients en chirurgie et 1 % en milieu médical lors de l'administration d'un traitement par héparine non fractionnée (HNF). Sa fréquence est inférieure à 1 % avec les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) (Moty-Monnereau *et al.,* 2005). La TIH est très rarement observée lors de l'administration de l'un des pentasaccharides de synthèse présentés ci-dessus (Hirsh et Raschke, 2004).

Notons l'existence d'un antidote si la prise d'héparine s'accompagne de la survenue d'hémorragie. Il s'agit du sulfate de protamine, un peptide basique qui forme des complexes ioniques avec les héparines qui perdent alors leur activité anticoagulante. Il est administré par voie intraveineuse, en bolus. Toutefois, cet antidote semble bien moins efficace avec Fondaparinux qu'avec les HBPM et surtout les HNF. En effet, la protamine restaure principalement l'activité catalytique de la thrombine (Hirsh et Raschke, 2004). Enfin, ces

médicaments n'existent que sous la forme d'une administration par voie parentérale et non par voie orale.

2.2.2 Les antagonistes de la vitamine K

Ces médicaments sont généralement prescrits comme traitement anticoagulant au long cours, contrairement aux héparines. Commercialisés depuis près de cinquante ans, ils ont longtemps été les seuls anticoagulants administrés *per os*.

La vitamine K intervient dans la synthèse de plusieurs facteurs de la coagulation : la thrombine, le FVII, le FIX et le FX, ainsi que dans la synthèse de deux inhibiteurs de la coagulation : la protéine C et la protéine S.

Lors de leur synthèse au niveau hépatique, ces facteurs subissent une γ-carboxylation. Cette γ-carboxylation est permise par une enzyme, la γ-glutamylcarboxylase. La vitamine K, sous forme réduite, est un cofacteur de cette enzyme. Lorsque la carboxylation a eu lieu, la vitamine K se trouve sous forme oxydée. Elle est régénérée par l'epoxyde reductase qui est l'enzyme cible des AVK. Les AVK ont une analogie de structure avec la vitamine K. Les AVK empêchent donc la réaction de réduction catalysée par l'epoxyde reductase, et donc la régénération de la vitamine K, essentielle à l'activation de certains facteurs de la coagulation (FII, FVII, FIX, FX, PC et PS).

Les AVK n'ont pas d'action sur les facteurs de la coagulation déjà formés. Chaque facteur ayant une demi-vie différente, il est admis que le délai d'action des AVK est de l'ordre de 60 heures, c'est-à-dire la plus longue de ces demi-vies, celle de la prothrombine. Ceci explique que ces médicaments ne sont jamais administrés comme traitements d'urgence, les héparines étant alors privilégiées (Boneu et Cazenave, 1982).

Les AVK sont classées en deux familles telles que présentées dans le tableau III. Warfarine est considéré comme l'AVK le plus prescrit dans le monde (Broussalis *et al.,* 2014).

Tableau III : Propriétés des AVK (d'après thériaque.org, 2015)

FAMILLE	DCI	NOM DE SPECIALITE	INDICATIONS	DATE D'AMM
4 -hydroxycoumariniques	Acénocoumarol	SINTROM®	TVP, IDM, EP, prévention de la thrombose en relai de l'héparine	01/03/1995
	Warfarine	COUMADINE®		15/01/1960
Dérivés de l'indanedione	Fluindione	PREVISCAN®		01/01/1995

Les principales contre-indications à la prise d'AVK sont :

- la présence de lésions risquant de saigner
- une insuffisance hépatocellulaire car ces médicaments sont métabolisés par le foie
- le 1er ou le 3e trimestre d'une grossesse
- la co-administration d'inhibiteurs (ISRS, azolés, macrolides,…) ou d'inducteurs enzymatiques (*Hypericum perforatum*, carbamazépine, phénytoïne, …)

L'administration d'AVK intervient en relai d'une héparinothérapie, deux à sept jours après l'initiation de celle-ci. Les AVK à demi-vie longue seront privilégiées (Fluindione,

Warfarine) avec la prise d'un comprimé par jour, le soir. La posologie sera ensuite ajustée en fonction des résultats d'INR par quart de comprimé jusqu'à stabilisation de l'INR dans l'intervalle thérapeutique [2 ; 3]. L'INR est déterminé toutes les 48 heures jusqu'à ce que deux INR successifs soient compris dans l'intervalle thérapeutique. Une fois l'INR stabilisé, il ne sera contrôlé que tous les mois (ANSM, 2012).

Dans le cas d'une urgence de type chirurgicale, KANOKAD® pourra être administré en IV aux patients traités par AVK. Il s'agit d'un complexe des facteurs et inhibiteurs de la coagulation affectés par les AVK : FII, FVII, FIX, FX, protéine C et protéine S.

Le 10 Janvier 2013 voit la publication de l'avenant n° 1 à la convention nationale pharmaceutique en France. Cet avenant concerne les modalités de mise en œuvre des entretiens patient-pharmacien concernant le suivi de traitements par inhibiteurs de vitamines K (AVK). La nécessité de la mise en place de tels entretiens reflète les inconvénients inhérents à la prise de ces médicaments antithrombotiques ainsi que la nécessité d'un suivi clinico-biologique et une observance rigoureuse. L'éducation thérapeutique proposée au patient est primordiale (Ameli, 2013).

2.2.3 Les inhibiteurs directs du facteur Xa et de la thrombine

Les nouveaux anticoagulants oraux, aujourd'hui nommés anticoagulants oraux directs (AOD), sont arrivés récemment sur le marché français et international. Ils ont été développés en réponse aux inconvénients que présentaient les anticoagulants alors disponibles.

Les AOD sont de deux catégories :

- les inhibiteurs directs du facteur X, dont la DCI se termine par –XABAN (Rivaroxaban, Apixaban),
- les inhibiteurs directs de la thrombine, dont la DCI se termine par –GATRAN (Dabigatran).

Ces médicaments sont administrés *per os*. Le premier AOD à avoir été mis sur le marché est Melagatran dont la première indication était en chirurgie orthopédique pour la prévention de la thrombose veineuse. Les propriétés de ces médicaments sont présentées dans le tableau IV (Weitz et Linkins, 2007).

Tableau IV : Propriétés des AOD (Weitz et Linkins, 2007 ; Broussalis *et al.*, 2014)

FAMILLE	DCI	NOM DE SPECIALITE	INDICATIONS	DEMI-VIE	DATE D'AMM
-GATRAN	Dabigatran étéxilate	PRADAXA®	Prévention de la thrombose veineuse en chirurgie orthopédique - traitement curatif et préventif de la TVP – fibrillation atriale – traitement préventif et curatif de l'EP	11-14 h	12/12/2008
	Ximélagatran	-	Prévention de la thrombose veineuse en chirurgie orthopédique	-	Retiré du marché
-XABAN	Rivaroxaban	XARELTO®	Prévention de la thrombose veineuse en chirurgie orthopédique	7 – 11 h	07/05/2009
	Apixaban	ELIQUIS®	Prévention de la thrombose veineuse en chirurgie orthopédique - traitement curatif et préventif de la TVP – fibrillation atriale– traitement préventif et curatif de l'EP	11,5 h	15/07/2012

PRADAXA® est une prodrogue et présente une mauvaise biodisponibilité. Son métabolisme est hépatique, son élimination majoritairement rénale, ce qui fait de l'insuffisance rénale une contre-indication à son utilisation. Pour chacune de ses indications, il existe une posologie unique sans besoin d'adaptation de la dose selon des examens de biologie médicale. Les principaux effets indésirables constatés sont des dyspepsies, une hépatotoxicité et un risque hémorragique. Par ailleurs, il existe de nombreuses interactions avec les médicaments inhibiteurs (azolés, quinidine,…) et inducteurs (rifampicine, *Hypericum perforatum*,…) de la glycoprotéine P (P-gp) (thériaque.org, 2015).

Les **–XABAN** présentés dans le tableau IV ne sont pas des prodrogues et sont directement actifs *per os*. Ils présentent une bonne biodisponibilité. Ils sont métabolisés par le CYP3A4 hépatique et éliminés par voies rénale et biliaire. Les effets indésirables observés sont les mêmes que ceux des –GATRAN. Du fait de leur métabolisme hépatique, les principales interactions médicamenteuses des –XABAN sont rencontrées avec les AVK, les azolés, la rifampicine, la phénytoïne ou encore la carbamazépine (Durand *et al.,* 2013).

Le principal avantage de ces molécules est la posologie unique dans une indication donnée, sans suivi biologique ni adaptation posologique, sauf en cas d'insuffisance rénale. L'inconvénient majeur des AOD est l'absence d'antidote, ce qui pose problème notamment lorsque qu'une intervention chirurgicale doit être pratiquée en urgence chez un patient. Il existe actuellement une « course » à la découverte d'un antidote aux AOD.

2.4 Les thrombolytiques

Les thrombolytiques sont des médicaments utilisés en urgence pour lyser un caillot déjà formé. Ces molécules sont réservées à un usage hospitalier.

La fibrinolyse est un phénomène physiologique déclenché au cours de l'hémostase et qui permet d'éviter l'extension du caillot. La plasmine est l'enzyme clé de ce phénomène puisqu'elle permet la dégradation de la fibrine. Physiologiquement, la plasmine peut-être activée par l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) qui est formé par les cellules endothéliales, ou par la pro-urokinase (u-PA). Les traitements thrombolytiques actuellement

sur le marché ciblent tous le plasminogène. Il s'agit de formes naturelles ou recombinantes du t-PA ou u-PA (Mackman, 2008).

Ces médicaments sont classés en trois générations :

- **Première génération :** la Streptokinase (STREPTASE®) obtenue à partir d'un Streptocoque β-hémolytique. Son administration pose des problèmes d'immunogénicité. L'urokinase humaine (ACTOSOLV®) est également un thrombolytique de première génération.

- **Deuxième génération :** le principal représentant est Altéplase (ACTILYSE®). Il s'agit de t-PA recombinant ou rt-PA. Il est indiqué en phase aigue d'IDM ou d'EP, lorsque le pronostic vital est engagé. Lors de la prise de ce médicament, le risque hémorragique est très important et il existe de très nombreuses contre-indications à son utilisation.

- **Troisième génération :** l'objectif thérapeutique de ces molécules est d'améliorer la structure de l'Altéplase pour le rendre plus spécifique de sa cible, augmenter sa durée d'action et réduire le risque hémorragique lors de son administration. Parmi les médicaments sur le marché, citons Ténectéplase (METALYSE®) et Rétéplase (RAPILYSIN®). Il est également plus résistant au PAI-1, un inhibiteur physiologique du t-PA.

L'efficacité et l'intérêt à l'administration de ces molécules dépend principalement du délai de prise en charge du patient. Par exemple, pour la prise en charge d'un infarctus du myocarde, l'utilisation de thrombolytique semble bénéfique dans un délai de 3 à 4 heures après l'apparition des symptômes. Toutefois, il existe un risque d'hémorragie cérébrale à leur administration (Mackman, 2008 ; Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

DEUXIEME PARTIE

CIBLES ET PROFIL DE L'ANTITHROMBOTIQUE IDEAL

"La complexité du vivant
est le reflet de celle des molécules
qui en assurent le fonctionnement
et du jeu des reconnaissances
auxquelles elles donnent lieu"

Pr. Jean-Jacques TOULME
INSERM U. 386, UNIVERSITE VICTOR-SEGALEN, BORDEAUX 2

1- PORTRAIT DE L'ANTITHROMBOTIQUE « IDEAL »

1.1 Caractéristiques

La nécessité de développer de nouveaux médicaments antithrombotiques se justifie par les inconvénients que présentent les médicaments antithrombotiques actuellement commercialisés (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012). Pour la première partie de ce manuscrit, nous nous sommes employés à décrire les molécules antithrombotiques actuellement commercialisées ainsi que les avantages et inconvénients liés à leur utilisation.

Il n'existe pas un antithrombotique idéal dans la mesure où il existe différents types de pathologies thrombotiques. Il est nécessaire de développer des molécules antithrombotiques pour le traitement de la thrombose veineuse, typiquement des anticoagulants ; pour le traitement de la thrombose artérielle à l'aide d'antiplaquettaires ; pour la lyse d'un thrombus déjà formé *via* les thrombolytiques. Toutefois, une revue de la littérature scientifique publiée sur ce sujet permet d'esquisser le portrait du médicament antithrombotique idéal. Ce dernier devrait présenter les caractéristiques détaillées dans le tableau V (Hirsh, 2003 ; Hirsh, 2005 ; Dyke *et al.,* 2006 ; Samama et Gerotziafas, 2007 ; Mackman, 2008 ; Furie et Furie, 2008 ; Weitz, Eikelboom et Samama, 2012 ; Bultas, 2013) :

Tableau V : Caractéristiques de l'antithrombotique idéal

Efficacité	Pharmacocinétique/ Pharmacodynamie	Sécurité	Praticité
- rapport bénéfice/risque élevé - peu ou pas de variations interindividuelles dans la réponse au traitement	- une action rapide - une action spécifique du site vasculaire concerné par la thrombose ou le risque thrombotique - une demi-vie courte pour les thrombolytioques, afin de limiter le risque hémorragique - un profil dose-réponse prévisible, facilitant le choix de posologie et ne nécessitant pas d'examen hématologique	- n'augmente pas le risque hémorragique - maintenir une hémostase physiologique pour le reste du système vasculaire - un antidote est disponible - peu d'interactions avec d'autres médicaments qui pourraient être co-administrés, ainsi qu'avec les aliments	- administration parentérale ou *per os* - un index thérapeutique large, ce qui éviterait un suivi biologique régulier - en cas de nécessité, un suivi biologique aisé - un coût acceptable

De bons espoirs ont été fondés avec l'apparition des AOD (Mackman, 2008), ce que confirmaient Weitz *et al.* en 2012. Rivaroxaban a obtenu une AMM en France en janvier 2010. Toutefois, ces derniers ne permettent pas de satisfaire toutes les caractéristiques de l'antithrombotique idéal (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

Les nouvelles molécules antithrombotiques en cours de développement doivent présenter une action rapide, tout comme les AOD. Cette propriété serait particulièrement favorable pour les patients présentant un syndrome coronaire aigu, nécessitant l'instauration rapide d'un traitement antithrombotique. De même, cette action doit être limitée dans le temps. C'est le cas des AOD qui sont des inhibiteurs réversibles de la thrombine ou du FX

(Weitz et Linkins, 2007 ; Weitz, Eikelboom et Samama, 2012). En outre, les nouvelles molécules anticoagulantes devraient pouvoir être co-administrées avec des thrombolytiques ou des antiplaquettaires, de façon sûre et efficace chez les patients présentant un syndrome coronaire aigu (Hirsh, 2003).

Enfin, au cours du développement d'une molécule antithrombotique, un index thérapeutique large permettra de distinguer nettement la dose efficace de la dose à partir de laquelle surviennent des hémorragies ou d'autres effets indésirables (Mackman, 2008).

L'annexe 1 synthétise l'ensemble des molécules antithrombotiques actuellement sur le marché et en cours de développement qui seront présentées par la suite, selon qu'elles satisfont ou non les caractéristiques citées ci-dessus. Nous conseillons au lecteur de conserver le suspense et de ne se rapporter à ladite annexe qu'après lecture de la troisième partie du présent manuscrit.

1.2 Identifier une cible pharmacologique

Les étiologies possibles de la thrombose sont très variées. La recherche et le développement de nouveaux antithrombotiques ne s'apparentent donc pas à la recherche de la Thériaque de Galien. Chaque antithrombotique est développé pour une indication précise. En revanche, la thrombose veineuse, et dans une certaine mesure la thrombose artérielle, s'expliquent grâce à la triade de Virchow (Leadley Jr. *et al.,* 2000).

Des similitudes sont observées entre les phénomènes hémostatiques physiologiques de certains animaux, en particulier les mammifères, et ceux observés chez l'Homme. S'agissant de la coagulation, les mammifères présentent également une cascade d'enzymes de type sérine protéases, semblables aux facteurs humains de la coagulation. Aussi, l'utilisation de mammifères comme modèles animaux pour le développement préclinique d'une molécule antithrombotique parait pertinente (Leadley Jr. *et al.*, 2000 ; Hirsh, 2003).

Des modèles animaux de thrombose ont été développés, notamment avec de petits rongeurs tels que le rat ou la souris. Il peut notamment s'agir de modèles génétiques dont le gène codant pour une cible pharmacologique a été réprimé. Ces modèles permettent d'évaluer à l'échelle d'un organisme entier, l'effet de l'inhibition d'une potentielle cible pharmacologique (Leadley Jr. *et al.,* 2000). L'annexe 2 présente les résultats obtenus avec des modèles animaux dont certains gènes codant pour des facteurs de la coagulation sont réprimés, notamment en termes de viabilité.

Ces modèles permettent, lors des études précliniques, d'obtenir des informations relatives aux doses toxiques et aux doses efficaces, ainsi qu'à la sécurité d'utilisation de la molécule en développement. Ils permettent également de mettre en évidence le mécanisme d'action et l'efficacité d'une cible pharmacologique. Bien sûr, les résultats de ces études doivent être nuancés par la spécificité d'espèce. De nombreuses voies métaboliques sont spécifiques d'une espèce donnée, ce qui rend difficile la transposition complète de certains résultats à l'Homme (Leadley Jr. *et al.,* 2000).

La figure 11 présente les différentes étapes de sélection d'une molécule antithrombotique spécifique d'une cible donnée.

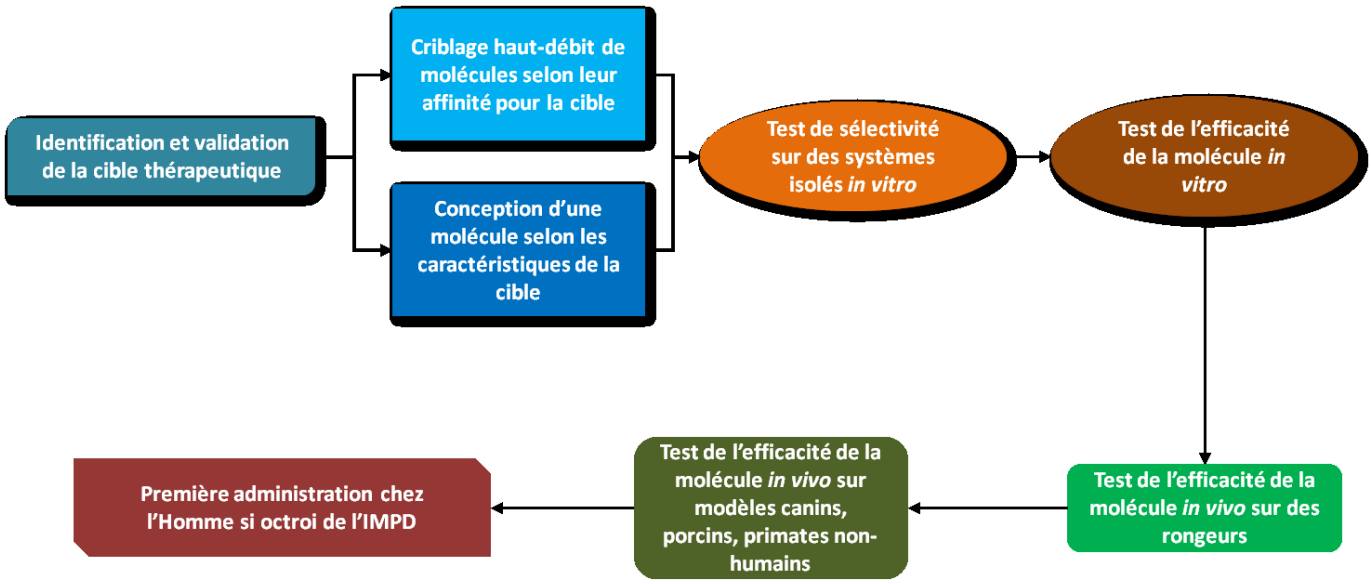


Figure 11 : Phases précliniques de sélection d'un candidat médicament (d'après Leadley Jr. *et al.,* 2000)
IMPD : *Investigational Medicinal Product Dossier*

Les patients présentant certaines anomalies hémostatiques telles que l'hémophilie, permettent d'émettre des hypothèses quant à la pertinence d'une cible antithrombotique. Par exemple, un déficit constitutif en FXI (anciennement appelé hémophilie C) se traduit cliniquement par un risque hémorragique accru par rapport à un personne saine. Généralement, ces patients présentent des manifestations cliniques moins sévères que l'hémophilie A ou B. Ainsi, une molécule antithrombotique qui ciblerait le FXI pourrait induire un risque hémorragique moindre que si celle-ci ciblait les facteurs VIII ou IX (Leadley Jr. *et al.,* 2000).

De même, l'étude de patients présentant différentes formes de maladies de Willebrand permet d'évaluer la pertinence de cibles pharmacologiques antithrombotiques (Leadley Jr. *et al.,* 2000).

2. CIBLES ANTITHROMBOTIQUES POTENTIELLES

Certains auteurs considèrent les traitements antiplaquettaires comme la clé de voûte de la prévention secondaire de la thrombose artérielle (AVC, IDM,…). Toutefois, les médicaments actuellement sur le marché ne permettent de diminuer que de 25 % ce risque de thrombose artérielle, comparativement à un placebo. Le développement de nouveaux antiplaquettaires au rapport bénéfice/risque amélioré est donc toujours nécessaire à ce jour (Lee et Ovbiagele, 2011).

De manière générale, le développement de nouveaux antithrombotiques s'est accentué pour les antiplaquettaires et les anticoagulants, et assez peu pour de nouveaux thrombolytiques (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

Dans la suite de ce manuscrit, il sera traité de la pertinence de différentes cibles pharmacologiques antithrombotiques pour lesquelles il existe actuellement des molécules qui font l'objet d'essais cliniques.

2.1 L'hémostase primaire

2.1.1 Généralités

Les plaquettes présentent différentes voies d'activation. C'est la raison pour laquelle des événements thrombotiques artériels graves peuvent survenir, y compris chez des patients traités par antiplaquettaires, lorsqu'il y a échappement au traitement. En effet, ces derniers n'inhibent en général qu'une seule des multiples voies d'activation des plaquettes. Aussi, certains auteurs s'interrogent sur l'intérêt de l'association de thérapies antiplaquettaires entre elles, voire de l'association avec d'autres médicaments antithrombotiques (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

Les antiplaquettaires bénéficiant actuellement d'une autorisation de mise sur le marché ciblent l'agrégation et l'activation plaquettaire, par l'intermédiaire du récepteur GPIIb/IIIa ou encore *via* la voie de l'ADP. Il n'existe pas, aujourd'hui, d'antiplaquettaire commercialisé qui cible l'adhésion plaquettaire (Vanhoorelbeke *et al.,* 2003 ; Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

En conditions physiologiques, les thrombocytes circulant dans les vaisseaux sanguins n'interagissent pas avec l'endothélium vasculaire sain. En revanche, lorsque cet endothélium est lésé, des substances sous-endothéliales sont mises au contact des plaquettes, ce qui provoque leur adhésion. Parmi ces substances, citons les collagènes, l'élastine, des protéoglycanes, la fibronectine, la thrombospondine, la laminine. Quant au vWF, il est synthétisé notamment au niveau de l'endothélium vasculaire.

L'adhésion des plaquettes est à l'origine de leur agrégation et de leur activation, donc de leur rôle thrombogène. L'inhibition de cette étape précoce de l'hémostase primaire, notamment dans un contexte artériel prothrombotique (athérosclérose, angor instable, IDM,…) permettrait de limiter le risque thrombotique. De fait, s'intéresser à cette étape de l'hémostase primaire semble présenter plusieurs avantages (Vanhoorelbeke *et al.,* 2003) :

- Cibler l'interaction GPIb/vWF/collagène permet d'obtenir une action antithrombotique relativement spécifique des artères dans la mesure où cette interaction n'existe que dans un contexte de forces de cisaillement importantes. De fait, le retentissement veineux serait moindre ce qui pourrait exposer à un moindre risque hémorragique.

- L'interaction GPIb/vWF/collagène se situant en amont des phénomènes hémostatiques, les inhibiteurs de cette interaction auront potentiellement un fort effet antithrombotique.

- Pour des patients présentant de l'athérosclérose, l'inhibition de l'adhésion plaquettaire empêche leur activation, et donc la libération de PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), ce qui permettrait à long terme de diminuer des lésions athérosclérotiques ou encore de limiter la re-sténose.

2.1.2 Adhésion plaquettaire

Il n'existe pas, à ce jour, de molécule thérapeutique ciblant la liaison des plaquettes au collagène sous-endothélial et au vWF. Il est émis l'hypothèse que l'inhibition d'une étape en amont de l'hémostase primaire telle que l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium vasculaire empêcherait à celles-ci d'exercer leur rôle en situation physiologique. Aussi, l'inhibition de l'adhésion plaquettaire exposerait à un risque hémorragique important (Mackman, 2008).

2.1.2.1 Le facteur von Willebrand

Mis en évidence par un médecin finlandais qui lui donna son nom, le **facteur von Willebrand (vWF)** est de composition biochimique hétérogène et de structure multimérique (figure 12). Il s'agit d'une glycoprotéine d'environ 20.10^6 Da. Sa synthèse est assurée par l'endothélium vasculaire et les mégacaryocytes, les cellules précurseurs des plaquettes. Ses domaines de liaisons sont présentés en figure 12. Le vWF est présent dans le plasma, dans les plaquettes, au niveau de leurs granules alpha, ainsi qu'au niveau de l'endothélium vasculaire, stocké dans les corps de Weibel-Palade. Il circule lié au FVIII dans le plasma, le protégeant ainsi de la protéolyse. L'abaissement du taux plasmatique de vWF s'accompagne d'une diminution du taux de FVIII ce qui se traduit par l'accroissement du risque hémorragique. De plus, c'est le domaine A1 du vWF qui se lie au GPIb plaquettaire (Vanhoorelbeke *et al*., 2003 ; Kleinschnitz *et al.*, 2009). Les domaines A1 et A3 se lient au collagène sous-endothélial (Yeung et Holinstat, 2012).

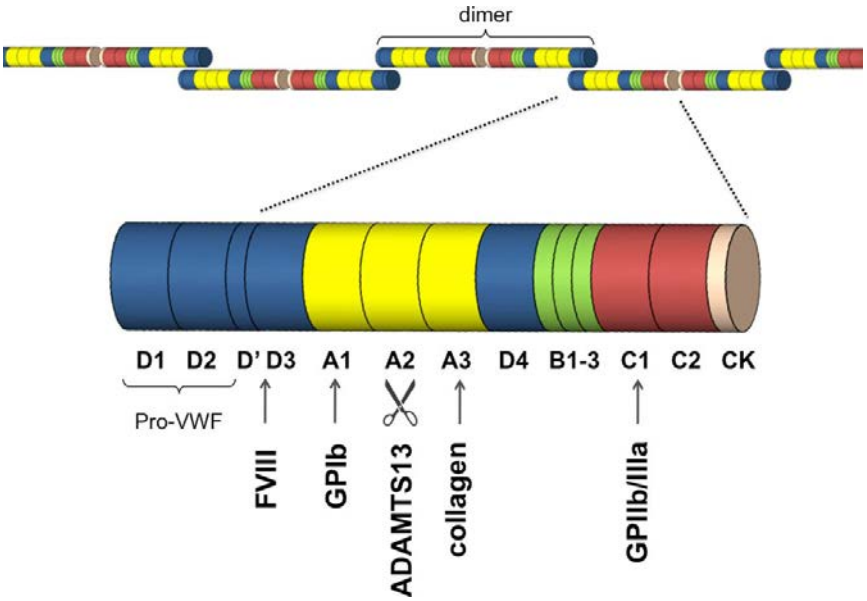


Figure 12: Structure du facteur Von Willebrand et de ses sites de liaison (De Meyer *et al.,* 2012)

L'implication du vWF dans les phénomènes hémostatiques est évidente si l'on considère les patients atteints de la maladie de Willebrand. Il s'agit de l'une des pathologies hémorragiques constitutionnelles les plus fréquentes, avec une prévalence de 1 % dans la population mondiale. Biologiquement, les maladies de Willebrand induisent notamment un temps de saignement allongé. Cliniquement, la pathologie se traduit par des symptômes hémorragiques de type cutanéomuqueux, épistaxis, ménorragies, ecchymoses, hémorragies gastro-intestinales et post-opératoires (Vanhoorelbeke *et al.*, 2003 ; Mackman, 2008).

Des études chez la souris ont montré que l'absence de vWF avait un effet protecteur contre les AVC sans pour autant augmenter le risque d'hémorragies cérébrales alors qu'il y a augmentation du temps de saignement (Kleinschnitz *et al.,* 2009). Par ailleurs, d'autres études pré-cliniques sur différents modèles animaux ont montré qu'inhiber l'interaction vWF-collagène n'avait que peu d'influence sur les temps de coagulation (TC+A, TQ), à des doses où un effet antithrombotique était observé. Ces résultats sont de bon augure pour le développement de molécules antithrombotiques ciblant cette interaction (Vanhoorelbeke *et al.,* 2003 ; Kleinschnitz *et al.,* 2009).

Antagoniser le vWF permettrait donc d'améliorer le rapport bénéfice/risque, comparativement aux drogues actuellement sur le marché et qui ciblent la GPIIb/IIIa. Une telle cible pharmacologique trouverait son intérêt dans la thromboprophylaxie de patients présentant un syndrome coronaire aigu ou bénéficiant d'une intervention coronarienne percutanée (Vanhoorelbeke *et al.,* 2003). En effet, le vWF est activé par des forces de cisaillement importantes, *a fortiori* au niveau de la circulation artérielle. Ainsi, les antagonistes du vWF agiraient spécifiquement au niveau artériel, et non de manière systémique. Ils permettraient d'éviter certains des effets indésirables fréquemment associés aux traitements antiplaquettaires tels que des saignements cutanéo-muqueux (Gilbert *et al.,* 2007 ; Li *et al.,* 2014a).

De plus, le vWF intervient à différentes étapes de l'hémostase primaire. Il intervient au niveau de l'interaction entre le récepteur GPIb thrombocytaire et l'endothélium vasculaire lésé. Il intervient également au niveau de l'agrégation plaquettaire. Lorsque ces dernières sont activées, le vWF sert de « ciment » entre les plaquettes *via* GPIIb/IIIa (Firbas, Siller-Matula et Jilma, 2010). Les antagonistes du vWF impacteraient donc différentes étapes de l'hémostase, les rendant d'autant plus efficaces (Gilbert *et al.,* 2007).

Enfin, notons que le rôle du vWF dans l'adhésion plaquettaire est unique et indépendant des mécanismes d'activation plaquettaire, impliquant notamment le récepteur $P2Y_{12}$. Ainsi, l'effet d'une molécule antagoniste du vWF pourrait se cumuler à celui d'un médicament antagoniste du $P2Y_{12}$ tel que Clopidogrel (Gilbert *et al.,* 2007).

L'antiplaquettaire idéal devrait permettre d'inhiber la formation du thrombus sans pour autant augmenter le risque hémorragique. Les données précliniques tendent à montrer que cibler les interactions vWF/collagène ou vWF/GPIb affecte peu le temps de saignement. Les études pré-cliniques *in vivo* comparant l'inhibition de l'interaction GPIb/vWF à l'inhibition du GPIIb/IIIa montrent une plus grande fenêtre thérapeutique pour la première des deux cibles avec un moindre risque hémorragique (Vanhoorelbeke *et al.,* 2003). En effet, des essais ont été réalisés chez des souris déficientes tantôt pour le gène codant pour la GPIb, tantôt pour le GPIIb/IIIa. Dans le premier cas, la croissance du thrombus est stoppée et le risque hémorragique n'augmente pas. Dans le deuxième cas, l'inhibition de la formation du thrombus est observée tandis que le risque hémorragique est accru (Firbas, Siller-Matula et Jilma, 2010).

2.1.2.2 Le complexe GPIb plaquettaire

Le **récepteur plaquettaire GPIb**, ou glycoprotéine Ib/V/IX est un complexe composé de 4 polypeptides : GPIbα (135 kDa), GPIbβ (25 kDa), GPIX (22 kDa) et GPV (82 kDa), synthétisés par les plaquettes et les mégacaryocytes. Il a été mis en évidence que le complexe glycoprotéinique Ib/V/IX joue un rôle fondamental dans les premières étapes de l'adhésion plaquettaire, notamment lorsqu'il existe d'importantes forces de cisaillement. Le rôle de la glycoprotéine V reste peu connu à ce jour (Vanhoorelbeke *et al.,* 2003).

La première étape de liaison des plaquettes à l'endothélium lésé se fait par l'interaction du vWF avec la sous-unité GPIbα du récepteur GPIb plaquettaire. La liaison des plaquettes à l'endothélium lésé *via* le récepteur GPIb n'a lieu qu'en présence d'intenses forces de cisaillement dans le vaisseau sanguin (Li *et al.,* 2015), c'est-à-dire supérieures à 500 s^{-1} (Jing et Zhang, 2013). A titre de comparaison, une force de cisaillement de l'ordre de 250 s^{-1} est généralement observée dans les artères chez l'Homme (figure 13 ; Papaioannou et Stefanadis, 2005).

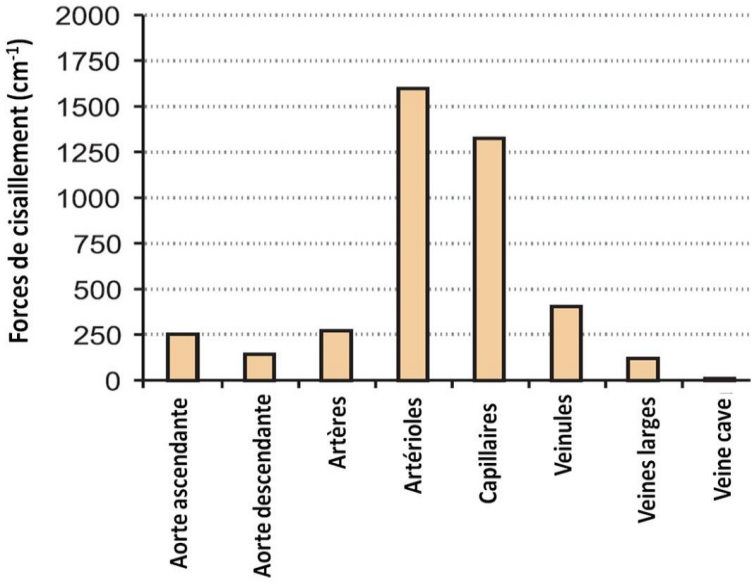


Figure 13 : Valeurs de forces de cisaillements dans différents types de vaisseaux sanguins (Papaioannou et Stefanadis, 2005)

La liaison du vWF au GPIb s'accompagne de l'émission de microparticules dérivant des thrombocytes dont le rôle prothrombotique est aujourd'hui connu (Firbas, Siller-Matula et Jilma, 2010).

L'importance du récepteur GPIb dans l'hémostase primaire est mise en évidence avec le syndrome de Bernard-Soulier. Décrite pour la première fois en 1948 par deux médecins français, cette pathologie autosomale récessive se caractérise cliniquement par une augmentation du temps de saignement, une thrombopénie, des plaquettes anormalement grandes et un temps de lyse du caillot normal. Les patients atteints de cette thrombopathie présentent également des épistaxis, des gingivorragies, des saignements cutanéomuqueux ainsi que des hémorragies à l'occasion d'un traumatisme. Cette pathologie grave s'explique par l'expression d'une glycoprotéine du complexe GPIb défectueuse, ou par un déficit de l'expression de celle-ci (Berndt, Fournier et Castaldi, 1989).

2.1.2.3 La GPVI et le collagène sous-endothélial

La liaison entre un thrombocyte et l'endothélium vasculaire lésé, *via* le vWF et le GPIb n'est pas stable dans le temps. Aussi, après cette première adhésion, une seconde est nécessaire, mettant en jeu le collagène sous-endothélial exposé à la circulation sanguine, la glycoprotéine thrombocytaire GPVI et/ou l'intégrine $\alpha_1\beta_2$, ou encore le GPIIb/IIIa et le fibrinogène. Ainsi, le thrombocyte se lie fortement à l'endothélium lésé, tel que présenté en figure 2 (Mangin *et al.*, 2012 ; Zahid *et al.*, 2012 ; Versteeg *et al.,* 2013 ; Jiang et Jandrot-Perrus, 2014).

La GPVI est un récepteur au collagène de 56 kDa qui est exprimé à la surface des thrombocytes. Ce récepteur joue donc un rôle primordial dans l'agrégation plaquettaire induite par l'exposition du collagène sous-endothélial. Le collagène est le composant matriciel le plus thrombogène. Au niveau de l'endothélium, les types II, III et IV sont majoritaires.

Ainsi, le récepteur GPVI est impliqué dans la formation d'un thrombus artériel, par agrégation et activation des plaquettes. Il est également responsable de la progression de l'athérosclérose par l'interaction chronique des plaquettes avec le sous-endothélium vasculaire. L'inhibition du récepteur GPVI chez des souris ApoE -/- par un anticorps anti-GPVI a permis une diminution de l'athérosclérose chez celles-ci (Mangin *et al.*, 2012 ; Ungerer *et al.,* 2013).

Ces éléments contribuent à faire de la glycoprotéine VI plaquettaire une cible particulièrement pertinente pour le développement d'inhibiteurs de l'activation plaquettaire. En effet, cette voie d'activation des plaquettes n'est utilisée que lorsqu'il existe une lésion vasculaire exposant le collagène sous-endothélial à la circulation sanguine. Autrement dit, inhiber la GPVI ne devrait pas accroitre le risque hémorragique dans la mesure où cette inhibition n'est effective qu'en présence d'une lésion vasculaire. Par ailleurs, les plaquettes peuvent être activées *via* d'autres voies précédemment citées (Jiang et Jandrot-Perrus, 2014).

2.1.3 L'activation plaquettaire

Cette étape est en aval des phénomènes impliqués dans l'hémostase primaire. L'inhibition de l'activation thrombocytaire à visée antithrombotique devrait donc être efficace. En effet, elle permettrait d'obtenir un effet antithrombotique tout en préservant le rôle hémostatique permis par l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. Il pourrait alors s'agir de molécules qui exposent à un moindre risque hémorragique, en comparaison aux antiplaquettaires ciblant les phases d'adhésion et d'agrégation (French *et al.,* 2014).

2.1.3.1 Les récepteurs PAR-1 et PAR-4

Les récepteurs PAR-1 et PAR-4 (*Proteinase Activated Receptor*), exprimés par les thrombocytes, appartiennent à la famille des récepteurs couplés à une protéine G (French *et al.,* 2014). La thrombine active ces récepteurs par clivage protéolytique, induisant l'activation puis l'agrégation plaquettaire. Ils agissent de manière synergique, mais l'affinité du PAR-1 pour la thrombine est 40 fois supérieure à celle du PAR-4 (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012). Ceci explique que certains antiplaquettaires en développement ne ciblent que le PAR-1. Notons que la thrombine se lie, *via* son exosite 1, à une séquence *hirudin-like* du récepteur PAR-1. Le PAR-4 ne possède pas une telle séquence, la thrombine s'y lie donc *via* son site

actif (French *et al.,* 2014). L'activation de ces récepteurs par la thrombine constitue un des nombreux liens entre l'hémostase primaire et la coagulation (Bultas, 2013).

Ainsi, le PAR-1 est un récepteur majeur présent à la surface des plaquettes, et activé par de faibles concentrations de thrombine (quelques nanomolaires). Le PAR-1 est également présent à la surface des cellules endothéliales, des myocytes, des fibroblastes et des cellules musculaires lisses (French *et al.,* 2014). L'activation du PAR-1 par la thrombine à la surface de ces cellules explique le rôle prolifératif et pro-inflammatoire de la thrombine. Aussi, antagoniser le PAR-1 aurait non seulement un effet antithrombotique, mais cela limiterait également le risque de resténose (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

L'activation des récepteurs PAR-1 et PAR-4 est responsable de l'activation, en aval, de la phospholipase C et de la protéine kinase C, qui permettent la synthèse de thrombine. Ces enzymes sont donc responsables d'un phénomène d'amplification de l'activation et de l'agrégation plaquettaire (figure 14). Notons que la phospholipase C et le protéine kinase C sont également responsables de la synthèse de phosphoinositol-3 kinase, Rap1b, taline ou encore de kindline (Smyth *et al.,* 2009).

La thrombine, l'ADP et le TxA_2 provoquent l'activation plaquettaire, elle-même contribuant à la croissance du thrombus. De plus, la thrombine est le plus puissant activateur plaquettaire endogène. Aussi, il parait pertinent d'inhiber une voie d'activation plaquettaire particulièrement efficace, comparativement aux voies du TxA_2 ou de l'ADP qui sont la cible d'antiplaquettaires actuellement commercialisés. Par ailleurs, si une molécule cible spécifiquement les récepteurs PAR, les voies du TxA_2 et de l'ADP restent actives, ce qui limite le risque hémorragique. Notons également que les antithrombotiques commercialisés qui ciblent spécifiquement l'activité de la thrombine (-GATRAN), ou du FXa qui l'active (-XABAN), ont montré leur efficacité. Enfin, cibler les récepteurs PAR permet de n'inhiber qu'une des actions de la thrombine, contrairement aux AOD qui exposent ainsi à un risque hémorragique important, notamment à hautes doses, et en l'absence d'antidote. De fait, des antagonistes de PAR seraient plus spécifiques de la prévention de la thrombose artérielle car ciblant spécifiquement un des mécanismes de l'activation plaquettaires (French *et al.,* 2014).

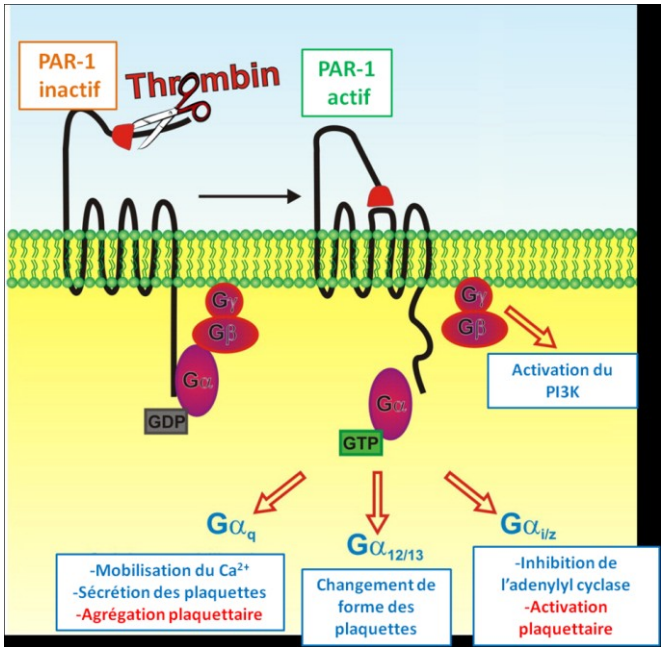


Figure 14 : Conséquences de l'activation du récepteur PAR-1 par la thrombine (French *et al.,* 2014)

La preuve de concept de l'inhibition des récepteurs de PAR comme mécanisme antiplaquettaire, a pu être obtenue *in vivo*, chez des souris génétiquement modifiées et d'autres petits mammifères. Toutefois, les études chez l'animal ont toujours posé question. En effet, les plaquettes de ces modèles animaux présentent des profils de récepteurs PAR différents de celui de l'Homme. Les souris, rats et lapins expriment majoritairement PAR-3 et PAR-4 à la surface des thrombocytes, tandis que le cochon d'Inde exprime à la fois PAR-1, PAR-3 et PAR-4. Ce sont finalement les primates qui possèdent les profils de PAR les plus proches de l'Homme (PAR-1 et PAR-4) (French *et al.,* 2014).

Le PAR-3, exprimé chez les souris agit comme un cofacteur à l'action du PAR-4. Un modèle de souris *knocked-out* pour le PAR-4 (-/-) ne présente pas un risque hémorragique accru comparativement à une souris saine. Par ailleurs, ces souris semblent protégées d'événements thrombotiques (Hamilton, Cornelissen et Coughlin, 2004). Malgré les difficultés d'extrapolation de tels résultats chez l'Homme, ces observations ont encouragé des équipes de recherche à poursuivre leurs investigations en ce sens et à développer des molécules capables d'antagoniser le récepteur PAR-1 (French *et al.,* 2014).

2.1.3.2 Le récepteur au thromboxane A_2

Ce récepteur est couplé à une protéine G et est présent à la surface des thrombocytes. Il n'est pas seulement activé par le TxA_2. Initialement, les antagonistes du récepteur au TxA_2 ont été développés pour limiter la variabilité interindividuelle de la réponse à un traitement antiplaquettaire par acide acétylsalicylique (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012). D'autres tissus, tels que le cerveau, les poumons ou les reins libèrent du TxA_2 afin de palier aux réactions asthmatiques, inflammatoires et anaphylactiques de l'organisme (Matsuno *et al.,* 2002).

Par ailleurs, le TxA_2 est obtenu à partir de la conversion de la prostaglandine H_2 ou de la prostaglandine G_2, catalysée par l'enzyme TxA_2 synthetase. Cette enzyme appartient à la superfamille des cytochromes P450. Au vu du rôle d'activateur plaquettaire du TxA_2, l'inhibition de cette enzyme apparait comme une cible antithrombotique pertinente. En effet, le TxA_2 n'est que l'une des voies d'activation de l'activation plaquettaire, l'inhibition de celle-ci ne devrait pas inhiber les autres voies d'activation (Mackman, 2008 ; Versteeg *et al.,* 2013).

2.1.3.3 Le récepteur EP_3

Une plaque d'athérome présente dans les artères produit la prostaglandine PGE_2 *via* la conversion de l'acide arachidonique par les COX. Ce PGE_2 se lie aux récepteurs EP plaquettaires. Le récepteur EP_3 inhibe l'adénylate cyclase (ou adénylyl cyclase) qui convertit l'ATP en AMPc. Au contraire, les récepteurs EP_2 et EP_4 activent l'adénylate cyclase. Cet AMPc inhibe la mobilisation du Ca^{2+}. Globalement, le PGE_2 rend les plaquettes plus sensibles à ses activateurs que sont le TxA_2, la thrombine ou encore l'ADP (Tilly *et al.,* 2014).

Aussi, l'inhibition du récepteur EP_3 plaquettaire induirait une activation plus importante des récepteurs EP_2 et EP_4 du fait du PGE_2 non lié aux EP_3. De fait, de l'AMPc en grande quantité serait produit au sein des plaquettes, ce qui empêcherait la mobilisation du Ca^{2+} intra-thrombocytaire et rendrait les plaquettes moins sensibles à leurs activateurs naturels.

La plupart des antithrombotiques sur le marché ou en cours de développement, ciblent des voies de l'hémostase qui sont anormalement activées dans un contexte prothrombotique. Ces stratégies thérapeutiques s'accompagnent d'un accroissement du risque hémorragique. L'approche qui est ici proposée permet d'inhiber un facteur prothrombotique présent en grande quantité lorsqu'il y a athérosclérose comparativement à un endothélium sain. L'inhibition du récepteur EP_3 n'aurait donc pas de répercutions sur l'hémostase physiologique. Cette stratégie thérapeutique, permettrait de limiter drastiquement le risque hémorragique à l'instauration d'un tel traitement antiplaquettaire (Mackman, 2008 ; Versteeg *et al.*, 2013 ; Tilly *et al.,* 2014).

2.1.4 L'agrégation plaquettaire

L'inhibition de l'agrégation plaquettaire doit être considérée avec prudence. En effet, les inhibiteurs du GPIIb/IIIb (Abciximab, Tirofiban, Eptifibatide), ont une action antiagrégante très efficace car ils inhibent l'agrégation plaquettaire quelle que soit la voie d'activation. Toutefois, ces molécules exposent les patients à un important risque hémorragique (French *et al.,* 2014).

Lorsqu'elles sont activées, les plaquettes libèrent différents types de granules. Parmi celles-ci, les granules denses contiennent de l'ADP, du Ca^{2+} et de la sérotonine. Ces plaquettes présentent à leur surface des récepteurs à la sérotonine (5HT pour 5-hydroxytryptamine) appelés $5HT_{2A}$ et $5HT_{2B}$. Il s'agit de récepteurs liés à une protéine G. Lorsqu'ils sont activés par la sérotonine, ces récepteurs déclenchent l'agrégation plaquettaire. La sérotonine seule ne provoque qu'une faible agrégation plaquettaire. Toutefois, elle amplifie l'action d'activateurs puissants de l'agrégation que sont l'ADP, le collagène, la thrombine et l'adrénaline.

Aussi, l'inhibition de des récepteurs $5HT_{2A}$ et $5HT_{2B}$ autoriserait une action antithrombotique particulièrement efficace, d'autant qu'un tel médicament n'abrogerait pas l'agrégation plaquettaire. Il en limiterait seulement l'amplification induite par la sérotonine (Adams *et al.,* 2009 ; Przyklenk *et al.,* 2010).

Notons que les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (ISRS) tels que Fluoxétine Paroxétine ou Citalopram, ont montré des propriétés antiagrégantes plaquettaires. Citalopram, en particulier, inhibe l'agrégation plaquettaire induite par l'activation du récepteur $P2Y_{12}$. Cet antidépresseur inhibe également la phosphorylation par l'ADP de protéines impliquées dans les voies de signalisation cellulaire et impliquées notamment dans l'agrégation plaquettaire (Akt, p38, MAPK,…). Ce mécanisme n'est pas encore totalement élucidé (Tseng *et al.,* 2013).

2.1.5 Synthèse

La figure 15 synthétise les voies d'adhésion, d'activation et d'agrégation des thrombocytes et les cibles pharmacologiques potentielles (Mackman, 2008).

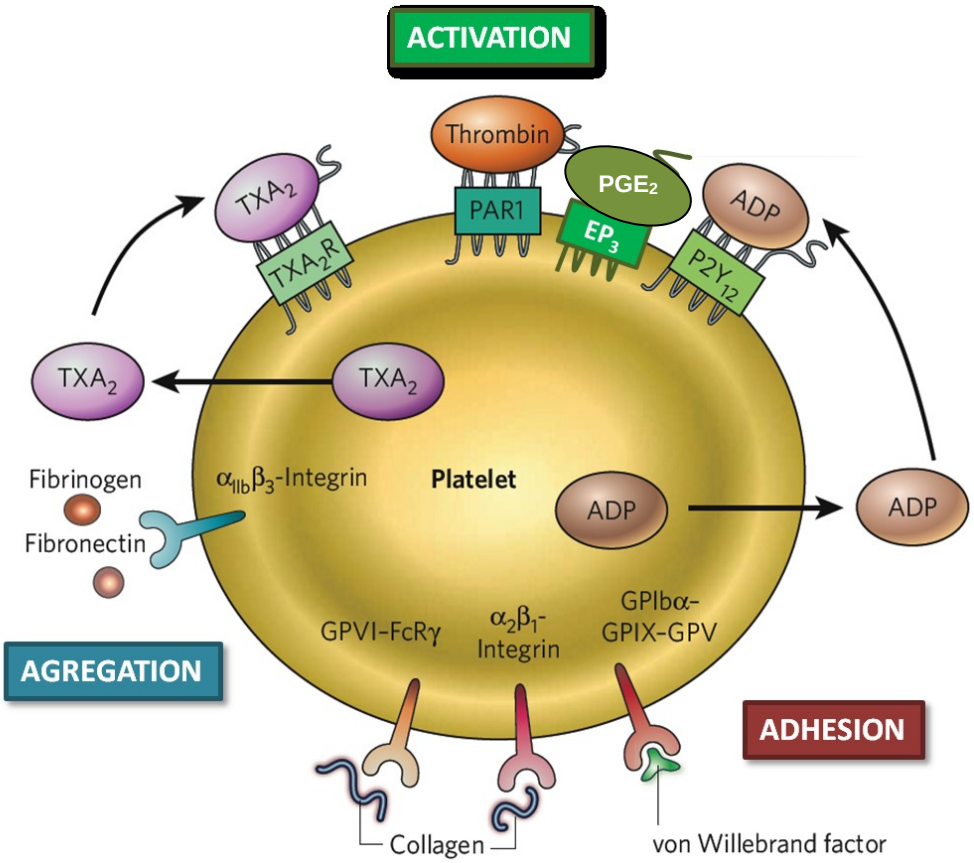


Figure 15 : Schéma de synthèse des nouvelles cibles antiplaquettaires (d'après Mackman, 2008)

Une autre approche est défendue par certains auteurs. Certains patients atteints du VIH développent un anticorps dirigé contre l'épitope GPIIIa49-66, une intégrine. Cet anticorps se lie au GPIIIa49-66 des plaquettes qui constituent un thrombus et provoque leur fragmentation. Les plaquettes circulantes et qui ne constituent pas un thrombus ne sont pas impactées. Aussi, un anticorps de ce type fait actuellement l'objet de recherches précliniques pour le développement d'un médicament antiplaquettaire. Cette approche est intéressante dans la mesure où l'action de l'anticorps est spécifique du thrombus et n'affecte pas les autres thrombocytes (Li *et al.,* 2009 ; W. Zhang *et al.,* 2010).

2.2 La coagulation

2.2.1 Généralités

Plusieurs aspects doivent être pris en compte lors de la sélection du ou des facteurs de la coagulation inhibés dans le développement de nouvelles molécules antithrombotiques. Tout d'abord, cerrtains auteurs considèrent qu'il serait préférable d'inhiber des facteurs dont le rôle intervient plutôt en amont de la cascade de la coagulation, notamment avant la phase d'amplification de la génération de thrombine. En effet, il est plus efficace d'inhiber une petite quantité de facteurs en amont de la génération de thrombine, qu'une grande quantité de thrombine déjà générée (Povsic *et al.,* 2011 ; Smiley et Becker, 2014). De plus, bloquer une

étape limitante du phénomène de la coagulation permet une anticoagulation efficace (Smiley et Becker, 2014). Lorsqu'un facteur de la coagulation est identifié comme cible, il faut garder à l'esprit que le clivage protéolytique qui l'active aboutit à l'amplification de l'action des facteurs en aval. Aussi, une molécule inhibant un facteur en amont de la cascade de la coagulation, tel que le FVIIa, aura un fort effet anticoagulant par rapport à une molécule qui ciblerait exclusivement la thrombine (Mackman, 2008). Il serait donc plus pertinent de développer des molécules anticoagulantes ciblant les facteurs intervenant en amont est d'inhiber la génération de thrombine et non la thrombine elle-même (Kleiman et Califf, 2000).

2.2.2 Initiation

2.2.2.1 Le complexe FT-FVIIa

Les patients bénéficiant d'une arthroplastie du genou se voient administrer un traitement prophylactique de la thrombose. Le plus souvent, il s'agit d'héparines. Sans ce traitement, ces patients sont 40 à 70 % à présenter une thrombose veineuse profonde consécutive à la chirurgie. Avec l'instauration d'une héparinothérapie, ils ne sont plus que 24 à 27 %, ce qui reste substantiel. Les héparines ciblent principalement les facteurs Xa et IIa, ce qui laisse la possibilité à la voie extrinsèque d'être activée par le facteur tissulaire et donc de continuer à générer de la thrombine (Lee *et al.,* 2001). C'est cette hypothèse qui a conduit au développement de molécules ciblant des facteurs de la coagulation en amont de la voie extrinsèque, tel que le FVIIa ou le FT.

Le FT est un des facteurs majeurs de l'initiation de la coagulation, *via* la voie extrinsèque. Il s'agit d'un récepteur transmembranaire pour le FVIIa présent à la surface des cellules de la media et de l'adventice des artères, notamment. C'est l'exposition du facteur tissulaire à la circulation sanguine qui déclenche l'initiation de la coagulation, lorsque le FVIIa s'y fixe. Aussi, l'inhibition du FVIIa et/ou du FT devrait permettre d'obtenir un important effet anticoagulant. L'administration d'anticorps dirigés contre le site actif du FVIIa ou contre celui du TF chez des babouins a permis d'obtenir une puissante action anticoagulante (Ott, 2011 ; Priestley, 2014).

2.2.2.2 Le TFPI

Le TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*) est un inhibiteur endogène de sérine protéase qui est synthétisé et secrété par les cellules endothéliales. Le TFPI inhibe directement le FXa et le complexe FT-FVIIa. Une partie importante du TFPI est liée aux micro-vaisseaux *via* une liaison de faible affinité avec les glycosaminoglycanes (Abraham *et al.,* 2003). Ce pool de TFPI est libéré dans la circulation en présence d'héparine. Un autre pool de TFPI est stocké dans les plaquettes et sécrété au moment de leur dégranulation. Enfin, la majorité du TFPI circulant est lié aux lipoprotéines plasmatiques. Le taux circulant de TFPI est très variable selon les individus, en dehors de tout contexte pathologique (Creasey, 1999).

Dans un contexte de sepsis sévère, on observe une élévation de facteurs dérivant de l'endothélium tels que le vWF, ce qui traduit une atteinte de l'intégrité de l'endothélium. Par ailleurs, la coagulation est perturbée et une diminution de l'activité de la protéine C, de l'antithrombine et du TFPI est observée (Bernard *et al.,* 2001 ; Tsao, Ho et Wu, 2015). Ceci soutient l'hypothèse selon laquelle le TFPI aurait un rôle protecteur des micro-vaisseaux et de

leur endommagement chez les patients présentant un sepsis sévère. Cette hypothèse est étayée par des études précliniques au cours desquelles, l'administration de TFPI d'origine mammifère ou bactérienne (*Escherichia coli*) avait un effet positif chez des animaux présentant un sepsis sévère (Abraham *et al.,* 2003). Ces observations tendent à faire du TFPI un candidat intéressant comme cible anticoagulante.

2.2.3 L'amplification

Les patients atteints d'un déficit en FXI présentent une déficience moyenne de l'hémostase, tandis que les patients présentant un déficit en FXII n'ont pas un risque de saignement accru (Mackman, 2008). Il a également été montré dans un modèle murin que des composants de la voie intrinsèque et de la voie commune ne sont pas essentiels pour le maintien d'une hémostase physiologique (annexe 2). Les facteurs essentiels pour le maintien d'une hémostase physiologique et de la survie de l'individu sont le FT, le FVII, le FX et la thrombine (Smiley et Becker, 2014). Ceci explique l'intérêt porté aux facteurs de la voie intrinsèque comme cibles de nouveaux antithrombotiques, et notamment le FXIIa. Pour corroborer cette thèse, une étude réalisée chez des souris déficientes en FXIIa a montré que si un défaut en FXIIa n'affectait pas l'hémostase, ce facteur avait un rôle important dans la thrombose, ce qui en fait une cible pharmacologique idéale (Mackman, 2008). Notons qu'actuellement aucune molécule anticoagulante ciblant le FXIIa ne fait l'objet d'essais cliniques.

2.2.3.1 Le FIX

Le facteur IX est vitamine K-dépendant. Biochimiquement, il s'agit d'une sérine-protéase de 57 kDa synthétisée par les hépatocytes. La forme active du FIX est composée d'une chaine légère de 17 kDa associée à une chaine lourde de 30 kDa sur laquelle se trouve le site actif. C'est le N-terminal de la chaine légère qui contient le domaine *Gla*[1]. Accolés au domaine *Gla*, se trouvent deux domaines hydrophobes EGF (*Epidermal Growth Factor*) 1 et 2 qui jouent un rôle important dans la liaison du FIX au complexe FT-FVIIa et au FVIIIa. Enfin, le domaine placé en C-terminal est le site catalytique de type sérine-protéase. En présence de Ca^{2+}, le résidu *Gla* change de conformation, exposant la région hydrophobe de la protéine ce qui permet l'ancrage de celle-ci dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire (Howard *et al.,* 2007).

Le FIXa intervient en amont de la cascade de la coagulation et joue un rôle fondamental dans la génération de thrombine initiée par le FT ou par la voie intrinsèque. Ce facteur interagit donc avec le FVIIIa, le FVa, le FXa et le complexe FT-FVIIa (Gopinath, 2008), ce qui en fait une cible pharmacologique intéressante pour le développement de molécules antithrombotiques. Le FIXa constitue le lien entre l'initiation et la propagation de la coagulation, puisqu'il est activé par le complexe FVIIa-FT ou le FXIa et aboutit à la génération explosive de thrombine ainsi qu'à la phase de propagation. Complexé au FVIIIa, le FIXa forme, en présence de Ca^{2+}, le tenase intrinsèque qui active la prothrombinase responsable de la génération explosive de thrombine (Povsic *et al.,* 2011 ; Smiley et Becker, 2014).

[1] *Vitamin K-dependant carboxylation / gamma-carboxyglutamic (Gla) domain*

Les patients déficients en FIX présentent une hémophilie de type B, une pathologie récessive liée au chromosome X, et qui se traduit biologiquement par un allongement du TC+A (Povsic *et al.,* 2011).

Le développement des premiers inhibiteurs du site actif du FIXa s'est avéré difficile dans la mesure où son site actif n'adopte une conformation fonctionnelle qu'en formant un complexe avec le FVIIIa. De fait, la plupart des molécules inhibitrices du FIXa ont été conçues de manière à empêcher des interactions macromoléculaires telles que la formation du complexe FVIIIa-FIXa (Smiley et Becker, 2014). Des modèles pré-cliniques murins de thrombose veineuse ont pu montrer que l'administration de molécules inhibitrices du FIX et/ou FIXa était aussi efficace que les HBPM avec une fenêtre thérapeutique plus large (Toomey *et al.,* 2000).

2.2.3.2 Le FXIa

Le déficit constitutif en facteur XI est une coagulopathie héréditaire. Les patients atteints de cette pathologie présentent des épisodes hémorragiques modérés comparativement aux hémophiles de type A ou B. D'ailleurs, la plupart des patients atteints de cette pathologie ne sont pas traités (Leadley Jr. *et al.,* 2000 ; Denas et Pengo, 2013).

L'inhibition du FXIa semble également un mécanisme pertinent pour le développement de molécules antithrombotiques. En effet, ce facteur de la coagulation intervient en amont de la cascade de la coagulation, au niveau de la voie extrinsèque. L'inhibition de ce facteur permettrait d'inhiber la génération de thrombine induite par l'activation de la voie intrinsèque. Les patients présentant un déficit constitutif en FXI ne sont que peu sujets à des épisodes hémorragiques. Aussi, l'inhibition du FXIa, dans le contexte d'un traitement antithrombotique, devrait limiter la survenue d'hémorragies. Ces hypothèses sont soutenues par des travaux dans des modèles murins au cours desquels le FXIa de ces animaux a été inhibé par un anticorps monoclonal dirigé contre ce facteur (Zhang *et al.,* 2010).

De plus, il est généralement admis que ce sont les facteurs de la voie intrinsèque qui sont, dans la majorité des cas, les responsables d'épisodes thrombotiques veineux (H. Zhang *et al.,* 2010). Ceci serait particulièrement vrai s'agissant du FXIa dont de hauts niveaux plasmatiques sont souvent associés à des TVP (Meijers *et al.,* 2000). Par ailleurs, les patients présentant un déficit constitutif en FXI présentent globalement moins d'épisodes thrombotiques veineux que la population générale (Salomon *et al.,* 2008).

Contrairement à son importance dans la thrombose veineuse, le FXIa joue un rôle secondaire dans les phénomènes physiologiques de l'hémostase (H. Zhang *et al.,* 2010). Physiologiquement, le FXIa est impliqué dans la phase de propagation de la coagulation ainsi que dans la stabilisation du thrombus formé *via* le rétrocontrôle positif de la thrombine. Le FXIa active également le TAFIa qui protège la fibrine de la fibrinolyse. Ainsi, en inhibant le FXIa, le TAFIa se trouve également inhibé indirectement (H. Zhang *et al.,* 2010).

2.2.4 Propagation

2.2.4.1 Les exosites 1 et 2 de la thrombine

La thrombine (FIIa) est une sérine protéase, issue du clivage de la prothrombine (FII). Elle clive le fibrinogène en fibrine, ce qui permet de renforcer le clou plaquettaire. Par ailleurs, elle interagit avec les facteurs V, VIII, XI et XIII en les activant. Activée par la voie extrinsèque, elle régule la voie intrinsèque de la coagulation au moment de la phase d'amplification. Par ailleurs la prothrombine peut activer les thrombocytes par liaison du récepteur GPIb thrombocytaire à son site de liaison anionique.

La thrombine joue donc un rôle central dans la coagulation. Elle semble être une cible pertinente pour le développement de molécules antithrombotiques. Ajoutons que ce facteur est impliqué dans l'athérogénèse et l'inflammation. C'est la raison pour laquelle de nombreux anticoagulants commercialisés, déjà présentés dans ce document, ciblent la thrombine. Toutefois, ces molécules fonctionnent principalement comme antagonistes du site actif de la thrombine. Cette dernière possède en réalité deux autres sites secondaires, appelés respectivement exosites 1 et 2. Physiologiquement, le premier fixe le fibrinogène, le FXI, FV, FVIII et la thrombomoduline. Le second permet la fixation et l'activation plaquettaire *via* le récepteur GPIb, et permet également la liaison à l'héparine. Ce sont donc autant de cibles potentielles sur la thrombine pour le développement de nouvelles molécules antithrombotiques (Hankey et Eikelboom, 2011 ; Li *et al.,* 2014a).

2.2.4.2 Promouvoir l'activité du cofacteur II de l'héparine (HCII)

Certaines publications ont permis de montrer que l'administration chez l'animal de β-D-xylosides promeut la synthèse de glycosaminoglycanes (GAG). Cette synthèse permet l'inhibition de la thrombine, d'où l'effet antithrombotique de ces composés (He *et al.,* 2002). Ces β-D-xylosides présentent en fait une action promotrice du second cofacteur de l'héparine (HCII).

Expérimentalement, il a été montré que le dermatane sulfate, un GAG dont la synthèse est promue par les β-D-xylosides, présentait une action antithrombotique quand bien même ce dernier n'interagit pas avec l'antithrombine. Ainsi, comparativement aux héparines, les β-D-xylosides présentent une action antithrombotique moins importante, car ils n'interagissent pas avec l'AT, mais ils exposent à un faible risque hémorragique (Bellamy *et al.,* 1993).

Le second cofacteur de l'héparine (HCII) est une protéine plasmatique, un inhibiteur de serpine, qui inhibe rapidement la thrombine en présence de dermatane sulfate, d'heparane sulfate ou d'héparine. Le taux d'inhibition de la thrombine par le HCII est multiplié par 10^3 en présence de l'un de ces co-facteurs. Il semble que cette protéine soit également impliquée dans des phénomènes liés à l'inflammation, l'athérosclérose et la cicatrisation (He *et al.,* 2002).

Des recherches conduites dans un modèle murin HCII-/- ont permis de montrer que ces animaux ne présentent pas d'inhibition de la thrombine *via* le dermatane-sulfate. A l'âge d'un an, ces souris de génotype HCII-/- n'apparaissent pas phénotypiquement différentes des souris saines. De même, elles ne présentent pas de différences en termes de poids, de survie, et ne semblent pas sujettes à plus d'événements thrombotiques spontanés que des animaux sains (He *et al.,* 2002).

Dans la mesure où le mécanisme d'inhibition de la thrombine impliquant les β-D-xylosides et le HCII est saturable, et que ces modèles murins déficients en HCII ne semblent

pas présenter de différences phénotypiques comparées aux souris saines, l'utilisation de β-D-xylosides semble une stratégie antithrombotique intéressante. Reste alors à s'assurer que l'action antithrombotique de ces composés soit suffisante pour être pertinente cliniquement (He *et al.,* 2002).

2.2.4.3 Le complexe protéine C/protéine S

La protéine C exerce physiologiquement une action antithrombotique avec la protéine S et son récepteur EPCR, selon les territoires vasculaires. Elle est activée par la thrombine lorsque cette dernière est liée à la thrombomoduline. La protéine C est une sérine protéase *trypsin-like* constituée d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde de respectivement 21 kDa et 41 kDa. La chaîne légère porte un domaine *Gla* comportant neuf motifs d'acide γ-carboxy-glutamique ainsi que deux domaines EGF (Gopinath, 2008).

Physiologiquement, la protéine C cible le FVa du complexe prothrombinase et le FVIIIa. Elle les inactive par protéolyse, rendant inactif le complexe essentiel à la génération de thrombine.

Dotrecogine alpha (XIGRIS®) est une forme recombinante de la protéine C activée qui obtint une AMM en août 2002 pour l'Union Européenne. Indiquée dans le traitement du sepsis sévère chez des patients présentant plusieurs défaillances d'organe, cette molécule a été retirée du marché mondial en octobre 2010 suite aux résultats de deux essais cliniques (PROWESS-SHOCK). Ces essais ont montré que l'administration parentérale de XIGRIS® n'améliorait pas de manière significative la survie à 28 jours des patients traités et les exposait à un risque hémorragique significativement accru (Abraham *et al.,* 2005 ; Nadel *et al.,* 2007). L'exemple de XIGRIS® a pu mettre un frein au développement de telles molécules, bien que l'inhibition de FVa et FVIIIa par une protéine C recombinante puisse paraitre pertinente. Toutefois, certaines formes recombinantes de la protéine C font actuellement l'objet d'essais cliniques comme molécule anti-inflammatoire.

2.3 Potentielles cibles de la fibrinolyse

Depuis 50 ans, les activateurs du plasminogène sont les seuls médicaments thrombolytiques disponibles commercialement. Toutefois, leur utilisation expose à un risque hémorragique indéniable, dont l'une des complications les plus dramatiques est l'hémorragie intracrânienne (Marder et Novokhatny, 2010). Peu de molécules thrombolytiques ont fait l'objet de développements cliniques au cours des dix dernières années. Ceci s'explique à la fois par la moindre utilisation des thérapeutiques thrombolytiques disponibles, au profit de méthodes « mécaniques » d'extraction du thrombus par cathéters (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

Par ailleurs, l'attention s'est également portée sur l'amélioration des propriétés pharmacocinétiques du t-PA recombinant (Altéplase, ACTILYSE®), augmentant ainsi la durée d'action. C'est dans ce but qu'ont été développés retéplase (RAPILYSIN®) et ténectéplase (METALYSE®) (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012). Il s'agit des seules molécules disponibles pour le traitement en urgence de l'AVC. En plus d'un fort risque hémorragique associé à leur administration par voie IV, et des nombreuses contre-indications à leur utilisation, le délai est très court pour l'administration des dérivés du t-PA, soit 3 à 4

heures après l'apparition des symptômes. Il y a donc nécessité de développer des alternatives thérapeutiques.

Actuellement, de nouveaux dérivés du t-PA font l'objet d'essais cliniques. A ces dérivés, s'ajoutent la plasmine humaine naturelle, recombinante et ses dérivés. De plus, une meilleure compréhension des phénomènes physiologiques liés à la thrombolyse a permis de mettre évidence de nouvelles cibles pharmacologiques potentielles (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

Il convient donc de distinguer d'une part :

- les molécules thérapeutiques promotrices de la thrombolyse,
- les molécules thrombolytiques en tant que tel.

2.3.1 Inhiber le PAI-1

Le PAI-1 est exprimé par les cellules endothéliales, les thrombocytes et par le tissu adipeux. Il s'agit d'une glycoprotéine de 50 kDa de la famille des serpines, c'est-à-dire des inhibiteurs de sérine-protéases (Rouch *et al.,* 2015). Physiologiquement, il inhibe le t-PA et l'u-PA qui sont tout deux des activateurs de la fibrinolyse. En effet, t-PA et u-PA convertissent le plasminogène en plasmine. Aussi, l'inhibition de PAI-1 semble être un mécanisme pertinent pour promouvoir les phénomènes thrombolytiques physiologiques. Il s'agit alors :

- d'inhiber l'expression du gène codant pour PAI-1,
- ou de limiter l'activité de PAI-1.

Menées dans les années 1990, des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence les propriétés de certains composés hypolipémiants tels que la niacine (vitamine B3) ou les fibrates à diminuer la synthèse de PAI-1 (Fujii et Sobel, 1992 ; Brown, Sobel et Fujii, 1995). Toutefois, ces composés n'agissent pas seulement sur la synthèse de PAI-1, mais également sur celle d'autres protéines. Plus récemment, certains peptides ont montré leur capacité à inhiber l'activité de PAI-1.

2.3.2 Inhiber le TAFI

Le TAFIa inhibe le rétrocontrôle positif de la plasmine qui génère la phase de propagation de la fibrinolyse (Mosnier et Bouma, 2006). En effet, cette carboxypeptidase clive les résidus lysine en C-terminal de la fibrine, ce qui limite la fixation du plasminogène et de la plasmine à la fibrine. Son action limite la fibrinolyse. Des études menées chez des mammifères ont permis de mettre en évidence la pertinence de l'inhibition du TAFIa pour le développement de molécules thrombolytiques. En effet, l'administration d'inhibiteurs du TAFIa chez ces animaux augmente la fibrinolyse par la plasmine (Nagashima *et al.,* 2000).

2.3.3 Cibler la fibrine

Les thrombolytiques actuellement sur le marché n'ont qu'une action indirecte sur la lyse du thrombus. Les analogues du t-PA ou de l'u-PA permettent l'activation du plasminogène en plasmine qui dégrade le réseau de fibrine formant le caillot. Ce mode d'action indirect explique le délai d'action relativement important de ces médicaments pourtant utilisés en situation d'urgence. Aussi, des médicaments qui agiraient directement comme des fibrinolytiques s'avèreraient particulièrement intéressants cliniquement si leur

délai d'action est court, de même que leur demi-vie. Cette demi-vie courte permet de limiter dans le temps le risque hémorragique lié à leur administration.

Les activateurs du plasminogène, même s'ils sont administrés par voie intraveineuse, exposent à un fort risque hémorragique. Ils activent la fibrinolyse au niveau des endothelia lésés et/ou malformés. La complication la plus redoutée lors de l'administration de ces médicaments thrombolytiques est l'hémorragie intracrânienne qui survient dans 2,8 % des cas (Marder et Stewart, 2002). L'utilisation des activateurs du plasminogène sous-entend l'utilisation du pool plasmatique de plasminogène endogène. Ce plasminogène doit donc être présent en quantité suffisante au niveau du thrombus, pour obtenir une lyse suffisante (Shlansky-Goldberg *et al.,* 2008).

Plus concrètement, il s'agit de développer des molécules capables de lyser directement un thrombus déjà formé. De telles molécules doivent donc être capables de dégrader les chaînes α, β et/ou γ de la fibrine. Il conviendra d'en limiter la demi-vie afin de limiter le risque hémorragique. Actuellement, de telles molécules font l'objet d'essais clinique, il s'agit de la plasmine et de ses dérivés (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

Par ailleurs, le développement du matériel d'administration par voie IV autorise aujourd'hui une administration directement à proximité du thrombus, ce qui rend plus efficace et plus sûre l'administration de plasmine et ses dérivés. D'ailleurs, après l'échec en développement clinique de la « thrombolysine » dans les années 1950, l'actuel regain d'intérêt pour la plasmine, le plasminogène et leurs dérivés comme thérapie thrombolytique s'explique principalement par le développement de ces nouvelles technologies d'administration par voie IV (Pakola, 2009).

Enfin, un modèle de souris déficientes en α2-antiplasmine a présenté un état neurologique moins défavorable après thrombose de l'artère cérébrale moyenne, comparativement au groupe de souris saines. Aussi, l'injection de plasmine comme thrombolytique pourrait également neutraliser l'α2-antiplasmine et ainsi diminuer la surface de la zone infarcie (Pakola, 2009).

*

* *

Considérant les potentielles cibles antithrombotiques présentées précédemment, plusieurs stratégies peuvent être adoptées pour la conception et le développement de nouveaux médicaments. Les molécules antithrombotiques peuvent consister en :

- des antagonistes de récepteurs cellulaires
- des agonistes de récepteurs cellulaires
- des inhibiteurs enzymatiques
- des enzymes recombinantes

Pour développer ce type de stratégies, plusieurs approches sont possibles. La connaissance d'une cible pharmacologique, telle qu'un récepteur cellulaire ou une enzyme à inhiber, permet de concevoir *in silico* des molécules issues de la synthèse chimique et qui seront spécifiques de cette cible. Les méthodes de criblage à haut-débit permettent également de tester la spécificité d'un grand nombre de molécules naturelles ou issues de la synthèse chimique, pour une cible, en peu de temps.

En 1984, Köhler et Milstein reçurent le Prix Nobel de Médecine pour la mise au point d'une méthode permettant la production d'anticorps monoclonaux. Cette technique avait été décrite dix ans plus tôt dans la revue scientifique *Nature* (Köhler et Milstein, 1975). Les anticorps monoclonaux sont des anticorps spécifiques d'un épitope. Ils proviennent d'une seule lignée de plasmocytes. La mise au point de telles molécules à des fins thérapeutique a révolutionné le traitement de nombreuses maladies telles que le cancer du sein (Trastuzumab pour les cancers HER2+). Les anticorps monoclonaux se fixent à leur épitope, limitant ainsi l'interaction de ce dernier avec d'autres ligands du fait de l'encombrement stérique de l'anticorps.

Les anticorps monoclonaux sont des molécules très spécifiques de leur cible, mais leur administration provoque parfois des réactions allergiques. Ce n'est donc pas encore la Panacée. Parallèlement au développement des anticorps monoclonaux, les aptamères, des acides nucléiques qui se lient spécifiquement à une cible pharmacologique donnée, font l'objet de développement depuis les années 1990.

3. DES OLIGONUCLEOTIDES - MEDICAMENTS

3.1 Définition – Les aptamères

Depuis leur mise en évidence en 1869 par Friedrich Miescher, le rôle de transmission de l'information génétique a longtemps été le seul assigné aux acides nucléiques. Ce n'est que dans les années 1990 qu'a été mise en évidence la capacité de certains ARN courts à se lier de manière spécifique à certaines cibles non–nucléiques, du fait de leur structure tridimensionnelle (Keefe, Pai et Ellington, 2010 ; RAODm *et al.,* 2013). C'est dans ce contexte qu'ont été développés les aptamères.

Les aptamères sont des oligonucléotides synthétiques (acides ribo- ou désoxyribo-nucléiques) qui se lient à une protéine-cible, du fait de leur structure tridimensionnelle spécifique de cette cible. Ils ont été décrits pour la première fois en 1990 (Ellington et Szostak, 1990 ; Tuerk et Gold, 1990). Le terme « aptamère » vient du grec *aptus* qui signifie « adapter » et *merus*, « particule ». Parfois appelés « anticorps chimiques », les aptamères leur sont supérieurs dans la mesure où un aptamère ne cause pas de réaction d'immunogénicité (Sundaram *et al.,* 2013 ; Darmostuk *et al.*, 2015).

La plupart des aptamères à visée thérapeutique sont sélectionnés de manière à être des inhibiteurs compétitifs de leur cible, limitant toute interaction de la protéine-cible avec d'autres macromolécules (Keefe, Pai et Ellington, 2010 ; Sundaram *et al.,* 2013). Le choix se portera sur un aptamère à ADN lorsque la protéine-cible fixe l'ADN, et de même avec les aptamères à ARN. Toutefois, il est possible de générer des aptamères spécifiques de protéines qui ne sont pas connues pour avoir comme ligands des oligonucléotides. La liaison des aptamères à leur cible se fait par des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogènes ou des interactions hydrophobes (Toulmé et Giegé, 1998).

Du fait de leur nature nucléotidique, les aptamères ne semblent *a priori* pas toxiques pour l'organisme. La toxicité d'une molécule thérapeutique provient soit d'une action exacerbée sur sa cible, soit d'une action sur d'autres molécules que leur cible pharmacologique. Les aptamères étant développés pour être particulièrement spécifiques de leur cible, ce type d'interaction n'a pas encore été décrit à ce jour. Les toxicités identifiées pour les aptamères étaient liées à certaines des modifications chimiques de ces derniers, notamment l'ajout de groupement PEG à l'extrémité 5' de la séquence (Keefe, Pai et Ellington, 2010). Leurs propriétés pharmacocinétiques sont, par ailleurs, aisément prévisibles. Certains auteurs mettent cependant en évidence le manque de recul et de données cliniques quant à l'éventuelle toxicité de ces acides nucléiques (Sundaram *et al.,* 2013).

Ces oligonucléotides sont modifiés chimiquement afin d'augmenter leur biodisponibilité, leur demi-vie plasmatique et de les rendre moins sensibles aux nucléases, des enzymes ubiquitaires de l'organisme. Sans modification de leur structure, leur demi-vie dans l'organisme est de l'ordre de 2 minutes. Des exemples de modifications chimiques sont présentés en annexe 3. Par ailleurs, du fait de leur petite taille, les aptamères sont capables de cibler des protéines inaccessibles à des peptides qui présentent, par nature, un encombrement stérique plus important (Povsic *et al.,* 2011). Ils sont formulés en injections intraveineuses (IV) ou sous-cutanées (SC).

Etant de petite taille (5 à 15 kDa), leur élimination rénale est facilitée. De fait, la biodisponibilité d'un aptamère peut être accrue en augmentant son poids moléculaire. C'est ce qui est recherché lorsqu'un aptamère est conjugué à un groupement de polyéthylène glycol ou encore de diacylglycérol (Pestourie, Tavitian et Duconge, 2005).

Actuellement, aptamères à ADN et à ARN font tout deux l'objet de développements cliniques. L'ADN est plus stable que l'ARN, mais ce dernier autorise une plus grande diversité de structures tridimensionnelles (Darmostuk *et al.,* 2015). Un premier aptamère à visée thérapeutique a obtenu l'approbation de la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2005. Il s'agit de Pegaptanib (MACUGEN®), un aptamère à ARN qui possède une indication dans la déficience maculaire liée à l'âge (DMLA), du fait de son action anti-VEGF. Celui-ci a ouvert la voie au développement de nombreuses autres molécules thérapeutiques aptamériques (Sundaram *et al.,* 2013)

Les applications cliniques des aptamères sont multiples et touchent à la fois (Darmostuk *et al.,* 2015) :

- le développement de médicaments : antithrombotiques, anticancéreux, traitement de la DMLA
- le développement de techniques d'analyses en biologie médicale pour la détection de particules virales, de biomarqueurs dans le cancer ou encore d'autres types de protéines par Western-Blot

Etant constitués de nucléotides, il existe potentiellement un très grand nombre de combinaisons et de séquences d'aptamères. Considérant une séquence d'une centaine de nucléotides, il existe alors environ 10^{60} combinaisons nucléotidiques possibles. Dans un article de 1998, les Prs. Toulmé et Giegé expliquent ainsi que « ces nombres sont tellement immenses qu'il est clair que seulement une fraction infiniment petite est utilisée par les organismes vivants actuels [et les] séquences autres que les séquences naturelles peuvent conduire à des structures macromoléculaires fonctionnelles » (Toulmé et Giegé, 1998).

Les avantages et les inconvénients des aptamères comparativement aux anticorps, sont présentés en annexe 4.

3.2 Synthèse des aptamères

3.2.1 SELEX

Le concept d'obtention d'aptamères par la méthode du SELEX se compose de deux étapes (Ellington et Szostak, 1990 ; Tuerk et Gold, 1990 ; Toulmé et Giegé, 1998) :

- constitution d'une banque de séquences oligonucléotidiques
- sélection de séquences se liant spécifiquement à la cible

La constitution de la banque d'oligonucléotides nécessite de générer entre 10^3 et 10^{15} séquences différentes. Il s'agit le plus souvent de séquences de 60 oligonucléotides simple-brin de régions variables flanquées de régions courtes constantes qui serviront à la conception d'amorces pour la phase d'amplification des acides nucléiques. Cette banque est générée par synthèse chimique. Le détail de la méthode de construction de cette banque est présenté en annexe 5.

La première méthode de sélection d'aptamères *in vitro*, dite « conventionnelle », est celle du SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*, Tuerk et Gold, 1990). Si de récentes évolutions ont permis de rendre la sélection d'aptamères plus efficiente, moins coûteuse, et significativement moins longue, elle durait auparavant quelques semaines contre quelques heures actuellement (Darmostuk *et al.,* 2015).

Après obtention d'une banque d'oligonucléotides, ceux-ci incubent en présence de la protéine-cible. Toutes les séquences non liées à la cible sont éliminées par élution tandis qu'il y a rétention des complexes formés entre les aptamères et les cibles fixées, le plus souvent sur un filtre de nitrocellulose (Jayasena, 1999). Puis, les séquences liées à une cible sont éluées à leur tour. Ces acides nucléiques sont alors amplifiés par PCR s'il s'agit d'ADN, ou RT-PCR s'il s'agit d'ARN. A partir de ce nouveau pool de séquences d'oligonucléotides, une nouvelle étape de sélection contre la cible est réalisée, avec élution et amplification à nouveau. Se succèdent ainsi une vingtaine de tours de sélection. Après ces étapes de sélection et d'amplification, les oligonucléotides restants sont séquencés et soumis à différents tests permettant d'évaluer leur cinétique de liaison à la cible (Tuerk et Gold, 1990).

La figure 16 présente les différentes étapes de la méthode conventionnelle du SELEX.

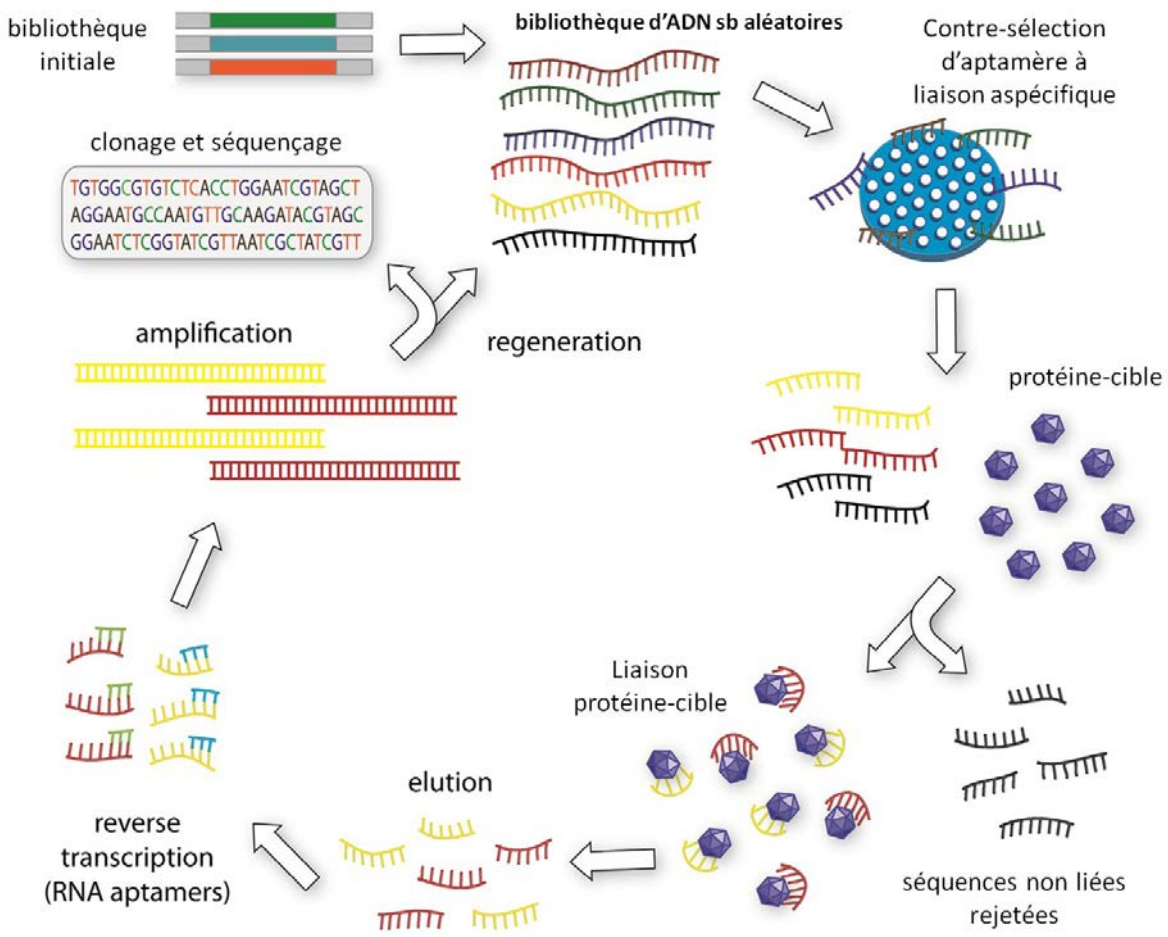


Figure 16 : Principe de la méthode conventionnelle du SELEX (Darmostuk *et al.,* 2015)
sb : simple-brin

Cette première méthode a connu de nombreux développements ces vingt dernières années, afin d'en diminuer le coût et le temps de mise en œuvre. Parmi les nombreuses approches qui font encore actuellement l'objet de développements, citons la méthode CE-SELEX (*Capillary Electrophoresis-SELEX*) décrite pour la première fois par Mendonsa et Bowser en 2004. La méthode employée reste la même que celle décrite plus haut, sinon que la séparation des séquences liées aux cibles et des séquences non liées se fait par électrophorèse capillaire. Une pression négative est appliquée à une des extrémités de la colonne de chromatographie, permettant ainsi la séparation des séquences (figure 17). Cette méthode a été largement utilisée pour la mise au point d'aptamères à visée thérapeutique (Darmostuk *et al.,* 2015). Le CE-SELEX permet de diviser par cinq le nombre de tours de sélections par rapport à la méthode conventionnelle du SELEX.

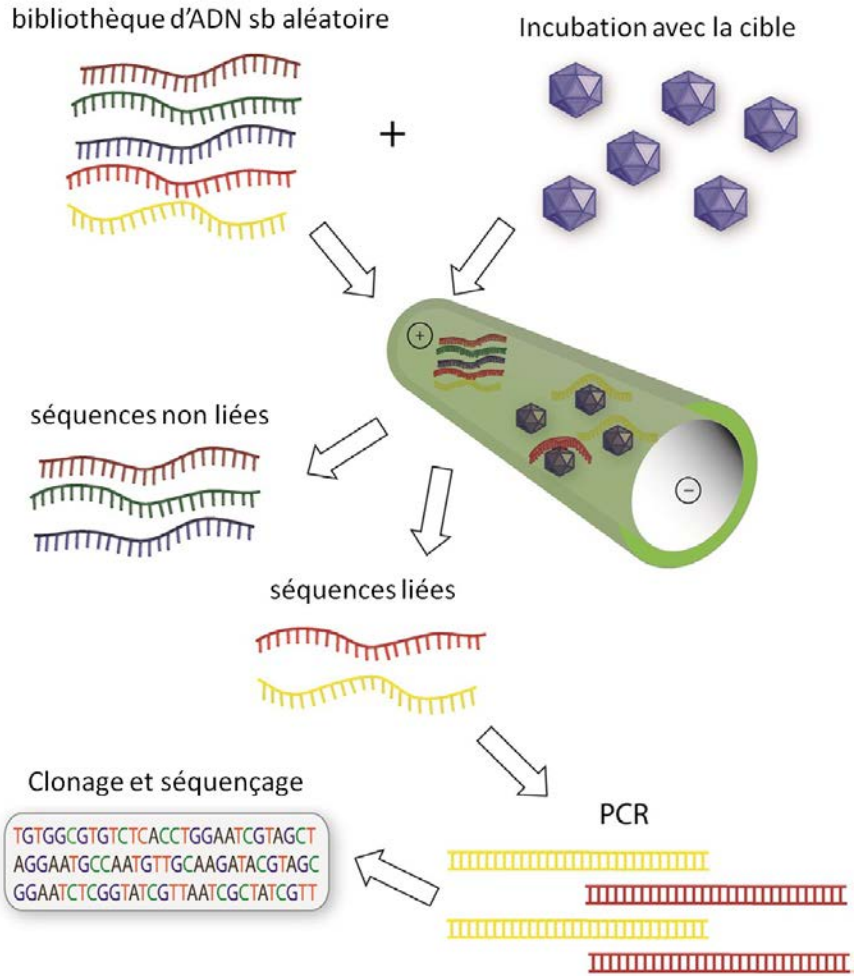


Figure 17 : Principe de la méthode du CE-SELEX (Darmostuk *et al.,* 2015)
sb : simple-brin

Enfin, les aptamères générés par les méthodes SELEX possèdent des constantes de dissociation (K_d) de l'ordre du micro- au nano-molaire. Plus une constante de dissociation est faible, plus il existe d'affinité entre un ligand et son récepteur. Ces aptamères possèdent donc une bonne affinité pour leur cible (Darmostuk *et al.,* 2015).

3.2.2 Modifications chimique des aptamères

L'objectif des modifications chimiques des aptamères est de les rendre résistants aux nucléases présentes dans les fluides de l'organisme. En ce sens, ces modifications peuvent intervenir en amont de la constitution de la banque d'oligonucléotides ou après la sélection des aptamères spécifiques de la cible. Ces modifications chimiques permettent ainsi d'accroitre la demi-vie de ces molécules et d'en envisager un usage thérapeutique (Jayasena, 1999). L'annexe 3 reprend certaines des modifications chimiques des aptamères.

Un troisième type d'aptamère a été développé depuis quelques années. Il s'agit d'acide xéno-nucléique (XNA). Ces aptamères intègrent, à la place du ribose ou désoxy-ribose, une molécule dont le squelette ressemble à un glucide mais de nature synthétique (Herdewijn et Marlière, 2009). La possibilité de modifier la structure des constituants d'un acide nucléique préfigure le développement d'aptamères aux propriétés améliorées. En particulier, la modification de la structure phosphate-sucre pourrait permettre d'améliorer la

pharmacocinétique et la biodisponibilité de ces potentiels médicaments. (Darmostuk *et al.,* 2015).

3.3 Conclusion

Il est admis que les aptamères présentent certains avantages par rapport aux anticorps. En effet, ces oligonucléotides possèderaient une plus grande sélectivité et une plus grande affinité pour leur cible. Par ailleurs, leur synthèse est uniquement chimique, contrairement aux anticorps, ce qui assure, en général, une bonne capabilité à leurs procédés de production (Li *et al.,* 2014a). Par ailleurs, les aptamères s'avèrent *a priori* peu toxiques et peu immunogènes (Sundaram *et al.,* 2013). Enfin, pour tout aptamère médicament il existe par définition un antidote qui est sa séquence complémentaire (Darmostuk *et al.,* 2015).

TROISIEME PARTIE

MEDICAMENTS ANTITHROMBOTIQUES EN DEVELOPPEMENT

"*Laissez-moi vous indiquer un moyen*
qui ne serait certainement pas une Panacée,
mais dont l'efficacité m'inspire toute confiance"

Pr. Henri MONDOR
IN « PASTEUR » (1945)

1- PANOMARA DES ANTITHROMBOTIQUES EN DEVELOPPEMENT

1.1 Méthodologie

Citeline™ est une société issue de Informa plc, qui met à la disposition de ses abonnés une information complète et actualisée en temps réel concernant les molécules pharmaceutiques en cours de développement ou déjà commercialisées. Les informations qui y sont disponibles sont actualisées en temps réel et proviennent de différentes sources : littérature scientifique, rapports annuels d'activité et communiqués de presse des sociétés pharmaceutiques, articles de presse spécialisée, …

Cette société propose différents services, parmi lesquels figure PharmaProjects®. Cet outil est un moteur de recherche permettant d'interroger une base de données. Une recherche peut s'effectuer sur la base du nom d'une molécule, d'une pathologie voire d'une cible pharmacologique précise. Aussi, nous avons réalisé une recherche avec cet outil pour les médicaments antithrombotiques en cours de développement clinique. La requête permettant d'extraire la liste des molécules thrombotiques en cours de développement est présentée ci-après (figure 18) :

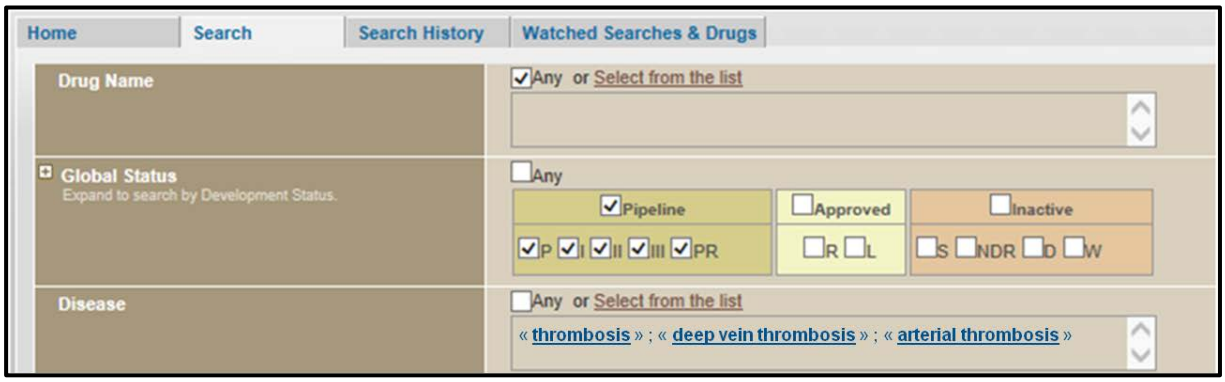


Figure 18 : Requête créée pour l'extraction de PharmaProjects d'une liste de molécules antithrombotiques en développement clinique

La liste de molécules obtenue nous permet de dégager des tendances générales quant aux cibles pharmacologiques des antithrombotiques en cours de développement (Citeline, 2015).

1.2 Résultats

La figure 19 présente les cibles antithrombotiques qui font actuellement l'objet du plus grand nombre d'essais cliniques. Notons d'abord que les médicaments antithrombotiques en cours de développement ciblent pour **45,5 %** la coagulation.

Parmi les principales cibles de la coagulation, citons le FXI, le FX, le FIX et la thrombine qui représentent respectivement 10 %, 9 %, 5 % et 5 % des cibles des molécules antithrombotiques en cours de développement. Les molécules antiplaquettaires représentent quant à elles **38,4 %** des antithrombotiques en cours de développement. Parmi ces cibles, les plus représentées, citons la glycoprotéine plaquettaire GPVI et le récepteur $P2Y_{12}$. Enfin, les thrombolytiques ne représentent que **19,1 %** de l'ensemble des antithrombotiques en cours de développement. Toutefois, les cibles sont peu innovantes car il s'agit du plasminogène ou du t-PA.

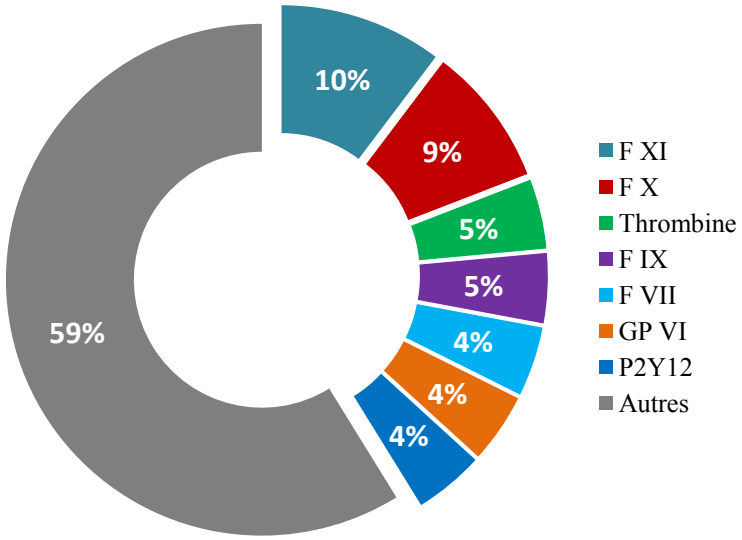


Figure 19 : Cibles antithrombotiques majoritairement exploitées pour les molécules en cours de développement clinique au 1er Août 2015

Ces tendances sont confirmées par certains auteurs. Les molécules antithrombotiques actuellement en développement ciblent majoritairement l'hémostase primaire et la coagulation, laissant de côté les thrombolytiques (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

La figure 20 présente la répartition des médicaments antithrombotiques selon leur stade de développement. Près de 50 % de ceux-ci sont actuellement en **phase I**, contre 16 % en **phase III**. Ces chiffrent témoignent du taux d'attrition auquel sont sujettes les molécules au cours du développement clinique. Les molécules détaillées par la suite en sont une bonne illustration et confirment ces tendances.

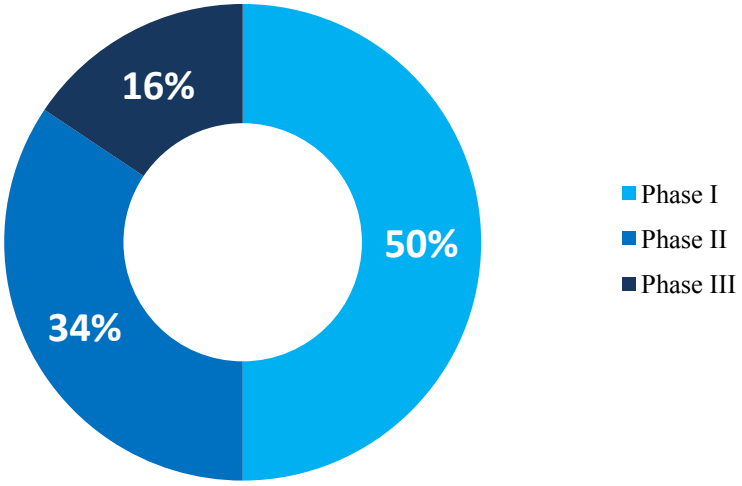


Figure 20 : Répartition des médicaments antithrombotiques selon leur stade de développement clinique au 1er Août 2015

Enfin, les molécules antithrombotiques actuellement en développement sont produites à 71 % par synthèse chimique (figure 21). Il s'agit principalement de composés de synthèse pure, mais également d'acides nucléiques (aptamères) et de peptides. Près de 26 % de ces molécules en cours de développement sont issues de procédés biotechnologiques, d'abord pour la synthèse de protéines recombinantes (16 %), mais également pour la synthèse d'anticorps monoclonaux.

Enfin, de manière très minoritaire (2 %) ces molécules proviennent de l'extraction de composés naturels d'origine animale ou fongique.

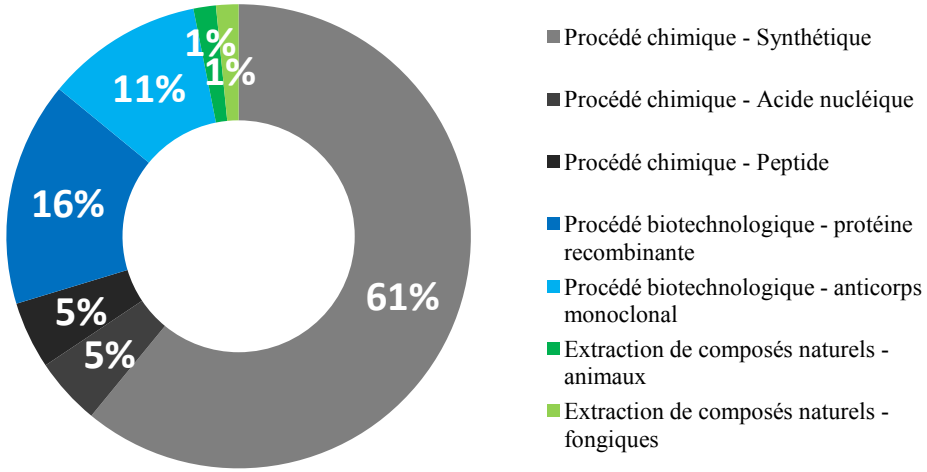


Figure 21 : Procédés d'obtention des molécules antithrombotiques en cours de développement clinique au 1er Août 2015

Nous attirons ici l'attention du lecteur sur l'annexe 6 de ce document qui reprend certains éléments règlementaires et méthodologiques quant à la réalisation des essais cliniques pour des médicaments en France. Cette annexe expose notamment l'enchaînement des différentes phases des essais cliniques avant l'obtention d'une AMM, ainsi que les objectifs de chacune de ces phases.

2- HEMOSTASE PRIMAIRE

2.1 Cibler le facteur von Willebrand

2.1.1 ARC1779

L'aptamère ARC1779 est développé par la société Archemix Corp™. Il est constitué de 39 nucléotides. Il possède un groupement de PEG de 20 kDa en 5' et est constitué à la fois d'ADN et d'ARN (figure 22). Il se lie au domaine A1 du vWF activé et empêche ainsi la liaison de ce domaine au récepteur GPIb plaquettaire. De fait, ARC1779 limite l'adhésion et l'agrégation plaquettaire (Sundaram *et al.,* 2013).

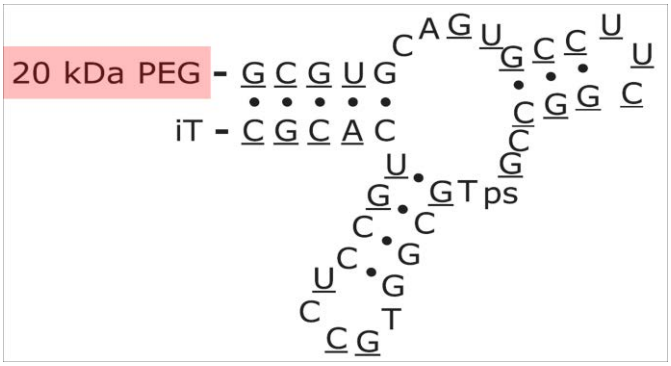


Figure 22 : Séquence de ARC1779 (Gilbert *et al.,* 2007)

La portion aptamérique de ARC1779 (13 kDa) est constituée de 40 ribo- et désoxyribo-nucléotides. En plus de l'ajout d'un motif PEG, ARC1779 est doté de 26 nucléotides présentant un groupement $–O-CH_3$ en 2', ainsi que d'une désoxythymidine inversée en 3' afin de rendre la molécule moins sensible aux nucléases. Enfin, ARC1779 présente un pontage phosphorothioate afin d'accroitre son affinité pour le vWF (Gilbert *et al.,* 2007).

Cette molécule pourrait trouver des indications comme antithrombotique chez les patients atteints de syndrome coronaire aigu, mais également dans certaines maladies de Willebrand, ou d'autres pathologies thrombocytaires impliquant le vWF (Sundaram *et al.,* 2013).

Les études précliniques effectuées sur ARC1779 ont montré une faible toxicité de ce dernier. Ceci s'explique par la forte spécificité de l'aptamère pour le vWF. De plus, ARC1779 présente un index thérapeutique suffisamment large pour permettre une action antiplaquettaire efficace sans effets indésirables tels que des hémorragies.

Suite à ces résultats précliniques encourageants, ARC1779 a fait l'objet d'un essai clinique de **phase I** afin d'en évaluer la sécurité, ainsi que les profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques chez 47 volontaires sains. Cet essai a mis en évidence des profils pharmacodynamiques et pharmacocinétiques dose-dépendants, et donc prévisibles, sans apparition d'effets secondaires.

Par la suite, les essais de **phase II** devaient permettre de déterminer la dose à administrer. La plupart de ces essais ont été arrêtés en cours d'investigation par manque d'inclusion ou sans raison évidente pour l'une de ces études. Par ailleurs, ARC1779 a fait l'objet d'un essai clinique de **phase II** chez des patients présentant une maladie von Willebrand de type 2B (Sundaram *et al.,* 2013).

Un essai de **phase II** randomisé, contre placebo et ayant inclut 36 patients, visait à évaluer la sécurité et l'efficacité de l'ARC1779 quant à l'apparition de signes emboliques cérébraux chez des patients bénéficiant d'une endartériectomie carotidienne. Malgré le faible nombre de patients inclus, l'étude conclut à une efficacité statistiquement significative de ARC1779 dans ce contexte. Toutefois, une augmentation de la survenue d'hémorragies péri-opératoires et d'anémies a été mise en évidence (Markus, McCollum et Imray, 2011).

A ce jour, ARC1779 n'a pas fait l'objet d'autres essais cliniques dans une indication antithrombotique. Dans un contexte non-opératoire, l'administration de ARC1779 ne semble pas accroitre le risque hémorragique chez des individus sains, ce qui ne semble pas être le cas dans certaines situations péri-opératoires. Par ailleurs, cet aptamère semble efficace pour limiter l'adhésion plaquettaire, et donc prévenir la thrombose artérielle. D'autres études sont à présent nécessaires pour établir la dose efficace, ainsi que pour déterminer dans quelle mesure cette molécule permet une réelle thromboprophylaxie artérielle. Il conviendra, enfin, d'évaluer le risque hémorragique dans un contexte non-opératoire avant de pouvoir espérer évaluer ARC1779 au cours d'un essai de **phase III** (Markus, McCollum et Imray, 2011).

L'ensemble des essais cliniques dont a fait l'objet l'ARC1779 comme antithrombotique sont présentés dans le tableau VI.

Tableau VI : Synthèse des essais cliniques évaluant l'ARC1779

TYPE D'ESSAI	REFERENCES DE L'ETUDE	METHODOLOGIE	OBJECTIFS	BRAS DE TRAITEMENT	EFFECTIFS	RESULTATS	REFERENCES
Phase I	NCT0043270	Essai randomisé en double-aveugle, contre placebo, à 5 concentrations (maximum = 3,7 mg/mL)	Evaluation de la sécurité à l'administration et des profils pharmacodynamique et pharmacocinétique de l'ARC1779 chez des volontaires sains	**Ratio 5 : 1** Bras 1 : bolus IV d'ARC1779 Bras 2 : placebo IV (NaCl à 0,9 %)	47	- inhibition plaquettaire dose-dépendante (saturation à partir de 0,3 mg/kg) - volume apparent de distribution relativement important (50 % de l'ARC1779 dans le plasma à la phase stationnaire) - élimination majoritairement non-rénale en 2 à 3 heures - bonne tolérance sans effet indésirable sévère - un cas d'hypersensibilité modérée à l'injection de l'ARC1779, sans séquelle	Gilbert *et al.*, 2007
Phase II	NCT00507338	Essai randomisé, en double-aveugle, en comparaison à l'Abciximab (REOPRO®)	Evaluation de la sécurité et de l'efficacité de l'ARC1779 chez des patients présentant un infarctus aigu du myocarde et bénéficiant d'une ICP	Bras 1 : dose faible d'ARC1779 (0,1 mg/kg) Bras 2 : dose moyenne d'ARC1779 (0,3 mg/kg) Bras 3 : dose élevée d'ARC1779 (1,0 mg/kg) Bras 4 : Abciximab	(prévu : 300)	- **étude interrompue** pour une raison inconnue : ouverture des inclusions en octobre 2007, clôture de l'étude en février 2008	Sundaram *et al.*, 2013
Phase II	NCT00726544	Essai randomisé, en double-aveugle, contre placebo, à doses croissantes	Evaluation de le sécurité et de l'efficacité de l'ARC1779 dans l'amélioration de l'état général de patients présentant une microangiopathie thrombotique, notamment au niveau cérébral, rénal et cardiaque.	Bras 1 : dose faible d'ARC1779 Bras 2 : dose moyenne d'ARC1779 Bras 3 : dose élevée d'ARC1779 Bras 4 : Placebo	(prévu : 100)	- **étude interrompue** en raison d'un trop faible nombre d'inclusions : ouverture aux inclusions en décembre 2008, clôture en novembre 2009	Sundaram *et al.*, 2013
Phase II	NCT00742612	Essai randomisé, en double-aveugle, contre placebo.	Evaluation de la sécurité et de l'efficacité de l'ARC1779 en termes d'embolies cérébrales chez des patients ayant subit une endartériectomie carotidienne	**Ratio 1 : 1** Bras 1 : bolus IV d'ARC1779 Bras 2 : placebo IV	36 (prévu : 100)	- **durée d'inclusion réduite** pour des raisons de financement de l'étude -Médiane de 83,6 minutes avant le premier signal embolique cérébral, contre 5,5 minutes avec le placebo - augmentation du nombre d'hémorragies péri-opératoires et des anémies avec l'ARC1779	Markus *et al.*, 2011

ICP : Intervention Coronarienne Percutanée

2.1.2 Caplacizumab

Caplacizumab (ABX-0403) est un anticorps bivalent humanisé, de demi-vie courte et dirigé contre le vWF. Il est développé par la société Ablynx NV pour la prévention de la formation de thrombus dans les vaisseaux où s'exercent de fortes forces de cisaillement. C'est notamment le cas dans les artères sténosées. Plus précisément, Caplacizumab était initialement développé pour le traitement du syndrome coronaire aigu, du purpura thrombotique thrombopénique (PTT) et de l'AVC. Il pourrait également être utilisé chez les patients bénéficiant d'une intervention coronarienne percutanée telle qu'une angioplastie (Bartunek *et al.,* 2013 ; Bartunek *et al.,* 2010).

Cet anticorps est en fait un « nanocorps » car il n'est composé que du domaine monomérique variable d'un anticorps. Il est fréquent d'observer des anticorps constitués d'une seule chaine lourde chez les *Camelidae*. Le concept de « nanocorps » (Nanobodies®) a été breveté par la société Ablynx NV.

Cette séquence est spécifique de l'antigène, ici le domaine A1 du vWF. Ce nanocorps inhibe donc les interactions entre le vWF, le collagène sous-endothélial et le récepteur GPIb des plaquettes. Par ce mécanisme, Caplacizumab empêche les premières étapes de formation d'un thrombus et en particulier de l'agrégation et l'adhésion plaquettaire (figure 23). Le domaine A1 du vWF est accessible au GPIb plaquettaire seulement lorsque celles-ci changent de conformation, notamment lorsqu'elles sont soumises à de fortes forces de cisaillement. Ainsi, Caplacizumab n'agirait que lorsque les forces de cisaillement artérielles sont importantes, ce qui assurerait sa spécificité d'action à un contexte thrombotique (Bartunek *et al.,* 2010 ; Bartunek *et al.,* 2013).

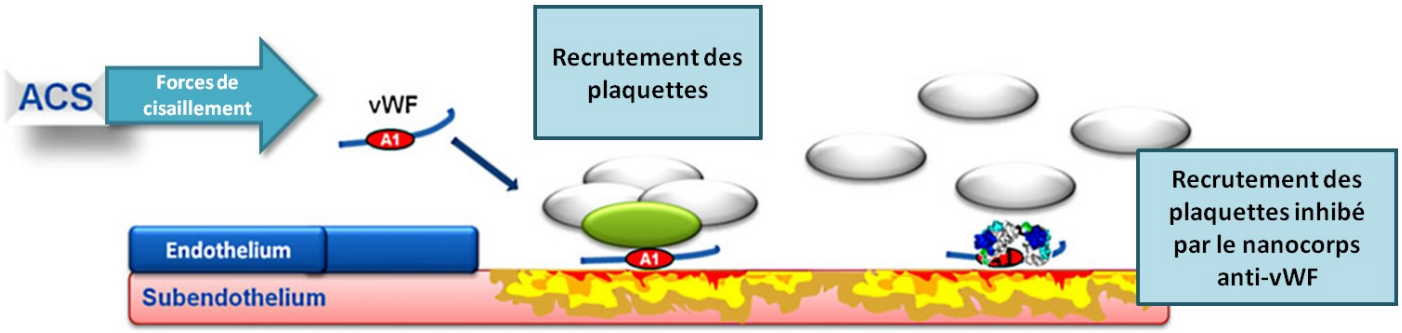


Figure 23 : Mode d'action du Caplacizumab (Bartunek *et al.,* 2013)
ACS : Syndrome Coronaire Aigu

La taille du Caplacizumab (15 kDa) est dix fois inférieure à celle d'un anticorps « entier » (150-160 kDa). Cette caractéristique l'autorise à pénétrer plus facilement dans les tissus, et il est plus stable à des pH et des températures extrêmes. Il est administré en bolus par voie IV ou par voie sous-cutanée (Bartunek *et al.,* 2010 ; Bartunek *et al.,* 2013).

Ce nanocorps a fait l'objet de trois essais de **phase Ia** visant à évaluer la sécurité à l'administration et la tolérance de cette molécule chez des volontaires sains. Ces études ont inclus respectivement 24, 36 et 40 volontaires sains. Ces études randomisées ont été réalisées en double-aveugle, contre placebo. Il a été administré en plusieurs doses, ou en dose unique, par voie IV ou sous-cutanée (Moses et Allan, 2010 ; Bartunek *et al.,* 2010 ; De Meyer *et al.,* 2012).

A ces études s'ajoutent deux essais de **phase Ib** ayant inclus respectivement 22 et 25 patients bénéficiant d'une intervention coronaire percutanée dans un contexte de syndrome coronaire aigu ou d'angor instable. Ces essais ont également permis de mettre en évidence la bonne tolérance de ce traitement, sans épisode hémorragique sévère ni effet indésirable. L'efficacité antiagrégante du traitement a été démontrée. Aucun anticorps dirigé contre Caplacizumab n'a été mis en évidence pour l'ensemble des patients (Moses et Allan, 2010 ; Bartunek *et al.,* 2010 ; De Meyer *et al.,* 2012).

Le profil pharmacocinétique montre une action rapide et prévisible selon la dose. Seules les molécules de Caplacizumab liées au vWF restent présentes dans la circulation sanguine jusqu'à leur élimination. La demi-vie est de 10 à 30 heures. Les nanocorps excédentaires, c'est-à-dire ceux non liés au vWF, sont rapidement éliminés par voie rénale. L'efficacité antiagrégante de cette molécule a pu être mise en évidence à l'aide d'un test d'agrégation plaquettaire induit par la ristocétine (Bartunek *et al.,* 2010 ; Bartunek *et al.,* 2013) .

L'étude TITAN est un essai de **phase II** randomisé, multicentrique, en double-aveugle et contre placebo, visant à évaluer l'efficacité et la sécurité à l'administration de Caplacizumab chez 75 patients atteints de purpura thrombotique thrombopénique (PTT). Le vWF étant impliqué dans la physiopathologie du PTT, l'administration du Caplacizumab devrait s'avérer efficace, en complément de la plasmaphérèse habituellement indiquée. Pour les patients n'appartenant pas au bras de traitement du placebo, le Caplacizumab est injecté en bolus IV par dose unique de 10 mg avant la plasmaphérèse, puis une à deux fois par jour par voie sous-cutanée. Le suivi des patients inclus dure une année (Holz, 2012). Cet essai a montré que les patients bénéficiant du traitement par Caplacizumab en plus de la plasmaphérèse, étaient deux fois plus nombreux à obtenir une normalisation de leur numération plaquettaire au bout de 30 jours, comparativement au groupe placebo. La normalisation de la numération plaquettaire constituait le critère principal d'évaluation. Par ailleurs, cette normalisation était atteinte plus rapidement dans le groupe recevant Caplacizumab (3 jours) comparativement au groupe recevant le placebo (4,9 jours).

De plus, 81 % des patients ayant reçu ce nouveau traitement ont présenté une rémission complète, contre 46 % dans l'autre bras de traitement. Les exacerbations de la thrombopénie étaient moins fréquentes avec le nanocorps. Toutefois, Caplacizumab a induit 66 épisodes hémorragiques contre 35 avec placebo. Étonnamment, l'étude conclut à une tolérance satisfaisante, avec des effets indésirables qui peuvent être pris en charge (Bartunek *et al.,* 2013 ; Moses *et al.,* 2014).

Un essai de **phase III** évaluant le rapport bénéfice/risque de Caplacizumab chez des patients présentant un purpura thrombopénique thrombotique devrait débuter au second semestre de 2015 et se terminer fin 2017 (Moses *et al.,* 2014).

Le bilan d'activité de la société Ablynx pour l'année 2014 indiquait que la preuve de concept avait été faite pour Caplacizumab dans le traitement du PTT. D'ailleurs, ce dernier a obtenu le statut de médicament orphelin pour l'Union Européenne (EMA) et les Etats-Unis (FDA) en 2009. Ablynx espère que ce statut permettra d'accélérer les processus d'autorisation

de mise sur le marché, au vu des résultats obtenus lors de l'essai de phase II TITAN (Ablynx NV, 2014 ; Moses *et al.,* 2014).

La société Ablynx annonçait en juin 2012 espérer obtenir une AMM pour Caplacizumab pour l'Union Européenne en 2018, une fois l'essai de **phase III** terminé. (Ablynx NV, 2014)

2.1.3 AJW200

Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé (IgG4), dirigé contre le vWF. Contrairement à Abciximab (REOPRO®), AJW200 inhibe spécifiquement l'adhésion et l'agrégation plaquettaire déclenchée par de fortes forces de cisaillement, et ce de manière dose-dépendante. Ceci a été démontré sur des thrombocytes de 4 donneurs volontaires sains. De plus, les profils pharmacodynamiques et pharmacocinétiques de cet anticorps ont été établis chez le macaque (*Cynomolgus*) (Kageyama *et al.,* 2002).

AJW200 inhibe l'agrégation et l'adhésion plaquettaire, ainsi que la génération de thrombine induite par le vWF. Ce dernier se lie au domaine A1 du vWF, tout comme Caplacizumab (Lapchak *et al.,* 2013). Il empêche donc la liaison du vWF au GPIb plaquettaire (De Meyer *et al.,* 2012).

Développé par la société Ajinomoto, AJW200 n'a plus fait l'objet d'essai clinique depuis un essai de phase I qui s'est déroulé au Japon et au Royaume-Uni en 2003. L'anticorps a présenté une bonne tolérance, sans épisode hémorragique sévère recensé (De Meyer *et al.,* 2012).

2.2 Antagonistes du récepteur GPIb plaquettaire

En 1724, les médecins de Saragosse adressaient à leurs confrères montpelliérains la question suivante : « *Vaut-il mieux pour préparer la thériaque, faire cuire des vipères dans du sel et de l'aneth […], et quoi est le mode qui donne une thériaque plus énergique* ? » (Flahaut, 1998). Trois siècles plus tard, le venin d'une vipère a permis de mettre au point Anfibatide, une molécule antithrombotique qui fait actuellement l'objet d'essais cliniques

Anfibatide (DECLOTANA®) est une molécule antithrombotique développée par la société chinoise Lee's pharmaceutical. Administrée par voie IV, cette molécule pourrait trouver une indication dans la thromboprophylaxie de patients atteints de syndrome coronaire aigu, ou devant bénéficier d'une intervention coronarienne percutanée (Fung, 2012 ; Fung, 2014 ; Lei *et al.,* 2014).

Anfibatide dérive du venin d'un serpent, *Agkistrodon acutus*. La substance extraite de ce venin, appelé agkisacucétine, est un antagoniste de GPIb, c'est-à-dire une protéine de type C lectine-*like* qui dérive du complexe protéique de l'agglucétine (Li *et al.,* 2015). Elle présente une structure de type *Snaclec* (***Sna***ke venom ***C***-type ***lec***tins), c'est-à-dire une structure hétéro-dimérique formée de deux sous-unités α et β liées entre elles par un pont disulfure. Les Snaclecs se lient à une grande diversité de facteurs de coagulation ainsi qu'à d'autres protéines intervenant dans la coagulation (Kini *et al.,* 2010).

Il s'agit, historiquement, du premier antithrombotique développé pour cibler la GPIb plaquettaire (Lei *et al.,* 2014 ; Li *et al.,* 2015). Les études *in vitro* ont permis de montrer que Anfibatide inhibait fortement l'agrégation et l'adhésion plaquettaire induite par la ristocétine chez la souris. De plus, des expériences *ex vivo* ont permis de montrer que Anfibatide inhibait

l'adhésion plaquettaire ainsi que la formation d'un thrombus. De même, cette molécule a été testée avec un modèle canin d'angor instable. Il a été montré que Anfibatide prolonge moins le temps de saignement de ces animaux que les antagonistes de GPIIb/IIIa (Fung, 2012 ; Fung, 2014).

Anfibatide a fait l'objet d'un essai de **phase I** randomisé, contre placebo, qui inclut 94 patients. Ces derniers se voyaient administrer une ou plusieurs doses d'Anfibatide, selon le bras de traitement. Cet essai a permis de conclure favorablement quant à la tolérance et la sécurité à l'administration de ce produit. Aucun effet indésirable grave, ni épisode hémorragique sévère n'a été observé au cours de l'essai. Aucun patient n'a développé de réaction allergique et aucun anticorps dirigé contre la molécule n'a été mis en évidence. Les paramètres biologiques hématologiques et biochimiques n'ont pas été significativement perturbés. L'ECG et la pression sanguine artérielle de ces volontaires sains sont restés inchangés (Hou *et al.,* 2013).

Cette molécule antithrombotique a également fait l'objet d'essais cliniques de **phase II**. L'inclusion de 90 patients pour un essai de phase IIa (NCT01585259) s'est terminée à la fin de l'année 2014 ainsi que l'indiquait la firme Lee's pharmaceutical dans un communiqué de presse daté du 12 novembre 2014. Il s'agit d'un essai multicentrique, en double-aveugle, à doses multiples, contre placebo. Cette étude a pour objectif d'évaluer la sécurité, l'efficacité, et la tolérance de Anfibatide chez des patients qui vont bénéficier d'une intervention coronarienne percutanée et ayant présenté un IDM sans accroissement du segment ST (Fung, 2014).

L'étude ayant débuté en juillet 2013, les résultats sont aujourd'hui connus et ils semblent encourageants pour l'essai de **phase IIb** et la future **phase III**. Cet essai de phase IIb devrait constituer la preuve de concept (Fung, 2014). A ce jour, Anfibatide ne fait pas encore l'objet d'essais de phase IIb ou de phase III. En tant que première molécule antithrombotique développée pour cibler la GPIb plaquettaire, son avenir thérapeutique déterminera celui de toute une classe pharmacologique.

D'autres molécules ciblant le GPIb sont actuellement en cours de développement. C'est le cas du h6B4-Fab, un anticorps monoclonal humanisé qui fait actuellement l'objet d'études précliniques (Yeung et Holinstat, 2012).

2.3 Antagonistes du récepteur au thromboxane A_2

2.3.1 Terutroban

Terutroban ou S 18886 (figure 24) est un antagoniste sélectif du récepteur au TxA_2 (et au PGG_2 et PGH_2). Il s'agit d'un dérivé du tétrahydro-naphtalène (Hong *et al.,* 2006). Il est à la fois un antiagrégant plaquettaire, un inhibiteur de la vasoconstriction, et il réduit le risque de la survenue d'athérothrombose. Développé par la société Servier, cet antiplaquettaire inhibe l'activation des plaquettes ainsi que leur agrégation lorsqu'elles sont activées. Le pic de concentration plasmatique de Terutroban est obtenu au bout d'une à deux heures après administration. Il s'agit d'un composé administré par voie *per os* (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

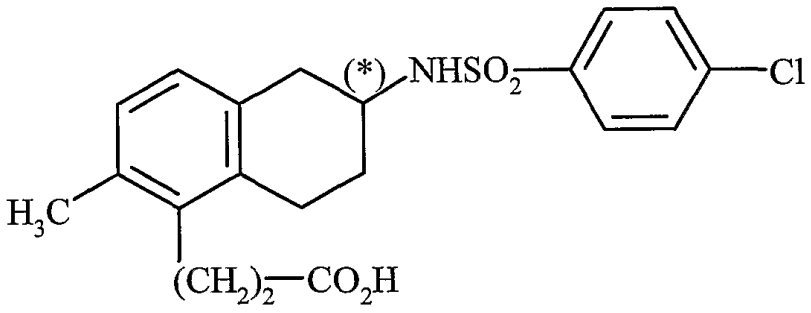


Figure 24 : Formule de Terutroban (Bousser *et al.,* 2011)

Terutroban inhibe l'agrégation plaquettaire de manière dose-dépendante. L'inhibition maximale est obtenue pour une concentration plasmatique supérieure à 10 $ng.mL^{-1}$, ce qui correspond à des doses journalières de 10 à 30 mg.

Contrairement à l'aspirine, l'action de Terutroban est réversible. Par ailleurs, ce dernier possède des propriétés anti-athérosclérotiques indépendamment de son rôle antagoniste des récepteurs au TxA_2. Ce rôle pourrait s'expliquer par l'inhibition de récepteurs aux éicosanoïdes par Terutroban (Fiessinger *et al.,* 2010).

Les études précliniques sur Terutroban ont montré que l'administration de cette molécule chez un modèle canin d'IDM diminuait de manière significative et dose-dépendante le temps d'occlusion par le thrombus. De même, un effet antiagrégant plaquettaire a été démontré *ex vivo* à l'aide d'acide arachidonique et de U46619[2]. Terutroban ne permet cependant pas de diminuer le volume infarci de manière significative (Hong *et al.,* 2006). Ce composé a, par la suite, fait l'objet d'au moins un essai clinique de **phase I** promu par la société Servier entre 1999 et 2000, mais pour lequel aucune littérature scientifique n'est disponible. Cet essai est seulement évoqué dans les publications scientifiques relatives aux essais cliniques qui ont suivi (Lloyd *et al.,* 2015).

Un essai de **phase II** inclut 20 patients présentant de l'athérosclérose. Ces patients étaient habituellement traités par une dose journalière de 100 mg d'aspirine. Il s'agissait d'un essai en double aveugle, randomisé, contre placebo, dans lequel le premier bras (n = 12) recevait une unique dose de 10 mg de Terutroban en plus de l'aspirine, et le second un placebo et l'aspirine. L'étude conclut à une vasodilatation significativement augmentée après l'administration de Terutroban, comparativement au groupe de patients ayant reçu le placebo (Belhassen *et al.,* 2003). Notons qu'ici, Terutroban n'est pas administré comme antiplaquettaire mais plutôt pour limiter la vasoconstriction. En effet, le TxA_2 favorise la vasoconstriction. Antagoniser ses récepteurs permet ainsi de limiter la vasoconstriction d'artères où a pu se développer l'athérosclérose.

Plus tard, un essai de **phase IIb** intitulé TAIPAD (*Thromboxane Antagonism In Peripheral Arterial Disease*), a été mené dans huit pays. Il s'agissait d'un essai randomisé, en double-aveugle visant à évaluer l'efficacité de cinq doses de Terutroban contre l'aspirine et contre placebo, chez des patients atteints d'artérite oblitérante (n = 435). Les bras de

[2] Il s'agit d'un analogue synthétique de la prostaglandine PGH_2 qui est un agoniste des récepteurs au TxA_2

traitement de Terutroban correspondaient à des doses de 1 à 30 mg par jour. L'agrégation plaquettaire était ensuite évaluée *ex vivo*, à l'aide de U46619. A partir du cinquième jour de traitement, quelle que soit la dose de Terutroban, l'agrégation plaquettaire pour ce bras de traitement était significativement diminuée par rapport au bras placebo, et ce de manière dose dépendante. Par ailleurs, l'effet antiagrégant de Terutroban était au moins aussi important que celui observé pour l'aspirine, que l'agrégation soit déclenchée *ex vivo* par l'acide arachidonique, du collagène ou de l'adénosine diphosphate. Terutroban a été bien toléré, avec un profil de sécurité semblable à celui de l'aspirine (Fiessinger *et al.,* 2010).

Deux autres essais de **phase II** ont été menés pour Terutroban. Le premier visait à évaluer les profils pharmacocinétique et pharmacodynamique de cette molécule chez des patients présentant une artériopathie périphérique. Il visait également à définir la plus faible dose de Terutroban permettant d'obtenir un effet antiagrégant cliniquement suffisant, c'est-à-dire une inhibition de plus de 87 % de l'agrégation plaquettaire. Ainsi, la dose de 30 mg/jour a été retenue pour l'essai de phase III (Gaussem *et al.,* 2005).

Le dernier essai de **phase II** dont ait fait l'objet Terutroban incluait des patients ayant présenté un événement ischémique non cérébral et étant traités, à ce titre, par aspirine. Cette étude visait à évaluer l'activité antithrombotique, antiagrégante et endothéliale de Terutroban. Pour les dix premiers jours de traitement, les auteurs estiment que Terutroban est plus efficace que l'aspirine (Bal Dit Sollier *et al.,* 2009).

Enfin, un essai de **phase III** inclut 19 119 patients dans le monde. Il s'agissait de l'étude PERFORM (*Prevention of cerebrovascular and cardiovascular Events of ischemic origin with teRutroban in patients with history oF ischemic strOke or tRansient ischeMic attack*). Cette étude mondiale est la seconde plus importante pour l'évaluation d'une molécule indiquée dans la prévention secondaire de l'AVC. Cette étude pivot visait à mettre en évidence la supériorité de Terutroban sur l'aspirine, dans la prévention secondaire d'événements thrombotiques pour des patients ayant présentés des événements ischémiques cardiovasculaires ou vasculaires-cérébraux. Les résultats de cette étude n'ont pas permis de montrer la supériorité de Terutroban sur l'aspirine, cette dernière restant, selon les auteurs, le *Gold Standard* des antiplaquettaires indiqués dans la prévention secondaire des AVC (Bousser *et al.,* 2009a ; Bousser, *et al.,* 2009b ; Bousser *et al.,* 2011).

Les auteurs s'étonnent de tels résultats, dans la mesure où les précédentes phases d'essais cliniques ont permis de montrer la non-infériorité de Terutroban sur l'aspirine comme antiplaquettaire chez des patients présentant une artériopathie périphérique ou un AVC. Par ailleurs, Terutroban présente des propriétés vasodilatatrices et anti-athérosclérose que ne présente pas l'aspirine (Bousser *et al.,* 2011).

D'autres auteurs émettent certaines hypothèses quant à l'échec de cet essai de phase III. Par exemple, la dose de Terutroban choisie pourrait ne pas être suffisante pour montrer l'efficacité clinique du composé. Cependant, l'augmentation de la dose s'accompagne de l'accroissement du risque hémorragique, ce dernier étant positivement corrélé au nombre de récepteurs au TxA_2 auquel Terutroban se lie (Lee et Ovbiagele, 2011).

L'ensemble des essais cliniques dont Terutroban a fait l'objet à ce jour sont présentés dans le tableau VII.

Tableau VII : Synthèse des essais cliniques évaluant le Terutroban (S18886)

TYPE D'ESSAI	REFERENCES DE L'ETUDE	METHODOLOGIE	OBJECTIFS	BRAS DE TRAITEMENT	EFFECTIFS	RESULTATS	REFERENCES
Phase II	-	Essai randomisé, en double-aveugle, contre placebo	Evaluation de l'efficacité de Terutroban sur la vasodilatation artérielle, chez des patients habituellement traités par aspirine (100 mg/jour) pour artériopathie athérosclérotique	Bras 1 : dose unique de 10 mg de Terutroban + aspirine Bras 2 : placebo + aspirine	20	- Mise en évidence de l'action vasodilatatrice de Terutroban en tant qu'antagoniste des récepteurs au TxA_2 - Vasodilatation significativement augmentée avec l'administration de Terutroban comparativement au bras 2	Belhassen *et al.,* 2003
Phase IIb	TAIPAD	Essai randomisé, en double-aveugle, évaluant 5 doses de Terutroban contre l'aspirine et contre placebo	Evaluation *ex vivo* de l'agrégation plaquettaire après 5 jours de traitement par Terutroban, et de son profil de sécurité chez des patients présentant des artérites oblitérantes	Bras 1 : 5 doses de Terutroban (1 à 30 mg/jour) Bras 2 : Aspirine à 75 mg/jour Bras 3 : Placebo les 5 premiers jours, puis Terutroban	435	- Diminution dose-dépendante de l'agrégation plaquettaire *ex vivo* après 5 jours de traitement quel que soit la dose de Terutroban, et de manière significative par rapport au placebo - Effet antiagrégant plaquettaire au moins égal à celui de l'aspirine - Episodes hémorragiques chez 5,4 % des patients sous Terutroban vs. 9,8 % pour ceux sous aspirine - Inhibition > 80 % durant 24 heures pour les doses de Terutroban de 10 à 30 mg/jour	Fiessinger *et al.,* 2010
Phase II	-	Essai multicentrique, en double-aveugle, randomisé, évaluant 5 doses de Terutroban	Evaluation des profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques deTerutroban et évaluation de l'effet antiagrégant plaquettaire *ex vivo* chez des patients présentant un artériopathie périphérique. Détermination de la dose minimale efficace pour la phase III	Période de *wash-out* de 10 jours (placebo), puis cinq doses de Terutroban (de 1 à 30 mg) pendant 12 semaines	30	- Cinétique linéaire de Terutroban, avec un pic plasmatique 1 heure après administration, et une demi-vie de 6 à 10 heures - Pas d'accumulation du composé dans le plasma à l'issue de l'ensemble des administrations -Existence d'une corrélation entre le niveau plasmatique de Terutroban et le degré d'inhibition de l'agrégation plaquettaire - Un niveau cliniquement efficace d'inhibition de l'agrégation plaquettaire est obtenu pour une concentration plasmatique de Terutroban de 10 $ng.mL^{-1}$	Gaussem *et al.,* 2005
Phase II	-	Essai en double-aveugle, randomisé, contre l'aspirine et le clopidogrel, sur une période de 10 jours	Evaluation de l'activité antithrombotique, antiplaquettaire et endothéliale de Terutroban chez des patients traités par aspirine en prophylaxie d'un AVC.	Bras 1 : Terutroban (10 mg/jour) Bras 2 : Aspirine (300 mg/jour) Bras 3 : Terutroban 10 mg/jour + aspirine (300 mg/jour) Bras 4 : Clopidogrel 75 mg/jour + aspirine 300 mg/jour	48	- Terutroban seul ou en association diminue significativement la taille du thrombus au bout de 10 jours. Après 10 jours, le Terutroban est moins efficace que l'aspirine seule. - Des résultats semblables sont observés pour l'effet antiagrégant plaquettaire - Terutroban présente un bon profil de sécurité et une bonne tolérance comparativement à l'aspirine et au clopidogrel	Bal dit Sollier *et al.,* 2009
Phase III	PERFORM	Essai randomisé, multicentrique, en double-aveugle, contre l'aspirine (100 mg/jour)	Evaluation de la supériorité de Terutroban (30 mg/jour) et de son efficacité contre l'aspirine en prévention secondaire chez des patients ayant présenté des événements ischémiques cérébrovasculaires ou cardiovasculaires. Suivi pendant 28 mois.	Bras 1 : Terutroban (30 mg/jour) Bras 2 : Aspirine (100 mg/jour)	19 119	-Pas de supériorité de Terutroban dans la prévention d'AVC, d'IDM ou de tout autre événement ischémique entrainant le décès (11 % dans les deux bras de traitement) -Plus d'épisodes hémorragiques avec Terutroban qu'avec l'aspirine (resp. 12 % vs. 11 %) -Pas de différence significative concernant le profil de sécurité entre les deux molécules	Bousser *et al.,* 2009a Bousser *et al.,* 2009b Bousser *et al.,* 2011 Lee et Obviagele 2011

2.3.2 Picotamide

Ce composé inhibe à la fois le récepteur au TxA_2, mais également l'enzyme thromboxane synthétase. Il s'agit d'un dérivé de l'acide méthoxy-isophtalique (figure 25). Contrairement à l'acide acétylsalicylique, Picotamide n'inhibe pas les cyclooxygénases (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

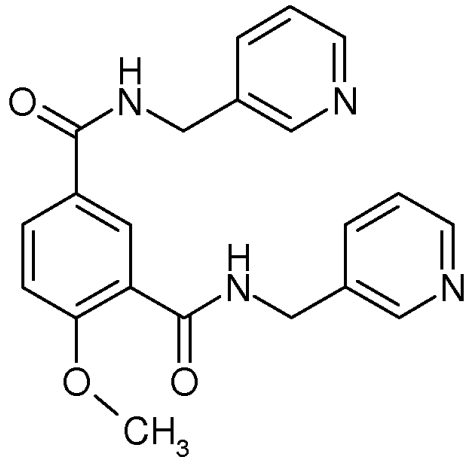


Figure 25 : Formule de Picotamide (Balsano et Violi, 1993)

Picotamide a fait l'objet d'un essai de **phase III**, en double-aveugle contre placebo, incluant 2 304 patients atteints d'artériopathie périphérique. Il s'agissait de l'essai ADEP (*Atherosclerotic Disease Evolution by Picotamide*). Les patients recevaient soit une dose de 300 mg de Picotamide, soit un placebo. Le suivi de ces patients durait 18 mois. Le critère principal d'évaluation de l'étude était la survenue d'un événement cardiovasculaire mineur (angor instable, attaques ischémiques transitoires, hypertension, …) ou majeur (décès d'étiologie cardiovasculaire, IDM, AVC,…). L'analyse en intention de traiter montre une diminution de 18,9 % de la survenue de ces événements dans le bras recevant Picotamide. Toutefois, ces résultats ne s'avèrent pas statistiquement significatifs. Par ailleurs, le risque hémorragique était équivalent dans les deux groupes (Balsano et Violi, 1993).

Une analyse post-hoc de cette étude, s'intéressant plus particulièrement aux patients diabétiques (type II) inclus permet de mettre en évidence une diminution de 45,2 % de la survenue de ces événements. En effet, les patients diabétiques présentent souvent des angiopathies du fait de la glycation des protéines plasmatiques, aboutissant à des complications cardiovasculaires, et notamment un taux plus important d'IDM que dans la population générale. Chez le patient diabétique, Picotamide réduit la progression de l'athérosclérose artérielle. Par ailleurs, le composé diminue les microalbuminuries induites par l'exercice physique, et il améliore la microcirculation de patients présentant des microangiopathies, comparativement à l'aspirine. D'ailleurs, il semble que les propriétés antiplaquettaires de l'aspirine soient moins efficaces chez les patients diabétiques que chez les non diabétiques (Milani, Longoni, et Maderna, 1996).

Ces observations ont permis de réaliser un essai de **phase III**, randomisé, comparant Picotamide (600 mg deux fois par jour) et l'aspirine (320 mg/jour) chez 1 209 patients diabétiques présentant une artériopathie périphérique. Après deux ans d'étude, cet essai n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative entre les deux groupes

concernant la mortalité (respectivement 3,0 % et 5,5 %) et la morbidité cardiovasculaire (respectivement 7,1 % et 8,7 %) (Neri Serneri *et al.,* 2004).

Certains auteurs estiment que d'autres études cliniques doivent être menées afin de positionner Picotamide dans l'arsenal thérapeutique des antithrombotiques indiqués pour les patients diabétiques (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

2.3.3 Z-335

Z-335 est également un antagoniste du récepteur au TxA_2, développé par des équipes de recherche indiennes (figure 26). Lors d'essais précliniques, Z-335 a montré un effet antiagrégant prolongé sans pour autant augmenter le risque hémorragique (Tanaka *et al.,* 1998).

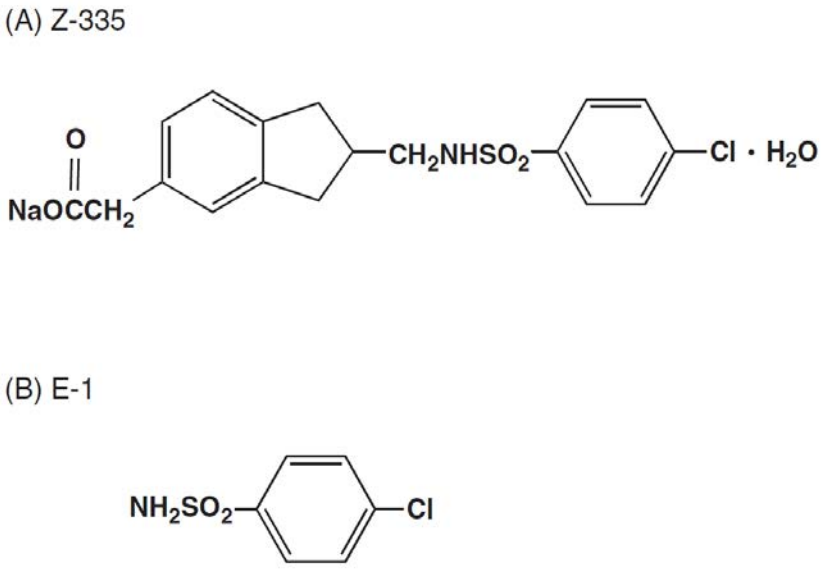


Figure 26 : Formule du Z-335 (A) et de son métabolite (B) (Matsuno *et al.,* 2002)

Administré oralement, cet antiplaquettaire a fait l'objet d'un essai de **phase I** chez six volontaires sains. Cet essai visait à évaluer le profil de sécurité de cette molécule, ainsi qu'à en confirmer le mécanisme d'action et les propriétés pharmacocinétiques. Z-335 a été évalué à plusieurs doses et contre placebo. Le pic plasmatique chez l'Homme est obtenu deux heures après administration. La réversibilité totale de l'effet est atteinte au bout de 48 heures (Matsuno *et al.,* 2002). A ce jour, Z-335 n'a pas fait l'objet d'autres essais cliniques.

2.3.4 Synthèse

La figure 27 synthétise l'ensemble des molécules antithrombotiques en développement qui ciblent la voie du TxA_2 qui sont présentées dans ce document. L'aspirine et les AINS, en tant qu'inhibiteurs de COX, y figurent également.

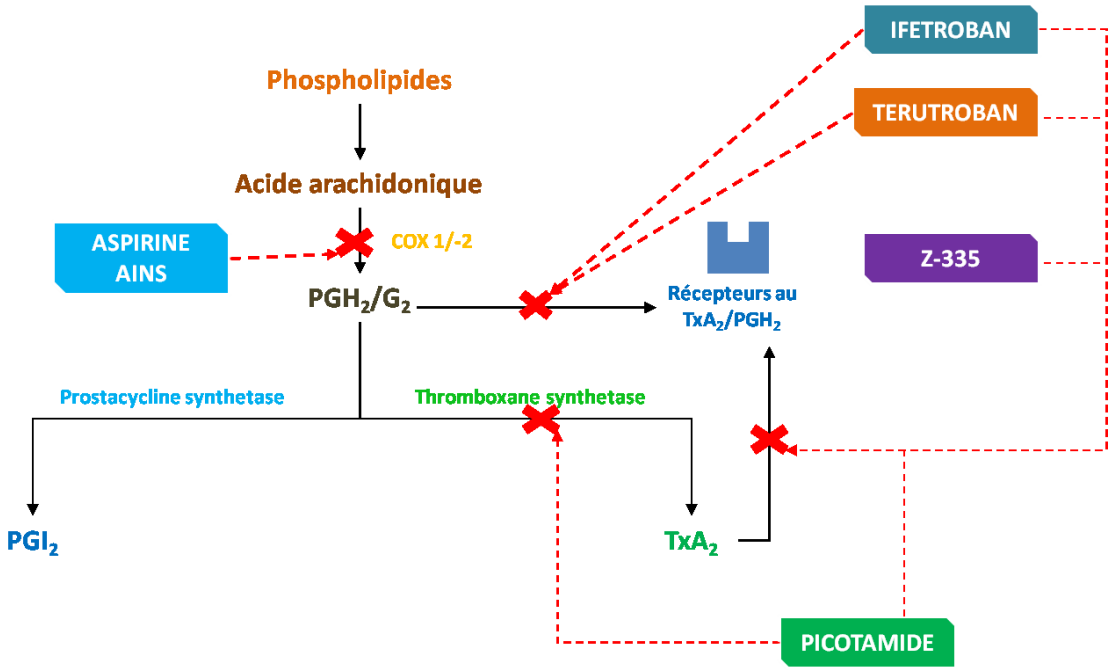


Figure 27 : Synthèse des antiplaquettaires ciblant la voie du TxA_2
(d'après Rosenfeld *et al.,* 2001 ; Matsuno *et al.,* 2002 ; Bousser *et al.,* 2009 ; Weitz *et al.,* Samama, 2012)

Nous faisons présentons en figure 27, l'Ifetroban sodique. Cette molécule a été développée par la société BMS (Bristol-Myers Squibb). Il s'agit d'un dérivé de l'acide benzopropanoïque qui antagonise les récepteurs au TxA_2 et aux prostaglandines. Cette molécule a fait l'objet de différents essais cliniques, dont un essai de **phase I** chez 63 volontaires sains. Cet essai a permis de montrer que l'administration de cette molécule induisait un doublement du temps de saignement. Le pic plasmatique est atteint rapidement après administration, avec une action rapide et prolongée. Cette molécule n'a pas présenté d'activité antithrombotique suffisante à faible dose, en revanche elle est plus efficace pour la réduction de la taille d'un thrombus que l'aspirine ou l'hirudine (Rosenfeld, Grover et Stier, 2001).

En 2011, BMS cède le développement de cette molécule à Cumberland Pharmaceuticals qui repositionne celle-ci dans le traitement du syndrome hépatorénal. L'Ifetroban fait actuellement l'objet d'un essai de **phase II** dans cette indication (NCT01436500).

2.4 Bloquer le récepteur EP_3

DG-041 (figure 28) est un inhibiteur du récepteur EP_3. Il empêche la liaison à la PGE_2 censée rendre les plaquettes plus sensibles à leurs activateurs que sont l'ADP, la thrombine et le TxA_2 (Tilly *et al.,* 2014). Cette molécule est développée par deCODE genetics (Amgen). Elle est administrée *per os* pour la thromboprophylaxie artérielle périphérique.

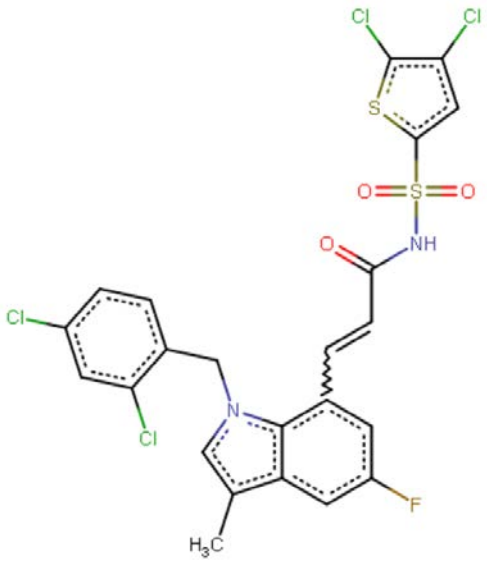


Figure 28 : Formule de DG-041 (PharmaProjects, 2009)

Un modèle de souris déficientes en EP_3 ne présente statistiquement pas plus de risque hémorragique que des souris saines. Par ailleurs, DG-041 inhibe, *ex vivo*, l'agrégation de plaquettes humaines induite par le PGE_2 de manière dose-dépendante (Tilly *et al.,* 2014).

Cette molécule a fait l'objet d'un essai de **phase I** qui incluait 196 volontaires sains. Il a été montré une réduction de l'agrégation plaquettaire dose-dépendante pour l'administration de doses de DG-041 allant jusqu'à 1 600 mg/j, durant 7 jours. Le temps de saignement n'était pas significativement modifié. La tolérance a été bonne pour toutes les doses (deCODE genetics, 2005 ; Farmer et Bessenger, 2006).

Un autre essai de **phase I** incluait 54 volontaires pour l'administration de DG-041 à doses croissantes (50 à 200 mg). L'agrégation plaquettaire était partiellement inhibée sans prolonger le temps de saignement des volontaires. Ici aussi la tolérance a été bonne, sans effet indésirable sévère (deCODE genetics, 2005 ; deCODE genetics, 2007).

En 2007, DG-041 fait l'objet d'un essai de **phase IIa** randomisé, en double-aveugle, contre placebo chez 144 patients présentant une claudication intermittente. La claudication peut être un symptôme d'une artériopathie de type athérosclérose. L'objectif de l'étude était d'évaluer la sécurité et la tolérance de cette molécule. Cette dernière a permis de diminuer certains biomarqueurs de l'inflammation de manière dose-dépendante (CRP, MCP1, sICAM) et d'améliorer le retour veineux des membres inférieurs. De plus, DG-041 a inhibé l'activation et l'agrégation plaquettaire de manière concentration-dépendante. Dans un second essai de **phase II** qui inclut des patients atteints d'artériopathies, DG-041 co-administré avec Clopidogrel ou l'aspirine a prouvé son efficacité comme antiplaquettaire, sans pour autant prolonger le temps de saignement des patients (deCODE genetics, 2007 ; PharmaProject, 2009).

Le développement clinique du DG-041 a été interrompu en 2009 en raison de la faillite de la société deCODE genetics. Aujourd'hui, celle-ci a été rachetée par Amgen (Schaffer, 2012) et le développement de ce composé semble avoir repris comme en témoigne un récent article de Tilly *et al.,* paru en 2014 et qui consistait en une étude pré-clinique de DG-041 réalisée avec un modèle murin. Notons que certains auteurs de cet article sont d'anciens collaborateurs de la société deCODE genetics.

2.5 Antagoniser le récepteur PAR-1

Développer des antagonistes du PAR-1 a été un réel défi. En effet, ce récepteur présente un mécanisme d'autoamplification, et les antagonistes entrent en compétition avec la thrombine qui possède un avantage stérique sur ceux-ci. Par ailleurs, une seule molécule de thrombine est capable de cliver plusieurs récepteurs. Aussi, différentes approches de molécules antithrombotiques ciblant le récepteur PAR-1 ont été conçues parmi lesquelles (French *et al.,* 2014) :

- les **peptidomimétiques** de la séquence de PAR-1 liant la thrombine
- les **pepducines**, des molécules intracellulaires inhibant le signal transmis par les protéines G sous-jacentes au PAR-1
- les **anticorps** bloquant spécifiquement le récepteur PAR-1 ;

Malgré le succès des peptidomimétiques en recherche préclinique, ces derniers n'ont pas été retenus pour l'administration chez l'Homme, pour des raisons évidentes de pharmacocinétique et de pharmacodynamie. Une approche différente a donc été choisie, et a consisté à concevoir des antagonistes de PAR-1 de petite taille qui soient à la fois puissants, compétitifs et sélectifs du récepteur PAR-1. Ces efforts ont permis de mettre au point Vorapaxar et Atopaxar (French *et al.,* 2014).

Vorapaxar (ZONTIVITY®) ou SCH530348 (figure 29) est un antagoniste réversible de PAR-1 qui a obtenu de la FDA une autorisation de mise sur la marché aux Etats-Unis le 8 mai 2014 et le 19 janvier 2015 dans l'Union Européenne (Walsh, 2014 ; EMA, 2015). Sa taille moléculaire est de 591 Da (French *et al.,* 2014). Ce médicament, développé et commercialisé par la société Merck, est le premier antagoniste de PAR-1 mis sur le marché. Il s'agit d'un analogue synthétique de la himbacine, composé isolé de l'écorce de *Magnolia* australiens. Il s'agit d'un alcaloïde de squelette 3-phenylpyridine tricyclique (Smyth *et al.,* 2009). Il est administré *per os*.

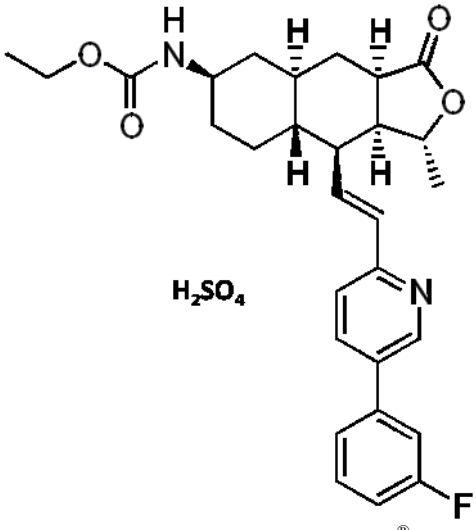


Figure 29 : Formule de Vorapaxar (ZONTIVITY®) (Cui *et al.,* 2012)

Vorapaxar présente une bonne biodisponibilité orale, supérieure à 90 % (French *et al.,* 2014). Son action inhibitrice de l'activation du PAR-1 par la thrombine est dose-dépendante. Son délai d'action est de 2 heures. Ce composé inhibe l'agrégation plaquettaire comme antagoniste compétitif de PAR-1. En n'inhibant que l'action de la thrombine sur le PAR-1,

Vorapaxar n'intervient pas dans la conversion du fibrinogène en fibrine. La demi-vie est de l'ordre de 126 à 269 heures. Il est métabolisé par le CYP3A4 et éliminé par voie fécale.

Après des essais de **phase I** et **II** encourageants, deux essais de **phase III** ont été menés à grande échelle. Le premier, nommé TRA-CER (*Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction*) était un essai randomisé, en double-aveugle, contre placebo et multicentrique. Ont été inclus 12 944 patients présentant un syndrome coronaire aigu ainsi qu'un sus-décalage de ST ou une élévation significative d'un marqueur de nécrose myocardique (troponine ou créatine kinase). Après un suivi de deux ans, cet essai a conclu que l'association de Vorapaxar au traitement antithrombotique habituel de ces patients ne permettait pas de diminuer significativement la survenue d'événements cardiovasculaires graves (décès, IDM, AVC,…) et augmentait le risque hémorragique, notamment au niveau intracrânien, ce qui n'avait pas été mis en évidence à l'occasion des essais de phase II (Tricoci *et al.,* 2012 ; Moschonas, Goudevenos et Tselepis, 2015).

A l'issue de cet essai, un second essai de **phase III** a été promu (TRA 2°P-TIMI 50). Il s'agissait également d'un essai en double-aveugle, contre placebo, randomisé et multicentrique. Cette étude inclut 26 449 patients, dont la moitié reçut le Vorapaxar en plus de leur traitement antithrombotique habituel. Le suivi dura 3 ans. Ces patients présentaient une athérosclérose stable avec un antécédent d'IDM ou d'AVC dans l'année précédant l'inclusion. Le critère principal d'évaluation de cette étude était une combinaison du décès d'étiologie cardiovasculaire, d'un IDM ou d'un AVC. Cette étude n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre les deux bras de traitement, même si les patients ayant reçu le Vorapaxar présentaient moins d'événements cardiovasculaires, en particulier d'IDM. Le risque hémorragique était également accru pour les patients recevant le Vorapaxar (Morrow *et al.,* 2009 ; Scirica *et al.,* 2012 ; Moschonas, Goudevenos et Tselepis, 2015).

Toutefois, les analyses post-hoc de sous-groupes de populations incluses dans cette étude ont permis de mettre en évidence un avantage significatif pour les patients recevant Vorapaxar lorsque ceux-ci présentaient des antécédents d'IDM ou d'artériopathie périphérique. De plus, ces patients ne présentaient pas plus d'hémorragies intracrâniennes lorsque Vorapaxar était administré. Ainsi, c'est avec une indication dans la thromboprophylaxie artérielle secondaire qu'a été accordée l'AMM au Vorapaxar par la FDA (Etats-Unis) et par l'EMA (Union Européenne) (Scirica *et al.,* 2012 ; French *et al.,* 2014).

Un deuxième antagoniste de PAR-1 (figure 30) fait actuellement l'objet d'essais cliniques. Il s'agit d'une amidine bicyclique d'une taille de 609 Da, nommée Atopaxar ou E5555 (Smyth *et al.,* 2009).

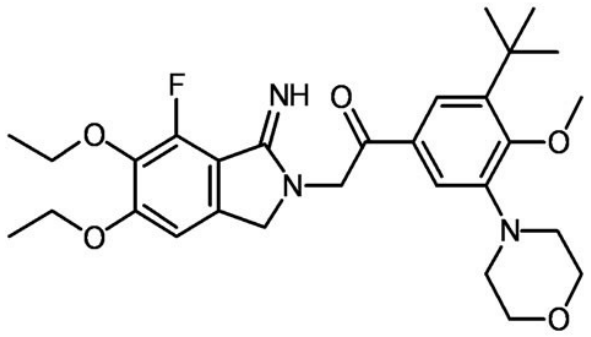


Figure 30 : Formule de Atopaxar (E5555) (Cui *et al.,* 2012)

Atopaxar est développé par la société japonaise Eisai Co. Ce composé est également administré *per os*. Les études précliniques *in vitro* et *in* vivo ont permis de mettre en évidence le mécanisme d'action de ce composé. Il inhibe l'activation plaquettaire induite par le peptide activant le récepteur PAR-1 (TRAP) sans affecter les autres voies d'activation des plaquettes, (TxA_2, ADP,…) (Moschonas, Goudevenos et Tselepis, 2015). Chez des lapins, il a été montré que Atopaxar réduisait les vasospasmes cérébraux induits par la thrombine, qui sont une des complications majeures des hémorragies arachnoïdiennes (Kai *et al.,* 2007). Son métabolisme est principalement hépatique (CYP3A4), et il présente une demi-vie plus courte que Vorapaxar, ainsi qu'une bonne biodisponibilité (Costopoulos *et al.,* 2013).

Le profil de sécurité de Atopaxar a été évalué à l'occasion de deux essais de **phase II**, l'un pour des patients présentant un syndrome coronaire aigu (LANCELOT-ACS, 603 patients inclus), l'autre pour des patients présentant une maladie coronarienne chronique (LANCELOT-CAD, 720 patients inclus). Ces essais ont montré une augmentation de la survenue d'hémorragies pour les bras de traitement recevant Atopaxar, mais pas de manière significative comparativement au groupe placebo. De plus, le nombre d'épisodes hémorragiques sévères était augmenté et dose-dépendant pour le bras de traitement recevant Atopaxar pour les patients présentant un ACS, mais pas pour les patients présentant une CAD (Wiviott *et al.,* 2011 ; Capodanno *et al.,* 2012 ; O'Donoghue *et al.,* 2012 ; French *et al.,* 2014).

L'administration de hautes doses de Atopaxar (plus de 200 mg) s'accompagne d'une élévation des transaminases atteignant environ trois fois la normale. Une prolongation de l'intervalle QT est également observée. Ces effets indésirables sont doses-dépendants, avec un retentissement clinique pour ce qui est de l'élévation du taux plasmatique des enzymes hépatiques (Wiviott *et al.,* 2011). Ces effets indésirables n'ont pas été reportés lors des essais de phase I et II de Vorapaxar. Ces observations expliquent qu'à ce jour l'Atopaxar n'ait pas fait l'objet d'essai de phase III (Capodanno *et al.,* 2012 ; French *et al.,* 2014).

Finalement, considérant que le Vorapaxar est administré par voie *per os* et que son action est puissante et réversible, certains auteurs considèrent que les antagonistes de PAR ne verront pas, à court terme, l'émergence d'une seconde génération de telles molécules malgré la mise en évidence d'effets indésirables au cours d'essais cliniques (French *et al.,* 2014).

Etonnament, le PAR-4 ne fait pas l'objet d'investigations pour le développement d'antiplaquettaires. Dans la mesure où son action sur les plaquettes est différente de celle de PAR-1, notamment au niveau de la dégranulation, il paraitrait pertinent de s'intéresser davantage à une telle cible. Des anticorps anti-PAR-4 murins font actuellement l'objet de recherches précliniques et ces derniers semblent présenter une action antithrombotique prometteuse (Vandendries *et al.,* 2007).

2.6 Inhiber les autres glycoprotéines de surface thrombocytaires

2.6.1 Revacept

Revacept (PR-15 ou GPVI-Fc, figure 31) est une protéine de fusion dimérique, recombinante, humanisée et soluble qui inhibe le récepteur GPVI plaquettaire. Initialement développée par la société Trigen™, Revacept l'a ensuite été par Johnson & Johnson et actuellement par la société allemande advanceCor. Il est composé du fragment Fc d'une IgG

humaine et d'une GPVI recombinante en N-terminal. Il est administré par voie IV, en perfusion de 20 minutes environ.

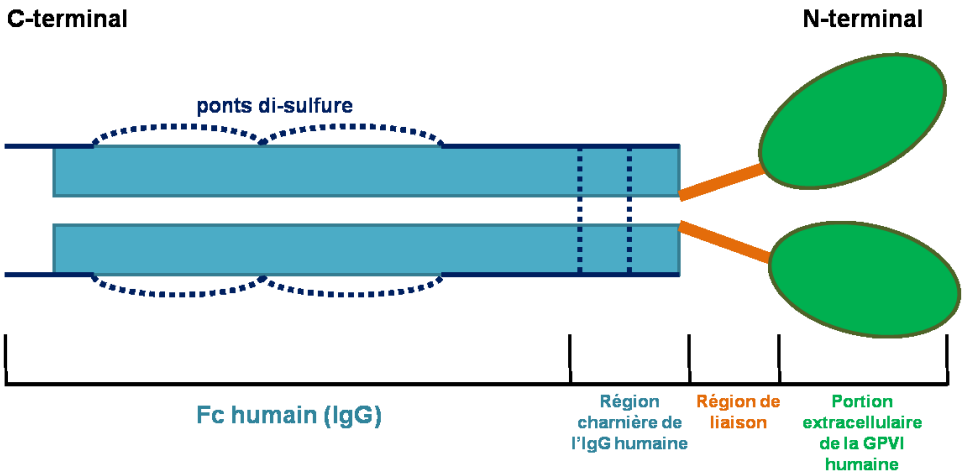


Figure 31 : Schéma de Revacept (Ungerer *et al.,* 2011)

Des études précliniques ont été menées, notamment chez des lapins supplémentés en cholestérol. Les données pharmacocinétiques tendent à montrer une accumulation sérique de Revacept après une administration répétée durant 3 semaines. Les observations histologiques ont permis de mettre en évidence une réduction de l'épaisseur des vaisseaux. Le poids de l'aorte est réduit, ainsi que la taille de la plaque d'athérome et l'invasion par les macrophages et les lymphocytes T. Par ailleurs, un dysfonctionnement endothélial est observé après administration d'acétylcholine. Seul ou en association avec d'autres molécules antithrombotiques, Revacept présente un index thérapeutique large, sans augmentation des temps de saignement (Ungerer *et al.,* 2013).

Revacept se lie au collagène sous-endothélial exposé à la circulation sanguine, par exemple à la suite d'une rupture de plaque. Il se lie également à la fibronectine. Ainsi, le collagène ne peut plus interagir avec les récepteurs GPVI plaquettaires, ce qui limite donc l'agrégation et l'activation de ces dernières (figure 32) (Ungerer *et al.,* 2011 ; advanceCor Gmbh, 2013 ; Ungerer *et al.,* 2013).

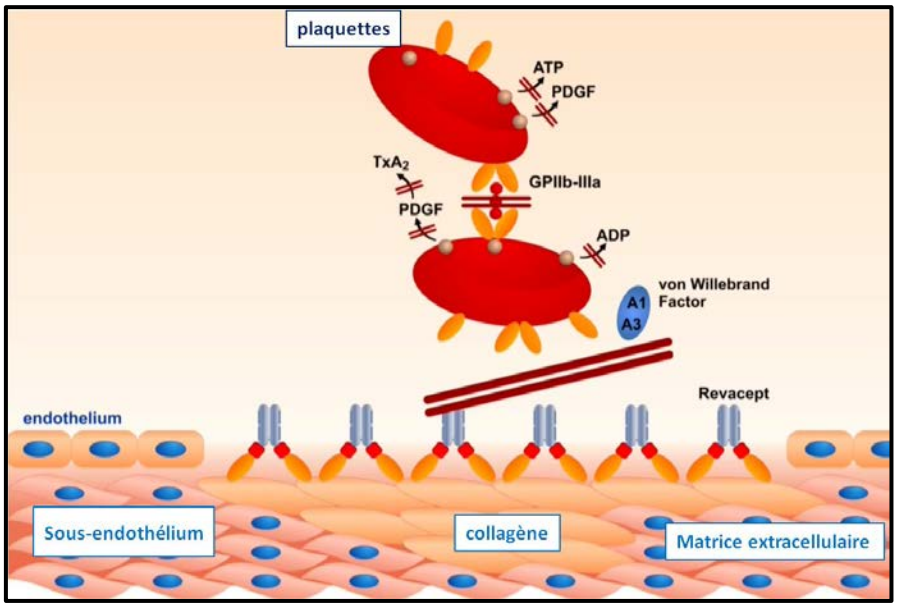


Figure 32 : Mécanisme d'action de Revacept (advanceCor Gmbh, 2013)

De par son mode d'action, Revacept n'abolit aucune voie d'activation de l'hémostase primaire et n'interagit directement avec aucun des effecteurs de celle-ci. Aussi, son administration chez l'Homme ne devrait pas augmenter le risque hémorragique. Revacept empêche l'interaction entre le collagène sous-endothélial et les plaquettes. Cette molécule est spécifique de la lésion de l'endothélium vasculaire et n'a un effet antiplaquettaire qu'à la condition qu'une lésion vasculaire expose à la circulation sanguine le collagène sous-endothélial (Ungerer *et al.,* 2011 ; advanceCor Gmbh, 2013). Il permet ainsi de traiter la cause de l'activation plaquettaire, et non la conséquence, ce qui est le cas des antagonistes de $P2Y_{12}$ ou encore de l'aspirine. De plus, il a été montré que l'expression et la concentration en GPVI était accrue chez les patients présentant un syndrome coronaire aigu, un AVC ou un accident ischémique transitoire (Ungerer *et al.,* 2013).

Le premier essai clinique (NCT01042964) dont a fait l'objet le Revacept visait à évaluer sa sécurité à l'administration, sa tolérance, ainsi que ses profils pharmacocinétique et pharmacodynamique. Pour cet essai de **phase I**, 30 volontaires sains ont été inclus. Ils recevaient une dose unique de Revacept par voie IV. Cinq doses ont été testées, de 10 mg à 160 mg (Ungerer *et al.,* 2011). Cette étude a permis de montrer que l'administration de Revacept chez ces volontaires sains n'augmente pas significativement le temps de saignement, ni les temps de coagulation (TC+A, TQ). L'agrégation plaquettaire induite par le collagène est inhibée de manière dose-dépendante et pour 2 à 7 jours, selon la dose administrée. Par ailleurs, l'agrégation plaquettaire provoquée par l'ADP ou le TRAP est inchangée. Aucun effet indésirable sévère, lié à l'administration de Revacept, n'a été observé au cours de cet essai. De même, aucun paramètre biologique ou ECG n'a été significativement perturbé. Enfin, aucun anticorps dirigé contre Revacept n'a été mis en évidence.

Cette molécule est donc bien tolérée, son profil pharmacocinétique est dose-dépendant et donc prévisible. L'inhibition de l'agrégation plaquettaire est dose-dépendante sans altérer l'ensemble des phénomènes hémostatiques. Ces résultats ont donc permis au Revacept de faire l'objet d'un essai de **phase II** (Ungerer *et al.,* 2011).

Cet essai de **phase II** est actuellement ouvert aux inclusions, et ce depuis mars 2013. Il s'agit d'un essai randomisé, multicentrique, en double-aveugle, évaluant les profils de sécurité et d'efficacité de Revacept contre placebo. Revacept est administré en plus d'un traitement classique par antiplaquettaires (aspirine ou clopidogrel). Les patients inclus présentent une sténose carotidienne, un accident ischémique transitoire, une aumaurose transitoire, un AVC ou des signaux microemboliques (SME). Cet essai vise également à définir la dose optimale de Revacept.

Le critère principal est l'incidence des SME 24 heures après administration de la molécule. Ces SME sont évalués par Doppler transcrânien. Les patients sont ensuite suivis pendant un an. Il est prévu d'inclure 150 patients. Revacept est administré à 40 mg ou à 120 mg. La fin des inclusions aurait dû intervenir en décembre 2014, mais il semble que les centres investigateurs recrutent toujours actuellement des patients pour cette étude (FDA, 2014).

L'objectif du développement de cette molécule est l'obtention d'une indication dans le traitement du syndrome coronaire aigu, dans la mesure où Revacept, de par son mode d'action, semble pouvoir limiter le développement de l'athérosclérose (Ungerer *et al.,* 2011).

2.6.2 DZ-697b

Développé par la société Daiichi Sankyo, cet antiplaquettaire administré *per os* devrait permettre de prévenir la thrombose chez des patients présentant un AVC, un syndrome coronaire aigu ou des troubles de la microcirculation. Il cible spécifiquement l'agrégation plaquettaire induite par le collagène. Contrairement au clopidogrel, DZ-697b n'est pas une prodrogue (Ogihara *et al.,* 2005 ; Zafar *et al.,* 2010).

DZ-697b inhibe la phosphorylation de la chaîne γ du récepteur FcR induite par le collagène. Ce défaut de phosphorylation affecte un grand nombre de fonctions plaquettaires, notamment s'agissant des glycoprotéines GPIb et GPVI dont on connait le rôle dans l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire. Le GPIb forme un complexe avec la chaîne γ du FcR, autorisant l'adhésion et l'activation plaquettaire (Zafar *et al.,* 2010).

Les essais précliniques ont montré que DZ-697b inhibait l'adhésion plaquettaire au niveau des artères lésées, ainsi que l'agrégation plaquettaire lors de la présence de forces de cisaillement importantes. L'inhibition est faible lorsque ces forces de cisaillement sont faibles, ce qui laisse présager un faible risque hémorragique, du fait de la spécificité d'action de la molécule. Ces essais ont été menés chez des cochons d'Inde et des macaques (Ogihara *et al.,* 2005).

Cette molécule a fait l'objet d'un essai de **phase I** visant à évaluer la sécurité et l'efficacité de l'inhibition de l'agrégation plaquettaire de ce composé. Il a permis de montrer la capacité de DZ-697b à diminuer le temps de saignement chez 20 volontaires sains comparativement au clopidogrel. Le changement de taille des thrombocytes des volontaires sains a été évalué à l'aide d'une chambre de Badimon. Il a été montré que la diminution de la taille des plaquettes est dose-dépendante (Zafar *et al.,* 2010).

DZ-697b présente une bonne absorption orale, un délai d'action court et une durée d'action relativement importante. L'inhibition de l'agrégation et de l'adhésion plaquettaire est induite par de fortes forces de cisaillement vasculaires. Le DZ-697b a été évalué à 3 doses contre 300 mg de clopidogrel (Zafar *et al.,* 2010).

Dans son rapport d'activité pour l'année 2008, la société Daiichi Sankyo annonce sa volonté d'arrêter le développement du DZ-697b. Ce projet figurait pourtant parmi les projets prioritaires l'année précédente (Daiichi Sankyo CO, LTD, 2008).

2.7 Les antagonistes du récepteur $5HT_{2A}$ thrombocytaire

Les premiers inhibiteurs du récepteur $5HT_{2A}$ à avoir été développés, tels que Sarpogrelate ou Ketansérine, n'étaient pas suffisamment sélectifs de leur cible. Depuis, Temanogrel (ADP791) a été conçu et est actuellement développé par la société Arena Pharmaceuticals (figure 33). Il est administré *per os*.

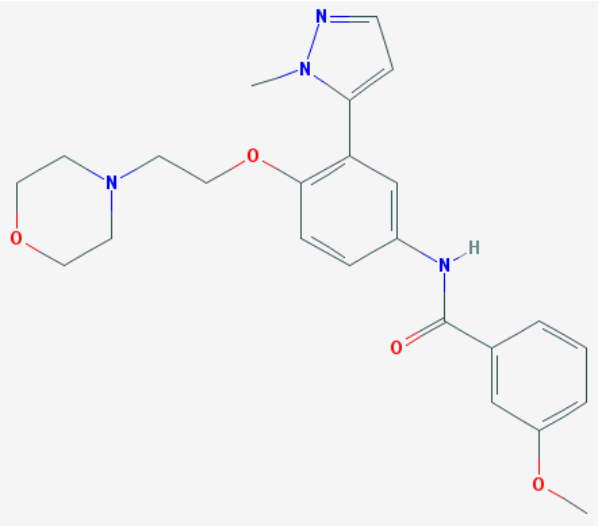


Figure 33 : Formule de Temanogrel (Adams *et al.,* 2009)

Un modèle canin de thrombose artérielle récidivante a été utilisé pour des études précliniques avec Temanogrel. Celui-ci a montré son efficacité à limiter la survenue de thrombose artérielle sans pour autant augmenter le risque hémorragique. Ces études ont également permis de mieux comprendre le mécanisme d'action de Temanogrel. Dans les territoires vasculaires où il existe des forces de cisaillement importantes, ce dernier augmente la polymérisation de l'actine, la concentration intracellulaire en Ca^{2+} et atténue la dureté du caillot (Przyklenk *et al.,* 2010). De plus, le récepteur $5HT_{2A}$ étant situé à la surface des plaquettes et des cellules musculaires lisses, Temanogrel contribue à limiter l'occlusion artérielle induite par la thrombose (Adams *et al.,* 2009).

Cette molécule pourrait trouver une indication dans le traitement de l'angor instable. Elle a fait l'objet d'un essai de **phase Ia** et d'un essai de **phase Ib** randomisé, en double-aveugle, contre placebo, à doses multiples croissantes (15 à 240 mg), chez 50 volontaires sains. Cette étude visait à évaluer la sécurité de ce composé, ainsi qu'à dresser ses profils pharmacocinétique et pharmacodynamique. Cet essai a permis de conclure à une bonne tolérance de Temanogrel, sans effet indésirable grave. La fréquence des epistaxis observées était dose-dépendante. Elles se sont manifestées pour deux volontaires sains. L'inhibition de l'amplification de l'agrégation plaquettaire était dose-dépendante (Lief, Duch et Walsey, 2014).

Temanogrel fait actuellement l'objet de deux autres essais de **phase I,** encore ouverts aux inclusions, chez des volontaires sains (NCT02419820 et NCT02034292). Ces essais ont le même objectif que l'essai de phase Ib présenté précédemment. Un essai de **phase II** devait débuter au second semestre de 2014 afin de tester l'efficacité clinique de cette molécule, et d'en définir la dose optimale.

2.8 Synthèse

La figure 34 synthétise les molécules antiplaquettaires en cours de développement clinique précédemment présentées, ainsi que leurs cibles phamacologiques.

Les inhibiteurs du vWF semblent efficaces comme molécules antiplaquettaires. Le vWF intervient en amont de l'hémostase primaire, notamment au moment de l'adhésion plaquettaire à l'endothélium lésé. Parmi ces molécules antiplaquettaires, Caplacizumab a fait l'objet d'un essai de phase III et ce pourrait bientôt être le cas pour ARC1779. Ceci tend à

confirmer la pertinence de vWF comme cible antiplaquettaire. Il en est de même pour GP1b qui intervient également en amont de l'hémostase primaire.

Terutroban et Picotamide, tout comme l'aspirine, interagissent avec la voie du TxA2. Cette dernière est considérée comme le traitement de référence pour la thromboprophylaxie secondaire de patients ayant fait un AVC. Le développement d'inhibiteurs du récepteur au TxA_2 tels que Terutroban et Picotamide, pourrait donc être couronné de succès, même si les résultats des essais cliniques de ces deux composés se sont avérés décevants.

Notons également l'intérêt porté aux inhibiteurs de PAR-1 tels que Vorapaxar et Atopaxar. Le fait que ces inhibiteurs n'inhibent qu'une des actions de la thrombine constitue un avantage. De bons espoirs ont été fondés sur ces molécules, même si des effets indésirables ont été mis en évidence au cours des essais cliniques.

Enfin, Revacept possède un mécanisme d'action qui nous semble particulièrement intéressant. Cette protéine de fusion empêche l'interaction du collagène sous-endothélial mis à nu avec les plaquettes circulantes. Ce composé n'interagit pas avec ces dernières, il n'a donc aucune action sur l'hémostase primaire physiologique. Ceci signifie d'une part que son administration ne devrait pas causer d'hémorragies, et d'autre part qu'une hémostase physiologique est conservée.

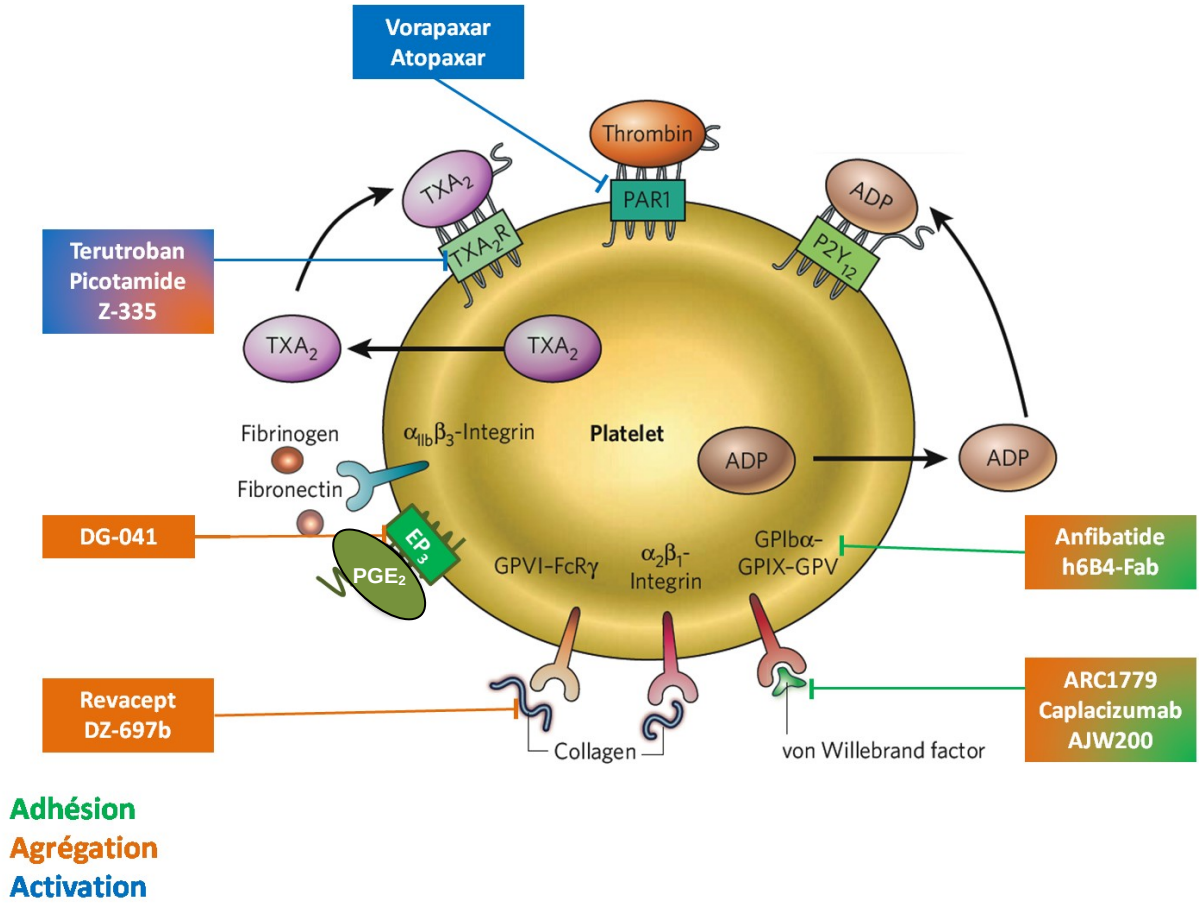


Figure 34 : Synthèse des antiplaquettaires en cours de développement clinique, et de leurs cibles pharmacologiques (d'après Mackman, 2008)

3- COAGULATION

Les anticoagulants sont classiquement classés en deux familles :

- Inhibiteur enzymatique direct
- Inhibiteur enzymatique indirect

Les premiers se lient directement à l'enzyme cible et empêche son interaction avec son substrat. Les inhibiteurs indirects, quant à eux, se lient à des substrats, cofacteurs ou effecteurs enzymatiques présents naturellement dans le plasma, tels que l'antithrombine ou le cofacteur II de l'héparine (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

3.1 Inhibition de la phase d'initiation

3.1.1 Molécules ciblant le FVIIa

3.1.1.1 Tifacogin

Tifacogin est une version recombinante du TFPI humain. Sa toxicité ainsi que son activité biologique ont été évaluées à l'occasion d'un essai de **phase I** chez des volontaires sains ainsi que chez des patients présentant un sepsis (**phase II**). Ces études ont montré une bonne tolérance du composé sans provoquer d'hémorragies sévères chez les volontaires sains. La phase II a révélé que les patients avec un sepsis étaient plus sensibles au TFPI que les volontaires sains (Weitz et Linkins, 2007).

Un essai clinique multicentrique de **phase III** en double aveugle randomisé contre placebo a ensuite été mené entre mars et septembre 2001. Cet essai avait pour but d'évaluer l'impact en termes de mortalité de l'administration de Tifacogin chez des patients en sepsis sévère afin de déterminer la sécurité à l'administration de ce médicament. Cet essai a eu lieu dans 245 hôpitaux répartis dans 17 pays d'Amérique du Nord, d'Europe et Israël (Abraham *et al.,* 2003).

L'étude inclut 1 754 patients avec un sepsis sévère et un INR haut (≥ 1,2) recevant aléatoirement Tifacogin par voie IV ou un placebo. Les mêmes traitements ont été aléatoirement administrés à des patients en sepsis sévère avec un INR bas (< 1,2). Le critère d'évaluation principal était le décès à 28 jours, quelle qu'en soit la cause (Abraham *et al.,* 2003).

Pour les patients présentant un INR haut, la mortalité à 28 jours est de 34,2 % vs. 33,9 % avec Tifacogin et placebo, respectivement. S'agissant des patients à INR bas, le taux de mortalité à 28 jours est de 12 % avec Tifacogin et de 22,9 % avec placebo. L'étude montre que la prise de Tifacogin atténue significativement le taux plasmatique du fragment 1+2[3] de la thrombine et le taux du complexe thrombine/antithrombine, quel que soit l'INR du patient. Toutefois, il y a une augmentation d'effets indésirables graves pour les bras de traitement avec Tifacogin pour les deux cohortes (Abraham *et al.,* 2003).

Les auteurs concluent que Tifacogin n'a pas d'effet sur la mortalité globale des patients présentant un sepsis sévère avec un INR haut. Par ailleurs, l'administration de Tifacogin est associée à la survenue de saignements, quelle que soit la valeur d'INR (Abraham *et al.,* 2003).

[3] Lors de l'activation de la prothrombine en thrombine, celle-ci libère des peptides tels que le fragment 1+2

3.1.1.2 rNAPc2

NAPc2 (*Nematode Anticoagulant Protein c2*) a été isolé d'un nématode hématophage, *Ancylostoma caninum*, parasite interne des canidés notamment. Les propriétés anticoagulantes de ce nématode sont connues depuis des siècles, mais ce n'est qu'au début des années 2000 qu'ont été mises en évidence une famille de petites protéines anticoagulantes nommées *nematode anticoagulant proteins* (NAP). Actuellement un NAPc2 recombinant, le rNAPc2, est obtenu par procédés biotechnologiques en utilisant une levure, *Pichia pastoris* (Lee et Vlasuk, 2003).

Le composé rNAPc2 est une protéine de 85 acides aminés (Lee *et al.,* 2001). Il se lie à un site non catalytique du FX ou du FXa. Le complexe FXa-rNAPc2 inhibe alors le FVIIa lié au FT. Le mécanisme d'inhibition du complexe FVIIa-FT par le complexe FX-rNAPc2 est similaire à celui du TFPI, sauf que le TFPI nécessite un site actif libre sur le FXa pour pouvoir s'y lier (Bergum *et al.,* 2001). La figure 35 schématise le mécanisme d'action du rNAPc2 sur la complexe FVIIa/FT en présence du FX.

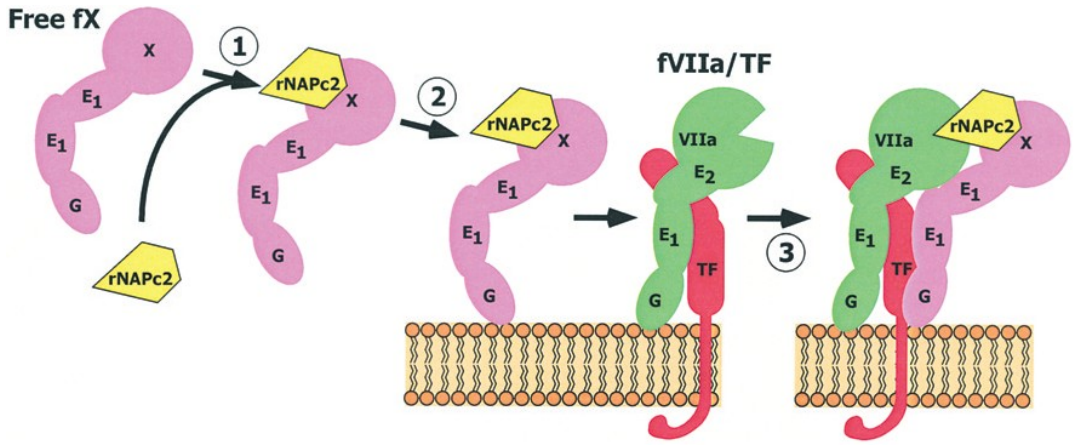


Figure 35 : Mécanisme d'action de rNAPc2 (Vlasuk et Rote, 2002)

Contrairement à Tifacogin, rNAPc2 peut se lier au FX ou au FXa, ce qui lui confère une demi-vie plus longue, atteignant 50 heures. Par ailleurs, du fait de son faible poids moléculaire, le NAPc2 peut être administré par voie sous-cutanée avec une biodisponibilité de 90 % à 100 % (Lee *et al.,* 2001 ; Weitz et Linkins, 2007). De plus, des études *in vitro* montrent que l'administration de rNAPc2 augmente le TQ sans pour autant accroitre significativement le TC+A, ce qui corrobore le mécanisme d'action de cette molécule anticoagulante (Lee et Vlasuk, 2003).

Près de 500 volontaires sains et patients ont été inclus dans des essais de **phase I** et **II**. Les essais de **phase I** ont montré chez des volontaires sains que rNAPc2 possède un effet anticoagulant dose-dépendant. Ils ont également permis de déterminer la demi-vie plasmatique de cet anticoagulant. Les patients inclus dans ces essais de **phase II**, devaient bénéficier d'une intervention chirurgicale orthopédique et rNAPc2 était administré comme traitement prophylactique de la thrombose. A ce stade du développement clinique de rNAPc2, les résultats s'avéraient particulièrement encourageants (Lee et Vlasuk, 2003).

Un essai de **phase II** visait à évaluer la dose de rNAPc2 à administrer pour prévenir la survenue de thrombose veineuse chez des patients bénéficiant de la mise en place d'une prothèse du genou. Malgré des résultats prometteurs, la suite du développement s'est orientée

vers la thromboprophylaxie de patients présentant un syndrome coronaire aigu. Cet essai de phase II a inclus 203 patients et a montré que la génération de thrombine était inhibée de manière dose-dépendante avec rNAPc2, sans pour autant accroitre la fréquence des hémorragies sévères par rapport à un traitement anticoagulant classique seul (Giugliano *et al.,* 2007).

La molécule de rNAPc2 possède une longue demi-vie de près de 50 heures. Se pose donc le problème de la réversibilité de cette drogue, une fois administrée, notamment dans le cas où le patient doive subir une intervention chirurgicale en urgence. Etant donné la cible du rNAPc2, l'utilisation d'un facteur VIIa recombinant semble indiquée (NOVOSEVEN®). L'efficacité de NOVOSEVEN® (90 µg/kg) à s'opposer à l'effet anticoagulant de rNAPc2 administré à la dose de 3,5 µg/kg a été démontrée au cours d'un essai de phase I réalisé chez des volontaires sains (Friederich *et al.,* 2001). Etonnamment, le développement clinique de rNAPc2 est aujourd'hui arrêté, sans raison évidente au vu des résultats d'essais cliniques.

Notons que rNAPc2 a fait l'objet d'essais cliniques en oncologie. Un essai de **phase II** dans le cancer du colon métastatique promu par la société ARCA Biopharma, devait inclure près de 100 patients. Les inclusions ont été suspendues en mai 2008 (Love, 2015). Cette possible indication en oncologie s'explique car le FT joue un rôle important dans la progression tumorale (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

3.1.1.3 Facteur VIIai

Ce facteur VIIa recombinant, encore appelé FVIIai (FVIIa inactivé), FFR-FVIIa ou ASIS, présente un site d'action créant une liaison irréversible avec le facteur tissulaire. Il entre donc en compétition avec le FVIIa pour se lier au FT, ce qui limite l'initiation de la coagulation par la voie extrinsèque (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012). Tout comme le FVIIa, le FVIIai a une courte demi-vie. Il est administré par voie IV. Ce FVIIa recombinant a été rendu inactif par l'utilisation d'un inhibiteur irréversible de sérine protéase, la D-Phe-L-Phe-L-Arg chlorométhyl-cétone (Lee et Vlasuk, 2003).

Le FVIIai a fait l'objet d'un essai clinique de **phase II** incluant 491 patients bénéficiant d'une revascularisation coronarienne percutanée. Il s'agissait d'un essai randomisé, en double-aveugle, par doses croissantes pour évaluer la sécurité et l'efficacité du FVIIai dans un contexte d'angioplastie coronarienne transluminale percutanée. Le premier bras de traitement recevait une héparine seule (100 U/kg) avec un placebo, le second recevait le FVIIai à dose croissante à mesure que la dose d'héparine co-administrée diminuait. Comparativement à l'héparine seule, l'administration de FVIIai avec héparine ne s'accompagne pas d'un moindre risque de décès, d'infarctus du myocarde, ou encore de revascularisation en urgence. Cependant, le nombre d'épisodes hémorragiques mineurs étaient significativement plus importants dans le groupe recevant le FVIIai que dans le groupe recevant l'héparine seule. Le développement clinique de cette molécule a donc été stoppé (Kleiman et Califf, 2000).

3.2 Inhibition de la phase d'amplification

3.2.1 Cibler le FIX et le FIXa

Les molécules pharmaceutiques développées pour l'inhibition du facteur IXa sont de différentes natures. Il s'agit d'aptamères à ARN, d'anticorps monoclonaux ou encore d'inhibiteurs synthétiques compétitifs du site actif du FIXa (Smiley et Becker, 2014).

3.2.1.1 IXai

IXai a été développé à partir du venin d'un serpent, *Agkistrodon acutus*, tout comme Anfibatide. Celui-ci contient l'agkisacutacine, une protéine qui présente des propriétés anticoagulantes en se liant au GPIb plaquettaires ainsi qu'aux facteurs IX et X de la coagulation. Des recherches menées dans les années 1980 ont conduit au développement d'un antagoniste compétitif du site catalytique du FIX, alors nommé IXai ou dansyl-glutamyl-glycyl-arginyl-chloromethylcétone. Celui-ci forme le complexe IXai-IX qui ne permet pas la formation du complexe FVIIIa-FIXa, d'où l'action anticoagulante de IXai (Smiley et Becker, 2014).

IXai a fait l'objet d'études pré-cliniques sur des modèles animaux de thrombose artérielle et d'AVC. Ces études ont montré que l'administration de IXai s'accompagnait de moins d'hémorragies qu'avec les HNF. Par ailleurs, IXai a été administré en compassionnel afin de permettre à des patients de recevoir une circulation extracorporelle lorsque ceux-ci ne pouvaient pas se voir administrer d'héparines (Spanier *et al.,* 1998). Toutefois, cette molécule n'a jamais fait l'objet d'essais cliniques (Smiley et Becker, 2014).

3.2.1.2 SB249417

Le développement d'anticorps monoclonaux intéresse le traitement de nombreuses pathologies du fait, notamment, de leur spécificité pour une cible donnée. Ils sont particulièrement présents dans le traitement des cancers et des maladies auto-immunes. Cependant, quelques anticorps monoclonaux sont développés comme molécules anticoagulantes, notamment ciblant le domaine *Gla* du FIXa. C'est le cas de SB249417, un anticorps monoclonal humanisé développé par la société Glaxo-Smith-Kline (GSK). Il s'agit d'un anticorps associant le domaine constant d'une IgG1 humaine et le domaine variable d'un anticorps monoclonal murin BC2 dirigé contre le résidu *Gla* du FIXa humain (Howard *et al.,* 2007).

Dans des modèles murins précliniques de thrombose artérielle, il a été montré que les propriétés anticoagulantes de SB249417 étaient comparables à celles de l'Enoxaparine (HBPM). En revanche, l'anticorps induit un allongement du TC+A moins important que l'Enoxaparine dans un modèle murin d'AVC (Toomey *et al.,* 2000). Toujours pour ce modèle murin d'AVC, il a été montré que SB249417 réduisait significativement la zone infarcie et les déficits neurologiques comparativement à l'administration de t-PA (Toomey *et al.,* 2002).

Il apparait que cet anticorps a bénéficié d'un développement clinique limité et n'a fait l'objet que d'un seul essai clinique de **phase I**. Il s'agissait de l'administration par voie IV, à doses croissantes, de l'anticorps contre placebo et en simple-aveugle. L'objectif de l'étude consistait à évaluer les profils pharmacocinétique et pharmacodynamique de cette molécule sur 26 volontaires sains (Chow *et al.,* 2002). Le développement clinique ne s'est pas poursuivi.

3.2.1.3 TTP889

TTP889 a été développé par la société Transtech Pharma. Il s'agit du seul inhibiteur partiel du FIXa actif oralement et qui inhibe près de 90 % de l'activité de ce dernier. D'abord évalué sur des modèles précliniques murins et porcins, TTP889 a ensuite fait l'objet d'un essai clinique de **phase I** dans lequel la molécule a montré un profil pharmacocinétique dose-dépendant ainsi qu'une demi-vie de 20 heures (Smiley et Becker, 2014).

L'essai FIXIT est un essai de **phase II** multicentrique, contre placebo et qui visait à établir la preuve de concept ainsi que la sécurité et l'efficacité de TTP889 pour 261 patients présentant à risque de thrombose veineuse. Les patients inclus bénéficiaient d'une chirurgie de la hanche à l'occasion de laquelle un traitement conventionnel antithrombotique à visée prophylactique leur était administré. En plus de ce traitement, 300 mg de TTP889 ou un placebo était administré *per os* une fois par jour. Après 9 jours de thromboprophylaxie, 32,1 % des patients traités par TTP889 ont présenté une thrombose veineuse, contre 28,2 % pour les patients sous placebo, ce qui n'a pas permis de conclure positivement quant à l'efficacité de TTP889. Aucun patient n'a présenté d'hémorragie sévère, quel que soit le bras de traitement. Les auteurs concluent à la non-efficacité de cette molécule anticoagulante, dans cette indication. Toutefois, certains auteurs soulignent l'intérêt à poursuivre les essais cliniques pour cette molécule, au vu de sa bonne tolérance, dans d'autres indications (Eriksson *et al.,* 2008). Ces résultats expliquent l'arrêt du développement clinique de la molécule comme anticoagulant.

3.2.1.4 Pegnivacogin

Pegnivacogin est le seul inhibiteur de FIX ayant fait l'objet d'un essai clinique de **phase III**. Il s'agit d'une molécule aptamérique à ARN simple brin développée par Regado Bioscience. L'un des intérêts de Pegnivacogin (RB006) réside dans le fait qu'il est développé avec son antidote, Anivamersen (RB007), le brin complémentaire de Pegnivacogin. L'ensemble des deux molécules est appelée système REG1 (figure 36). Il est intéressant de développer un aptamère avec son antidote, car cela permet de pouvoir moduler l'activité du Pegnivacogin en fonction du contexte clinique. De plus, les molécules du système REG1 ainsi que le complexe formé par l'association des deux, sont éliminées par les nucléases de l'organisme (Povsic *et al.,* 2011).

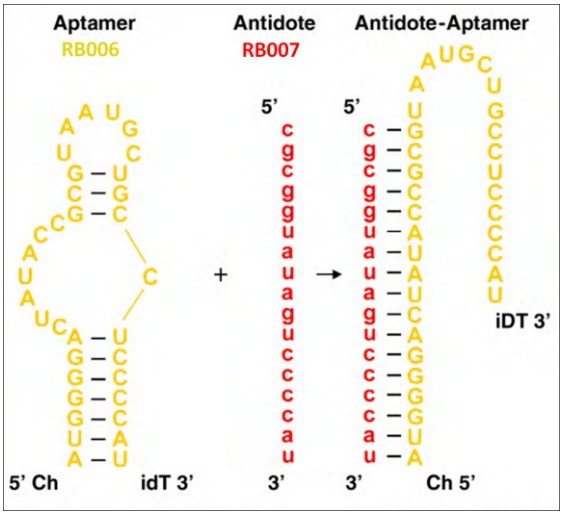


Figure 36 : Structure de Pegnivacogin (RB006) et de Anivamersen (RB007) ainsi que de leur hybridation (Rusconi *et al.,* 2002)

Pegnivacogin bloque sélectivement le complexe FVIIIa-FIXa dont le rôle physiologique est l'activation du FX en FXa. Pegnivacogin se lie au FIX empêchant ainsi son activation par le complexe FT-FVIIa.

Pegnivacogin a été modifié chimiquement par ajout d'une chaine de polyéthylène-glycol (PEG) de 40 kDa en 5', d'un fluor en 2' et une déoxythymidine en 3'-3' (Bunka, Platonova et Stockley, 2010). Ces modifications permettent à la fois de ralentir la dégradation de la molécule dans l'organisme et d'augmenter la demi-vie plasmatique atteignant ainsi 100 heures. De plus, l'administration d'une seule dose de Pegnivacogin assure un effet anticoagulant de près de 30 heures (Dyke *et al.,* 2006). L'aptamère est également protégé des endonucléases de l'organisme par des sucres contenant des résidus 2'-fluoro et 2'-O-méthyl. Enfin, il est protégé de l'action des exonucléases endogènes par modification de l'extrémité 3' en déoxythymidine (Smiley et Becker, 2014).

D'un point de vue physiopathologique, l'inhibition du FIX s'apparente à l'hémophilie de type B. Ces patients présentent un TC+A allongé, ce qui pourrait faire de ce test de routine, un outil pertinent pour le suivi biologique de l'inhibition de FIX par REG1 (Povsic *et al.,* 2011). D'ailleurs, à l'occasion d'études précliniques et des premières études cliniques, il a été établi, grâce au TC+A et à des dosages plasmatiques que les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de Pegnivacogin sont doses-dépendantes. Ces études ont également montré que l'administration chez l'Homme d'une dose de Pegnivacogin de 0,75 à 1 mg/kg inhibe près de 99 % du FIX au décours d'une intervention coronarienne percutanée.

Les différentes phases de développement clinique du système REG1 sont présentées dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Synthèse des essais cliniques pour le REG1

TYPE D'ESSAI	NOM DE L'ETUDE	METHODOLOGIE	OBJECTIFS	BRAS DE TRAITEMENT	EFFECTIFS	RESULTATS	REFERENCES
Phase Ia	Regado 1a (NCT00113997)	Essai randomisé, en simple-aveugle, par doses croissantes avec des volontaires sains	Détermination du profil de sécurité à l'administration et caractérisation de la réponse pharmacodynamique à l'administration du médicament pour la première fois chez l'Homme	Bras 1 : Placebo puis RB007 Bras 2 : RB006 puis RB007 Bras 3 : RB006 puis placebo	85	- bonne tolérance du médicament et de son antidote -pas plus d'hémorragies dans un bras que dans l'autre -réponse pharmacodynamique dose-dépendante -réversibilité rapide de RB006 par RB007 (1 à 5 min) -un cas d'encéphalopathie qui s'est résolu sans séquelle	Dyke *et al.,* 2006
Phase Ib	-	Essai randomisé, en double-aveugle, contre placebo chez des patients sous traitement antiplaquettaires (aspirine et/ou clopidogrel)	Evaluation de la sécurité, de la tolérance et du profil pharmacodynamique du système REG chez des patients atteints de coronaropathies stables	Bras 1 : Placebo puis RB007 Bras 2 : RB006 puis RB007 Bras 3 : RB006 puis placebo	50	-l'administration de RB006 IV augmente le TC+A de manière dose-dépendante -l'administration de RB007 IV permet un retour au TC+A initial en une à deux minutes -Pas d'hémorragie sérieuse ni effet indésirable grave	Chan *et al.,* 2008a
Phase Ic	-	Essai à doses répétées et ajustées au poids du volontaire sain, contre placebo	Evaluation de la sécurité et des propriétés pharmacodynamiques de REG1 à doses répétées (reproductibilité intra-individuelle)	Bras 1 : trois fois RB006 puis RB007 Bras 2 : trois fois placebo	39	-obtention de TC+A reproductibles entre les différentes administrations de RB006 -réversibilité très reproductible en termes de TC+A par administration de RB007 -relation entre la dose de RB007 et le degré de réversibilité de RB006 -pas d'hémorragies ni d'effets indésirables graves	Chan *et al.,* 2008b
Phase IIa	NCT00715455	Essai ouvert, randomisé, contre standard (HNF) chez des patients subissant une ICP	Comparaison de REG1 avec une HNF durant une ICP	Groupe 1 : RB006 puis réversion partielle par RB007 (post ICP) et réversion totale (4 h) **ou** HNF (5 :1) Groupe 2 : RB006 puis réversion totale (post-ICP) **ou** HNF (5 :1)	24	-succès pour tous les cas traités, thrombolyse réussie pour les IDM sans complication angiographiques thrombotiques -réversion dose-dépendante de l'effet de RB006 par RB007	Cohen *et al.,* 2010
Phase IIb	RADAR	Essai randomisé, en aveugle partiel, multicentrique	**1-** Evaluer l'efficacité d'un certain nombre de doses de RB006 avec RB007 **2-** Confirmer la dose 1 mg/kg RB006 donne 99 % d'inhibition du FIX **3-** Efficacité et sécurité de RB006 comme anticoagulant chez des patients avec un SCA subissant une ICP	Bras 1 : RB006 + randomisation sur la dose de RB007 Bras 2 : héparine + inhibiteur de GP IIb/IIIa	800	-réversion de RB006 est dépendante de la dose se RB007 -quasi complète inhibition de FIX par le RB006 à la dose de 1 mg/kg -efficacité clinique de l'inhibition du FIX pour les patients présentant un syndrome coronaire aigu et bénéficiant d'une intervention coronaire percutanée -pas plus d'événements hémorragiques graves qu'avec le traitement standard	Povsic *et al.,* 2011

ICP : Intervention Coronarienne Percutanée **– IV :** Intra-Veineuse - **SCA :** Syndrome Coronaire Aigue

L'essai de **phase Ib** visait notamment à établir la relation entre la dose administrée de RB007 et le degré de réversibilité de RB006. La figure 37 présente l'effet de l'administration de plusieurs doses de RB007 par bolus en IV, 3 heures après administration par bolus en IV de différentes doses de RB006. Le TC+A est suivi au cours du temps. Lorsque la dose de RB006 administrée augmente, le TC+A s'allonge. De même, lorsque la dose de RB007 administrée augmente, un raccourcissement rapide du TC+A est observé en quelques minutes (Mark Y. Chan *et al.,* 2008a).

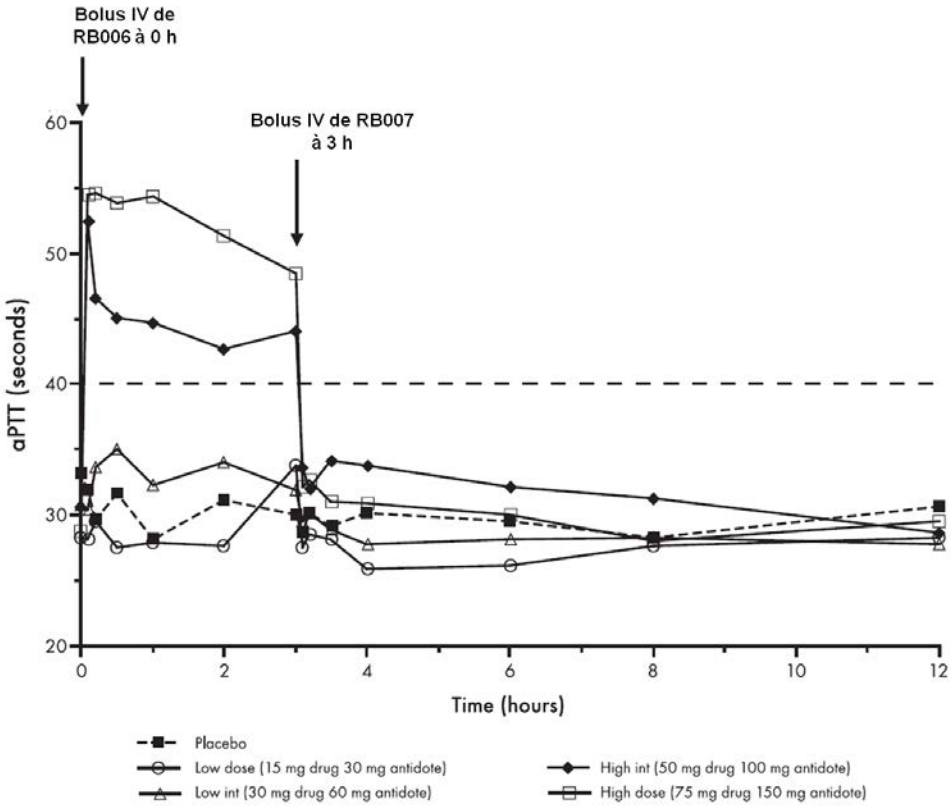


Figure 37 : Effet de l'administration de différentes doses de RB006 puis de différentes doses de l'antidote RB007 sur le TC+A (aPTT) au cours du temps et en fonction de la dose de RB006 (Mark Y. Chan *et al.,* 2008a)

Les résultats préliminaires des essais de **phase I**, intéressant la sécurité et les propriétés pharmacodynamiques de ces composés ont permis de réaliser des essais de **phase II**. Ces derniers visaient à déterminer s'il était possible et sûr de substituer un traitement anticoagulant standard, les HNF, par RB006 (Sundaram *et al.,* 2013).

Les essais de phase I et II ont permis de fonder de bons espoirs sur Pegnivacogin et son antidote. En particulier, ils ont permis de montrer l'innocuité de ces molécules aux doses thérapeutiques ainsi que la réversibilité de Pegnivacogin en fonction de la dose de Anivamersen. Leur efficacité clinique a également été démontrée dans le cas de patients présentant un syndrome coronaire aigu et devant bénéficier d'une intervention coronaire percutanée.

Un essai clinique de **phase III**, visant à établir le rapport bénéfice/risque de l'association des deux molécules en situation clinique réelle, a été ouvert aux inclusions dans près de 500 centres dans 17 pays, en mai 2013. Cet essai visait à évaluer l'efficacité et la sécurité du système REG 1, comparativement à la Bivalirudine (ANGIOX®) chez des patients devant bénéficier d'une intervention coronaire percutanée. L'essai, promu par Regado

Biosciences, devait inclure 13 200 patients. Toutefois, cet essai, intitulé REGULATE-PCI, a été arrêté en août 2014, après inclusion de 3 232 patients. L'*American College of Cardiology* (ACC) révélait le 15 mars 2015 la raison de l'arrêt de cette étude. L'administration de REG 1 s'est accompagnée de plus nombreuses hémorragies modérées à sévères, qu'avec le Bivalirudine. L'essai a été officiellement interrompu en raison de trop nombreuses réactions allergiques à l'administration de REG 1 (McChesney *et al.,* 2015).

3.2.1.5 Synthèse

La figure 38 synthétise les molécules antithrombotiques ciblant le FIX présentées ci-dessus, en spécifiant le domaine du facteur IX avec lequel interagit chaque drogue.

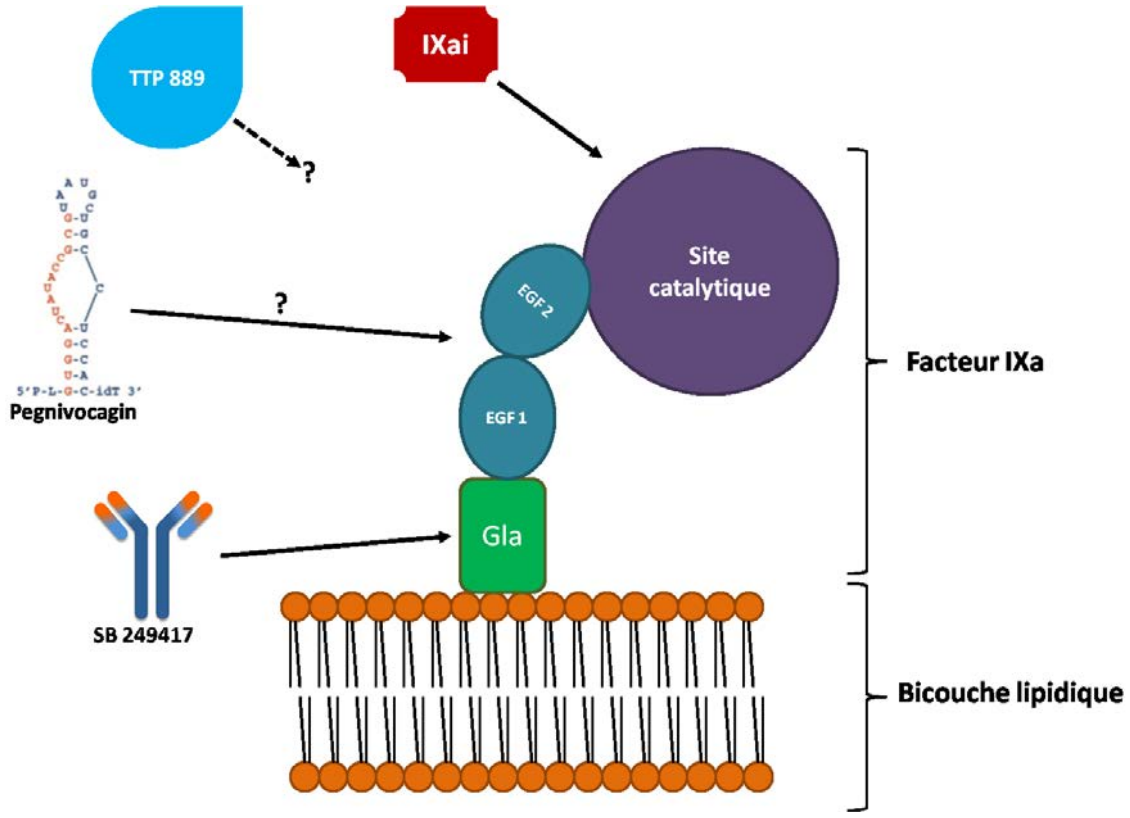


Figure 38 : Schéma général des domaines du FIXa ciblé par les molécules antithrombotiques anti-IXa (d'après Howard *et al.,* 2007)

Bien qu'actuellement aucun médicament ciblant le facteur IX ne semble traverser avec succès les différentes phases d'essais cliniques, le FIX pourrait constituer une cible pertinente pour le développement de molécules anticoagulantes. En effet, ce facteur de la coagulation se situe au carrefour de la voie intrinsèque et de la voie extrinsèque, et donc entre la phase d'initiation et de propagation de la génération de thrombine. Par ailleurs, l'approche du système REG 1 amène à s'interroger sur la définition de l'antithrombotique idéal. Plutôt que de développer une molécule antithrombotique qui expose à un faible risque hémorragique, il pourrait s'avérer pertinent de cherche à développer une molécule donc l'activité antithrombotique peut-être facilement modulée, notamment en développant en parallèle la molécule antidote (Smiley et Becker, 2014). Dès lors, les aptamères nous semblent une approche particulièrement intéressante.

3.2.2 Facteur XIa

3.2.2.1 BMS262084

BMS262084 est un inhibiteur irréversible du FXIa, contenant un motif 4-carboxy-2-azetidinone tel que présenté en figure 39. Les études précliniques *in vitro* et *in vivo*, menées pour cette molécule ont permis de montrer que cette dernière augmentait significativement le TC+A sans pour autant augmenter le TP. Testé dans des modèles animaux de thrombose veineuse et artérielle, BMS-262084 présente une action antithrombotique dose-dépendante chez le lapin. Chez ces derniers, BMS262084 n'altère pas l'agrégation plaquettaire. Son action antithrombotique est tout aussi efficace dans les modèles de thrombose veineuse qu'avec les modèles de thrombose artérielle (Wong *et al.,* 2011 ; Aditya, 2012). Cette molécule est actuellement développée par la société Bristol-Myers Squibb (BMS).

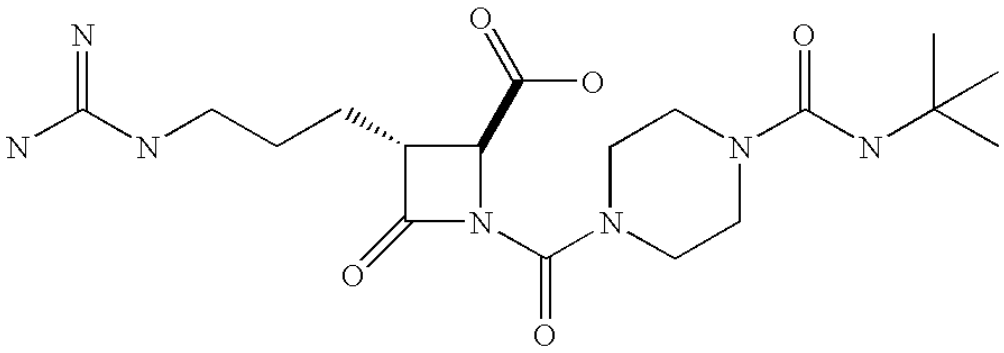


Figure 39 : Formule de BMS-262084 (Wong *et al.,* 2011)

De plus, BMS262084 fait actuellement l'objet d'un essai de **phase I** visant à évaluer la tolérance et la sécurité à l'administration, par voie IV, de ce composé. Une molécule équivalente, **BMS654457**, mais administrée *per os*, est également actuellement en cours de développement par BMS, et fait l'objet d'un essai clinique de **phase I** (Bristol-Myers Squibb, 2015).

3.2.2.2 ISIS-416858

Il s'agit d'une thérapie antisens, c'est-à-dire un brin d'acide nucléique synthétique complémentaire d'un ARNm humain et dont le rôle est d'inhiber l'expression du gène responsable d'une pathologie génétique. Notons qu'il ne s'agit pas d'un aptamère.

Dans le cas de cet oligonucléotide synthétique (ASO), celui-ci s'hybride avec l'ARNm qui, lorsqu'il est traduit, permet la synthèse du FXIa. L'adjonction d'un motif méthoxy-éthyl en 2' de cet oligonucléotide lui confère une longue demi-vie d'environ 14 heures (Büller *et al.,* 2015). Le mécanisme d'action de ISIS-416858 est présenté en figure 40 (Younis *et al.,* 2012 ; Denas et Pengo, 2013).

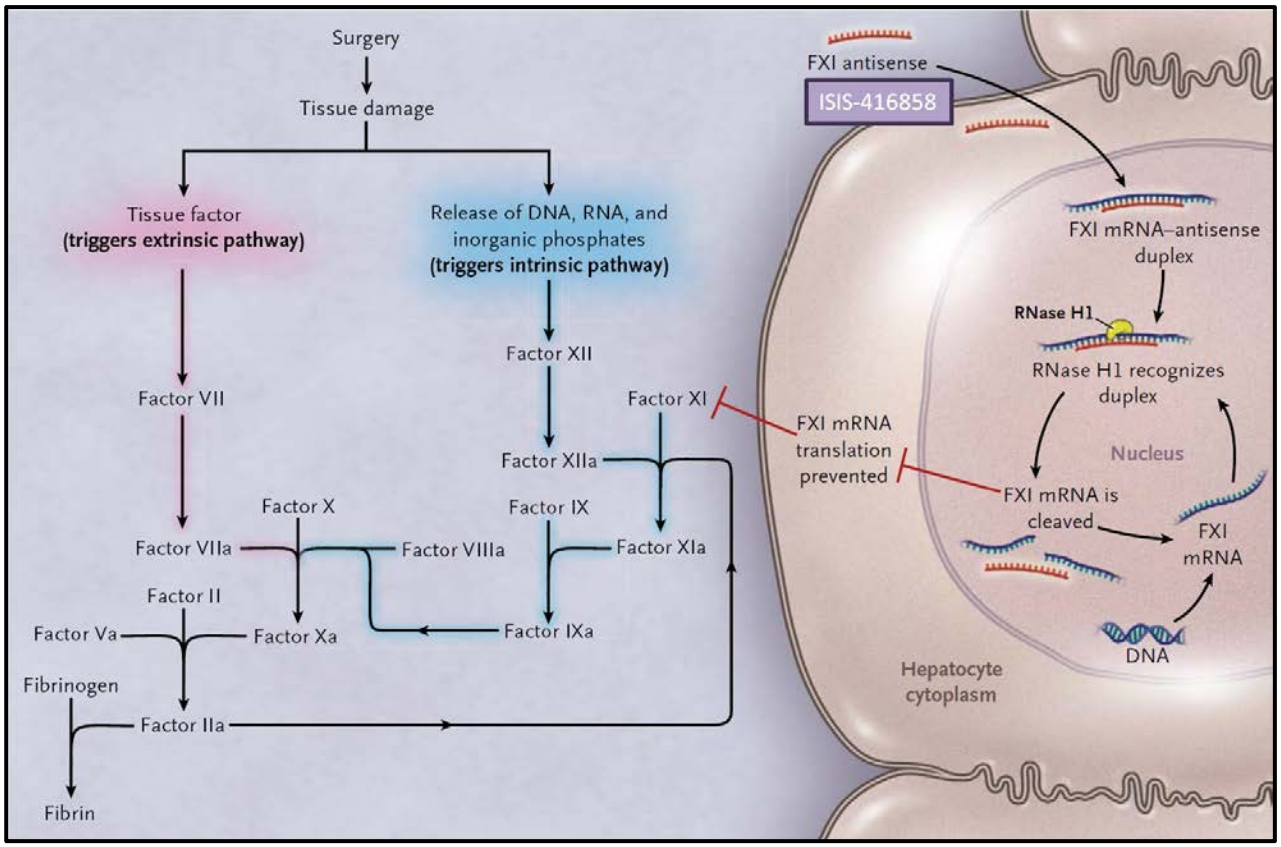


Figure 40 : Mécanisme d'action de ISIS-416858 (Büller *et al.,* 2015)

Les facteurs de la coagulation sont de bons candidats pour les thérapies antisens, principalement pour deux raisons (Denas et Pengo, 2013):

- les facteurs de la coagulation sont synthétisés par le foie et cet organe est particulièrement sensible aux thérapies antisens
- les ASO sont très spécifiques de leur cible, ce qui permet d'améliorer le profil de sécurité de ces médicaments

Pour exercer son action inhibitrice, un ASO doit traverser la membrane cellulaire afin d'atteindre l'ARNm cible. Aussi, pour chaque ASO est développé un véhicule afin de permettre que l'oligonucléotide ne soit pas dégradé par les nucléases endogènes avant que ce dernier n'atteigne sa cible (figure 40).

ISIS-416858, comme tous les ASO, est administré par voie IV. Cette molécule est développée par la société Isis Pharmaceuticals. Elle présente une puissante action antithrombotique dose-dépendante démontrée dans des modèles animaux de thrombose veineuse et artérielle. Cette action est semblable à celle de Warfarine ou de l'Enoxaparine, sans pour autant présenter de risque hémorragique. Plus précisément, lorsque ISIS-416858 a été administré chez des souris, une diminution importante du niveau d'ARNm du FXIa au niveau des hépatocytes a été observée, ainsi qu'une diminution du taux plasmatique et de l'activité du FXIa. Le TC+A est allongé tandis que le TQ reste inchangé lors de l'administration de cet ASO (H. Zhang *et al.,* 2010). Aucun effet hépatotoxique du composé n'a pu être mis en évidence chez le singe *Cynomolgus* (Younis *et al.,* 2012).

L'action antithrombotique d'ISIS-416858 est rapidement réversible lors de l'administration d'un concentré en facteur XI dérivant du plasma (Zhang *et al.,* 2010 ; Denas et Pengo, 2013).

Cet oligonucléotide a fait l'objet d'un essai de **phase I** chez des volontaires sains, afin d'en évaluer la tolérance et la sécurité à l'administration. La réduction de l'activité du FXIa par l'ASO était clairement dose-dépendante, et elle a atteint plus de 80 %. Aucun épisode hémorragique n'est survenu au cours de cet essai (Crosby *et al.,* 2013 ; Büller *et al.,* 2015).

Un essai de **phase II** (NCT01713361) a également été mené chez des patients bénéficiant d'une arthroplastie du genou. Il s'agissait d'un essai ouvert, randomisé qui inclut 300 patients. Ceux-ci recevaient l'une ou l'autre des deux doses de ISIS-416858 (200 ou 300 mg) ou 40 mg d'Enoxaparine (LOVENOX®) par voie IV une fois par jour. Le critère d'évaluation principal de l'étude était la survenue d'événements thromboemboliques. Les résultats obtenus sont synthétisés dans le tableau IX.

Tableau IX : Résultats de l'essai de phase II évaluant ISIS-416858 (Büller *et al.,* 2015)

	Evénements thromboemboliques	Episodes hémorragiques
200 mg de ISIS-416858 / jour (n = 134)	27 %	3 %
300 mg de ISIS-416858 / jour (n = 71)	4 %	3 %
40 mg d'enoxaparine / jour (n = 69)	30 %	8 %

Généralement, l'administration d'ISIS-416858 s'accompagne de moins d'épisodes hémorragiques que l'Enoxaparine, même si cette tendance n'est pas statistiquement significative. Toutefois, l'administration de 300 mg de cet ASO permet de réduire significativement la survenue d'événements thromboemboliques. L'administration de la dose de 200 mg n'était pas moins efficace que celle de 40 mg d'Enoxaparine. Par ailleurs, l'administration d'ISIS-416858 a pu s'accompagner de réactions modérées au site d'injection. Deux patients ayant reçu des injections journalières de 200 mg de l'ASO ont présenté une augmentation transitoire des transaminases sans retentissement clinique (Büller *et al.,* 2015).

L'administration d'ISIS-416858 a diminué le taux plasmatique de FXI, mais pas des autres facteurs impliqués dans la voie intrinsèque (FVIII, FIX et FXII). Notons enfin que d'autres ASO à visée antithrombotiques font actuellement l'objet de développement, notamment ciblant la thrombine, le FVII et FIX (Denas et Pengo, 2013).

Pour confirmer le succès de FXIa comme cible de nouveaux médicaments antithrombotiques, citons l'exemple de **BAY-1213790**, un anticorps monoclonal (IgG) dirigé contre le FXIa et développé par la société Bayer. Ce dernier fait actuellement l'objet d'un essai de **phase I** chez des volontaires sains. Cet anticorps a présenté des résultats précliniques encourageants, notamment une forte action antithrombotique dans des modèles de rongeurs. L'administration de cet anticorps n'augmente pas le risque hémorragique, y compris lorsque celui-ci est administré en surdosage et/ou en association avec un antiplaquettaire (Moeller, 2015).

3.3 Inhibition de la propagation

3.3.1 Molécules ciblant la thrombine

3.3.1.1 Historique

Au moment du développement des premiers aptamères à visée antithrombotique, la thrombine figurait parmi les cibles de choix pour des raisons évoquées précédemment. En 1992, Bock *et al.,* mettaient en évidence une séquence d'ADN simple brin (« GGTTGG ») commune à tous les aptamères sélectionnés contre la thrombine (Bock *et al.,* 1992). Après plusieurs années de développement, HD1, un aptamère de 15 nucléotides et de structure dite en « quadruplex-G » a été mis au point. Cet aptamère à ADN se lie à l'exosite 1 de la thrombine, un site de liaison secondaire différent du site actif. Un essai de **phase I** promu par les sociétés Archemix® et Nuvelo® n'a pas permis de montrer l'efficacité de cet aptamère dans un contexte de chirurgie cardiovasculaire de type pontage coronarien.

De ce fait, un aptamère divalent, se liant aux exosites 1 et 2 de la thrombine a été développé, associant HD1 et HD-22, également développé par Archemix® et Nuvelo®. HD22 possède une forte affinité pour sa cible (K_d = 0,65 nM). L'association des deux aptamères présente une plus grande affinité pour sa cible que chacun des deux aptamères individuellement. Des essais précliniques *in vitro* ont montré que HD1-22 possède des propriétés anticoagulantes comparables à la bivalirudine (ANGIOX®) et supérieures à Argatroban (ARGANOVA®). Avec une action et une réversibilité rapide, HD1-22 est un anticoagulant-candidat idéal dans un contexte où un traitement antithrombotique doit être administré et effectif rapidement. C'est par exemple le cas en chirurgie vasculaire. A ce jour, HD1-22 n'a pas encore fait l'objet d'essais cliniques.

3.3.1.2 ARC183

ARC183, également développé par les sociétés Archemix et Nuvelo, est un autre aptamère à ADN ciblant le site actif de la thrombine. Il inhibe l'activation du fibrinogène par la thrombine, ainsi que l'agrégation plaquettaire médiée par cette dernière. Cette molécule a fait l'objet de recherches précliniques, notamment sur des modèles canins et simiens[4] de coronopathies et sur des échantillons de plasma et de sang total humains. Ces recherches ont permis de montrer que ARC188 prolonge le TC+A de manière dose-dépendante (Li *et al.,* 2014b). De fait, un essai de **phase I** a été réalisé en 2004 et a permis de mettre en évidence l'efficacité de ce dernier comme anticoagulant. Il s'agissait d'un essai ouvert, par doses croissantes, avec l'objectif d'évaluer la tolérance, la sécurité, l'activité anticoagulante et la titrabilité d'ARC183. L'essai se composait de deux cohortes :

- Cohorte 1 : 40 volontaires sains
- Cohorte 2 : 16 patients atteints de coronopathies

Toutefois, les doses nécessaires d'ARC188 pour obtenir une anticoagulation satisfaisante étaient importantes, de sorte que le développement clinique de cette molécule s'est arrêté. L'administration de telles doses aurait exposé les patients à un risque hémorragique. Une deuxième génération d'aptamères ciblant la thrombine a alors vu le jour à l'occasion d'un nouveau partenariat de la société Nuvelo (Highland Capital Partners, 2005).

[4] En l'occurrence, des singes du genre *Cynomolgus*

3.3.1.3 NU172

NU172 fait partie de cette seconde génération. Il s'agit d'un aptamère à ADN de 26 nucléotides, non modifiés chimiquement, et développé par Nuvelo et ARCA Biopharma. En se liant à l'exosite 1 de la thrombine, NU172 empêche le fibrinogène de s'y fixer et donc d'y être clivé. Les AOD de la famille des –GATRAN (Dabigatran etexilate) se fixent quant à eux au niveau du site actif de la thrombine (Sundaram *et al.,* 2013), et la bivalirudine se fixe à la fois au site actif au à l'exosite 1 de la thrombine.

Des études précliniques réalisées en 2006 et 2007 avec des plasmas humains ont montré que le NU172 avait un effet anticoagulant rapide puis une normalisation rapide des temps de coagulation (TC+A, TQ). La courbe dose-réponse en fonction du temps est d'allure sigmoïde. Ces résultats suggèrent que cet aptamère pourrait trouver une indication dans un contexte où une anticoagulation rapide, voire d'urgence, doit être envisagée. C'est notamment le cas en chirurgie cardiovasculaire de type pontage coronarien ou intervention coronarienne percutanée. En outre, contrairement aux héparines, le NU172 ne semble pas provoquer de thrombocytopénie (Sundaram *et al.,* 2013).

Un premier essai clinique de **phase Ia**, réalisé chez des volontaires sains chez qui NU172 était administré en bolus par voie IV, visait à établir la preuve de concept. Cet essai a permis de conclure positivement quant à l'efficacité et la rapidité d'action anticoagulante de NU172. La réversibilité de cet effet anticoagulant est tout aussi rapide. Cette rapidité d'action et d'élimination s'explique par l'absence de modifications chimiques qui rend cet aptamère d'autant plus sensible aux nucléases (Gómez-Outes *et al.,* 2010). Par ailleurs, cet essai n'a pas permis de mettre en évidence d'effet indésirable sévère. Il a également été démontré chez ces volontaires sains que l'activité anticoagulante, évaluée par le TC+A, était proportionnelle à la dose injectée.

Un essai de **phase Ib** mené sur 24 volontaires sains ne conclut pas autrement quant à la réversibilité de l'action anticoagulante de NU172. La plus importante dose administrée était de 6,0 $mg.kg^{-1}$ induisant un TC+A de 130 à 178 secondes (soit cinq fois le niveau de base), et un TP de 56 à 92 secondes (soit cinq fois le niveau de base).

Enfin, un essai de **phase II** a débuté en décembre 2008, mais aucun patient n'avait été inclus en 2011. Cet essai, promu par ARCA Biopharma visait à évaluer le NU172 chez des patients bénéficiant d'un pontage coronarien. Il s'agissait d'un essai ouvert, non randomisé car ne proposant qu'un seul bras de traitement. Environ 30 patients devaient être inclus. Les objectifs étaient d'évaluer la sécurité et l'efficacité du NU172, ainsi que d'en établir le profil pharmacocinétique. Aucune information supplémentaire n'est disponible concernant cet essai. Le NU172 ne figure plus parmi les molécules en développement sur le site internet de la société ARCA Biopharma (http://www.arcabiopharma.com, consulté le 1er Août 2015). Le développement du NU172 semble donc être arrêté sans explications.

Le tableau X, présenté ci-dessous, reprend l'ensemble des aptamères ciblant la thrombine et leur phase de développement :

Tableau X : Aptamères ciblant la thrombine en phase de développement clinique

NOM	TAILLE	NATURE	CIBLE	PHASE DE DEVELOPPEMENT	REFERENCES
HD1	15 nt	ADN	Exosite 1	Phase I	Li *et al.,* 2014
HD22	15 nt	ADN	Exosite 2	Préclinique	Li *et al.,* 2014
HD1-22	30 nt	ADN	Exosite 1 et 2	Préclinique	Müller *et al.,* 2008
ARC183	15 nt	ADN	Site actif	Phase I	Li *et al.,* 2014
NU172	26 nt	ADN	Exosite 1	Phase II	Sundaram *et al.,* 2013

nt : nucléotides

3.3.1.4 Odiparcil

Il s'agit d'un β-D-xyloside qui promeut la synthèse de glycosaminoglycanes dermatan sulfate-*like*. Ces glycosaminoglycanes (GAG) favorisent l'inhibition de la thrombine *via* le cofacteur II de l'héparine (HCII). Cette molécule est administrée *per os* et est actuellement développée par la société Abbott.

Les β-D-xylosides ont été décrits pour la première fois par Bellamy *et al*, en 1993. Les cellules de l'organisme y sont perméables. Ils agissent comme substrat de la galactosyltransferase I. En interagissant avec les processus endogènes de synthèse des glycosaminoglycanes, ces agents promeuvent leur synthèse. Les GAG sont ainsi synthétisés au niveau du système vasculaire et présentent des propriétés antithrombotiques dans la mesure où ils activent partiellement le cofacteur II de l'héparine (HCII). Ces GAG ont une activité proche de celle du dermatane sulfate (Samama et Gerotziafas, 2007). Il est émis l'hypothèse que ces composés anticoagulants auraient également des propriétés antiplaquettaires et thrombolytiques mais il n'a pas encore été possible de mettre en évidence de telles caractéristiques (Bellamy *et al.,* 1993 ; Masson *et al.,* 1995 ; Toomey *et al.,* 2006).

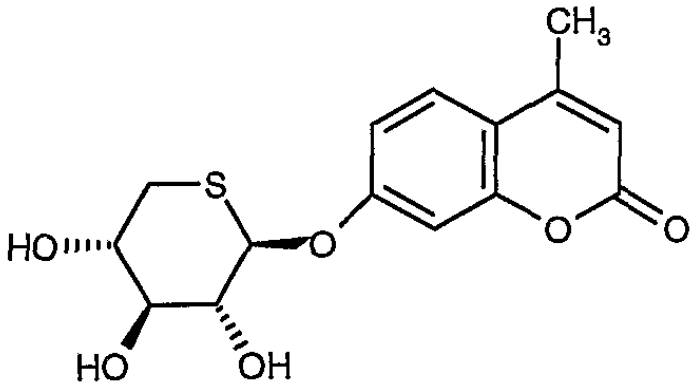


Figure 41 : Formule d'Odiparcil (Dubb *et al.,* 2006)

Les études précliniques chez le rat ont permis de montrer que l'inhibition de la formation du thrombus par l'administration orale d'Odiparcil (figure 41) était dose-dépendante. En raison de son mécanisme d'action, la molécule inhibe la formation d'un thrombus de 65 à 70 % sans accroitre le risque hémorragique. Ce mécanisme est donc saturable. Par ailleurs, le délai d'action d'Odiparcil est relativement long, et comparable à celui des AVK tels que Warfarine. Le sulfate de protamine agit comme un antidote partiel à l'activité anticoagulante d'Odiparcil (Toomey *et al.,* 2006).

Des essais de **phase I** ont été promus par la société GSK, pour la prévention de la thrombose chez des patients présentant une fibrillation auriculaire, ou dans la prévention de la TVP et de l'AVC.

Dans un essai de **phase II** (NCT00240643) visant à déterminer les propriétés pharmacocinétique et pharmacodynamique, ainsi que la tolérance à l'administration d'Odiparcil, ce dernier a été évalué chez des patients présentant une fibrillation auriculaire ou un risque intermédiaire d'AVC. Il s'agissait d'un essai randomisé, en double-aveugle, contre placebo. Cet essai a mis en évidence le manque d'efficacité de cette molécule, ce qui est à l'origine de l'arrêt de son développement en 2008 (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

3.3.2 Analogue recombinant de la thrombomoduline

La thrombomoduline alpha, encore appelée RECOMODULIN® est un analogue recombinant du domaine extracellulaire de la thrombomoduline. Physiologiquement, la thrombine se lie, *via* son exosite 1, au domaine extracellulaire de la thrombomoduline (Kearon *et al.,* 2005). Développée par la société Asahi Kasei Pharma, la thrombomoduline alpha est commercialisée au Japon depuis 2008 pour une indication dans la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Elle fait actuellement l'objet d'un essai de **phase III** aux Etats-Unis pour le traitement de patients atteints de sepsis sévère (NCT01598831).

Ce composé a montré son efficacité dans des modèles animaux de CIVD, notamment chez le rat et le singe, sans pour autant augmenter le risque hémorragique. La figure 42 explicite son mécanisme d'action. La thrombomoduline alpha se lie à la thrombine et active ainsi la protéine C. Cette dernière clive les cofacteurs FVIIIa et FVa, ce qui empêche la génération de thrombine (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

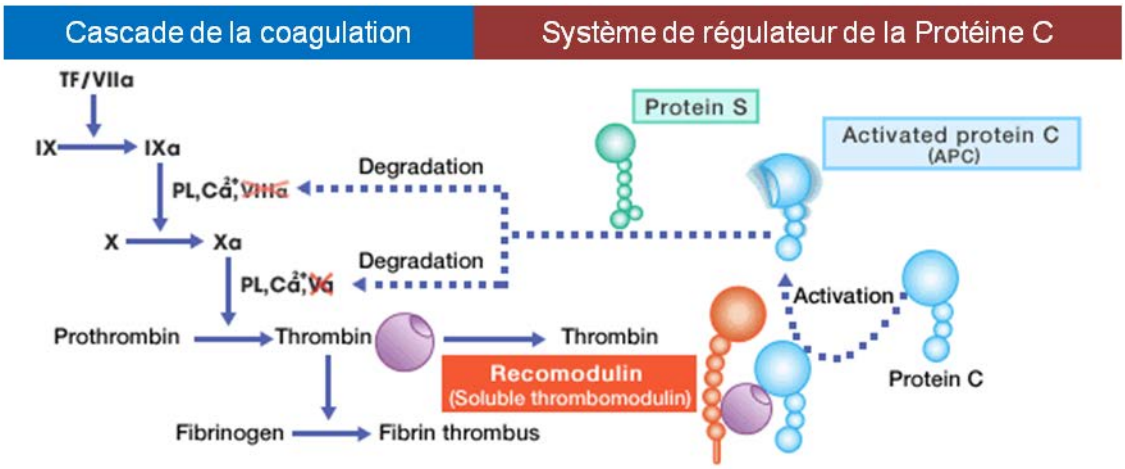


Figure 42 : Mécanisme d'action de RECOMODULIN (Asahi KASEI, 2015)

La thrombomoduline alpha est administrée par injection sous-cutanée. Elle présente une biodisponibilité de près de 66 % et sa demi-vie est de l'ordre de 2 à 3 jours.

Un essai de **phase I** a permis de mettre en évidence la longue demi-vie de la thrombomoduline alpha. Un essai de **phase IIa**, qui inclut 312 patients bénéficiant d'une arthroplastie de la hanche, a permis de montrer l'efficacité antithrombotique de ce composé. Il s'agissait d'un essai ouvert où deux doses de thrombomoduline alpha ont été évaluées (0,3

$mg.kg^{-1}$ et 0,45 $mg.kg^{-1}$). Cet essai a également permis de montrer que les propriétés thromboprophylaxiques de la molécule étaient dose-dépendantes (Kearon *et al.,* 2005).

Cette molécule antithrombotique a également fait l'objet d'un essai de **phase IIb** multicentrique, randomisé, en double-aveugle, contre placebo. Cet essai inclut 750 patients en situation de sepsis et considérés à risque de développer une CIVD. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité et la sécurité à l'administration de thrombomoduline alpha à la dose de 0,06 $mg.kg^{-1}$. Le critère principal d'évaluation était la mortalité à 28 jours. Cette étude a conclu qu'il n'y avait pas de différence significative entre les deux bras de traitement pour le critère principal, ni pour la survenue d'événements thrombotique ou hémorragique. Biologiquement, les patients recevant la thrombomoduline alpha présentaient des taux plasmatique plus faibles de D-dimères ou de fragments F1+2 de la prothrombine. Toutefois, une étude *post-hoc* a permis de montrer que l'administration de cet antithrombotique était bénéfique pour les patients présentant un dysfonctionnement pour au moins un organe, et un INR supérieur à 1,4 (Vincent *et al.,* 2013).

Enfin, au vu de ces résultats cliniques, RECOMODULIN a été évalué dans le cadre d'un essai de **phase III** qui lui permit d'obtenir une AMM pour le Japon. Cette étude multicentrique, randomisée, en double-aveugle inclut 234 patients présentant une CIVD d'origine septique ou maligne. La thrombomoduline alpha a été évaluée à différentes doses allant de 0,06 à 6 $mg.kg^{-1}$ par jour, contre l'instauration d'une héparinothérapie à faible dose (8 $U.kg^{-1}.h^{-1}$). Le critère principal d'évaluation était la résolution de la CIVD 28 jours après administration du traitement. La CIVD était résolue dans 66,1 % des cas avec la thrombomoduline alpha, contre 49,9 % avec l'héparine. Les événements hémorragiques étaient moins nombreux qu'avec l'héparine (Saito *et al.,* 2007).

Cette étude n'a toutefois pas permis de démontrer l'efficacité et la sécurité d'administration de la thrombomoduline alpha chez des patients présentant une insuffisance rénale, hépatique ou plus généralement présentant un état clinique grave. Le ministre japonais de la santé a alors décidé, en 2008, d'autoriser la mise sur le marché du médicament à condition que des études post-approbation soient menées dans les années qui suivent sa commercialisation, afin de prouver l'efficacité et la sécurité de la thrombomoduline alpha. Ces études tendent à montrer que l'administration de cette molécule augmente significativement le nombre de CIVD résolues, comparativement à une héparinothérapie (Mimuro *et al.,* 2013 ; Eguchi *et al*., 2014).

Notons également l'existence d'une forme recombinante de la thrombomoduline humaine, nommée SOLULIN®. Le développement de cette molécule, assuré par la société Paion, a été arrêté en 2013 pour des raisons financières. Deux essais de phase I ont été promus pour cette molécule qui était administrée pour le traitement de l'hémophilie de type A. Notons également que certaines études précliniques visaient à évaluer l'efficacité antithrombotique de SOLULIN® dans des modèles animaux d'AVC (van Iersel *et al.,* 2011 ; Ryang *et al.,* 2011 ; Foley *et al.,* 2012).

3.3.3 Inhiber le FVIII

Certains patients développent des anticorps dirigés contre des facteurs de la coagulation. Ces « auto-anticorps » inhibent tout ou partie de l'activité du facteur cible, ce qui induit un risque d'épisodes hémorragiques. Il s'agit des hémophilies acquises. C'est grâce à l'étude de ces patients et des anticorps qu'ils développent contre le FVIII qu'a pu être développé TB-402. Il s'agit du premier inhibiteur de FVIII développé dans une indication antithrombotique. Les patients présentant une hémophilie acquise modérée telle que le rapport FVIII:C soit de 6 % / 49 %, ne présentent pas d'épisodes hémorragiques spontanés (Verhamme *et al.,* 2010).

TB-402 est un anticorps monoclonal, une IgG_4 humanisée qui inhibe partiellement le FVIII. Cet anticorps n'inhibe pas l'interaction du FVIII avec le vWF, mais il en inhibe l'activité d'environ 40 %. La demi-vie de ce composé est de l'ordre de trois semaines (22,9 jours), ce qui permettrait d'en limiter la fréquence des injections (Verhamme *et al.,* 2010 ; Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

Ce composé est développé par les sociétés Vioinvent et ThromboGenics. L'anticorps est spécifique du domaine C1 du FVIII. Son prédécesseur, TGX-LE2E9 était développé pour la thromboprophylaxie de patients présentant un risque de TVP, ou encore dans la prévention de l'AVC de patients présentant une fibrillation auriculaire (Verhamme *et al.,* 2010 ; Verhamme *et al.,* 2011).

Lors d'études précliniques *in vivo*, il a été montré que le niveau d'inhibition de l'activité du FVIII par TB-402 atteignait un plateau aux alentours de 40 %. En augmentant les doses administrées d'anticorps, l'effet anticoagulant est prolongé, ce qui présente un intérêt pour la fréquence d'administration de cette molécule. Les mêmes observations ont été faites au cours d'un essai de **phase I** chez des volontaires sains. Par ailleurs, une inhibition partielle de l'activité du FVIII permet de limiter l'inhibition des phénomènes de la coagulation et donc de pouvoir conserver les phénomènes hémostatiques à un niveau physiologique (Verhamme *et al.,* 2010).

Cet anticorps monoclonal a fait l'objet d'un essai de **phase I** chez des volontaires sains afin d'évaluer la tolérance du composé, ainsi qu'à en dresser les profils pharmacocinétique et pharmacodynamique. Cette étude inclut 56 volontaires sains. Il a été montré que les doses administrées diminuaient de 30 à 60 % l'activité basale du FVIII. Le TC+A était significativement prolongé sur une période d'au moins quatre semaines. Par ailleurs, parmi les effets indésirables les plus fréquents mis en évidence, citons des céphalées (29 %) et l'apparition d'hématomes au point d'injection (18 %). Les auteurs conclut à une bonne tolérance de la molécule (Verhamme *et al.,* 2010 ; Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

Un essai de **phase II** ouvert, randomisé a consisté en l'administration IV d'une unique dose de TB-402 (de 0,3 à 1,2 $mg.kg^{-1}$) en comparaison à l'administration d'Enoxaparine chez 316 patients bénéficiant d'une arthroplastie du genou. Cette étude avait pour objectif d'en évaluer l'efficacité et la sécurité à l'administration. Près de 39 % des patients ayant reçu l'Enoxaparine ont présenté une TVP après la chirurgie, contre 16,7 %, 29,9 % et 24,1 % pour des doses de TB-402 de 0,3 $mg.kg^{-1}$, 0,6 $mg.kg^{-1}$ et 1,2 $mg.kg^{-1}$. Pour ces mêmes doses de TB-402, des épisodes hémorragiques sont apparus pour respectivement 4,0 %, 5,4 % et 8,0 % contre 3,8 % avec l'héparine. Les auteurs de l'étude concluent qu'il n'y a pas de relation dose-réponse quant à l'efficacité de l'anticorps monoclonal, mais qu'en revanche il existe une

relation dose-réponse quant à la survenue d'épisodes hémorragiques (Verhamme *et al.,* 2011 ; Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

L'ouverture aux inclusions d'un essai de **phase III** évaluant le TB-402 pour le traitement de la TVP devait avoir lieu au deuxième trimestre de 2011. Toutefois, les deux firmes co-développant le TB-402 ont fait le choix de stopper son développement.

3.3.4 La Protéine C recombinante

Le composé 3K3A-APC est un variant génétiquement modifié de la protéine C (figure 43) humaine de 405 acides aminés. Ce dernier possède le même mécanisme d'action que la protéine C activée en conditions physiologiques, c'est-à-dire l'inhibition par clivage protéolytique des facteurs Va et VIIIa. Il présente, par ailleurs, des propriétés cytoprotectrices, antiapoptotiques et anti-inflammatoires. Notons que les propriétés cytoprotectrices de ce composé s'expliquent par sa capacité à activer le récepteur PAR-1. Notons également que 3K3A-APC a été conçu de sorte à limiter son action anticoagulante, au profit de ses propriétés cytoprotectrices (Lyden *et al.,* 2013 ; Mosnier *et al.,* 2013). Pour ce faire, trois résidus lysine d'une forme recombinante de la protéine C humaine ont été remplacés par trois résidus alanine. Cette modification altère le site de liaison de la protéine C avec le FVa (figure 43) (Williams *et al.,* 2012).

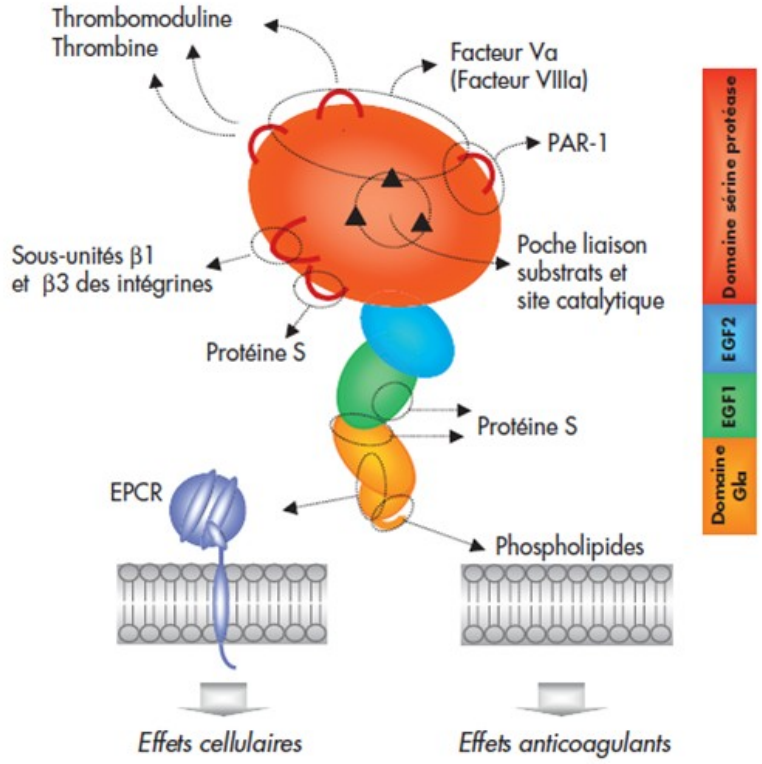


Figure 43 : Structure de la PC/PCa (Gandrille, 2012)

Développé par la société ZZ Biotech, 3K3A-APC a présenté des résultats précliniques prometteurs pour le traitement de l'AVC. L'administration de ce variant de la protéine C présente un moindre risque hémorragique, comparativement à la protéine C recombinante (Dotrecogine alpha). Ces propriétés particulières sont dues aux trois résidus lysines en positions 191 – 193, qui sont remplacés par des résidus alanine pour 3K3A-APC, ce qui le différencie de Dotrecogine alpha. Cette modification structurale confère à ce variant les

mêmes propriétés cytoprotectrices que la protéine C activée humaine, mais ne conserve qu'environ 10 % de son action anticoagulante, ce qui explique le moindre risque hémorragique au cours de son administration (Williams *et al.,* 2012 ; Lyden *et al.,* 2013 ; Mosnier *et al.,* 2013). Ce composé n'est donc pas réellement développé comme une molécule anticoagulante.

Lorsque 3K3A-APC est co-administré avec un thrombolytique chez un modèle murin d'AVC, ce variant de la protéine C est plus bénéfique que le traitement thrombolytique seul (Mosnier *et al.,* 2013). Ainsi, 3K3A-APC est capable de contrebalancer la tendance des thrombolytiques à provoquer des microhémorragies intracrâniennes, du fait de son effet protecteur de l'endothélium vasculaire. Cette molécule est donc considérée comme neuroprotectrice. C'est pourquoi la co-administration de 3K3A-APC et de thrombolytiques a été évaluée au cours d'études précliniques (Williams *et al.,* 2012 ; Mosnier *et al.,* 2013 ; Griffin, Zlokovic et Mosnier, 2015)

Au cours d'un essai de **phase I** (NCT01660230), randomisé, en double-aveugle, contre placebo, ce variant de la protéine C humaine a été administré par voie IV chez 64 volontaires sains. L'objectif de cette étude était d'évaluer la tolérance et le profil pharmacocinétique de cette molécule, à sept doses (6 à 720 $g.kg^{-1}$). Peu d'effets indésirables ont été observés, hormis quelques céphalées et nausées pour deux volontaires ayant reçu une dose de 720 $g.kg^{-1}$. La dose maximale tolérée a donc été déterminée à 540 $g.kg^{-1}$. Par ailleurs, la concentration plasmatique en 3K3A-APC augmente de manière dose-dépendante. Une faible augmentation du TC+A a été observée. La demi-vie du composé est de l'ordre de 16 minutes (Lyden *et al.,* 2013).

De plus, 3K3A-APC fait actuellement l'objet d'un essai de **phase II** (NCT02222714). Cette étude randomisée, en double-aveugle et multicentrique vise à évaluer la sécurité à l'administration, le profil pharmacocinétique ainsi que l'efficacité de ce composé, administré à doses croissantes. Cette molécule est ici évaluée dans le traitement de l'AVC aigu chez 100 patients. Quatre doses seront évaluées (120 à 540 $\mu g.kg^{-1}$), administrées cinq fois en bolus. Le critère d'évaluation principal de cette étude est la survenue d'effets indésirables. La clôture des inclusions interviendra vraisemblablement en mars 2017.

3.4 Conclusion

La figure 44 synthétise l'ensemble des molécules anticoagulantes présentées précédemment, ainsi que leurs cibles pharmacologiques.

L'énumération de ces molécules rend compte de l'importance des aptamères dans les molécules antithrombotiques actuellement en développement clinique. Globalement, les molécules aptamériques présentent une bonne efficacité et peu ou pas d'effets indésirables. Elles sont particulièrement spécifiques de leur cible pharmacologique. Il faut cependant rester prudent concernant ces molécules et poursuivre les études cliniques afin de confirmer leur efficacité anticoagulante et leur relative innocuité. Par ailleurs, les aptamères sont développés dans de nombreuses autres indications, notamment en cancérologie.

Les essais cliniques ont permis de montrer que les molécules anticoagulantes ciblant des facteurs de la coagulation intervenant dans la phase d'initiation, c'est-à-dire en amont du

phénomène, ne rencontrent pas particulièrement plus de succès que des molécules ciblant des facteurs plus en aval de la coagulation.

Enfin, notons les bons résultats cliniques de 3K3A-APC, dont le développement fait suite à l'échec de Dotrecogine alpha, protéine C recombinante retirée du marché de l'Union Européenne en 2010. La molécule 3K3A-APC, en tant que variant de la protéine C activée, expose à un moindre risque hémorragique que Dotrecogine alpha. En effet, son effet anticoagulant a été diminué de 90 %, au profit de ses propriétés cytoprotectrices.

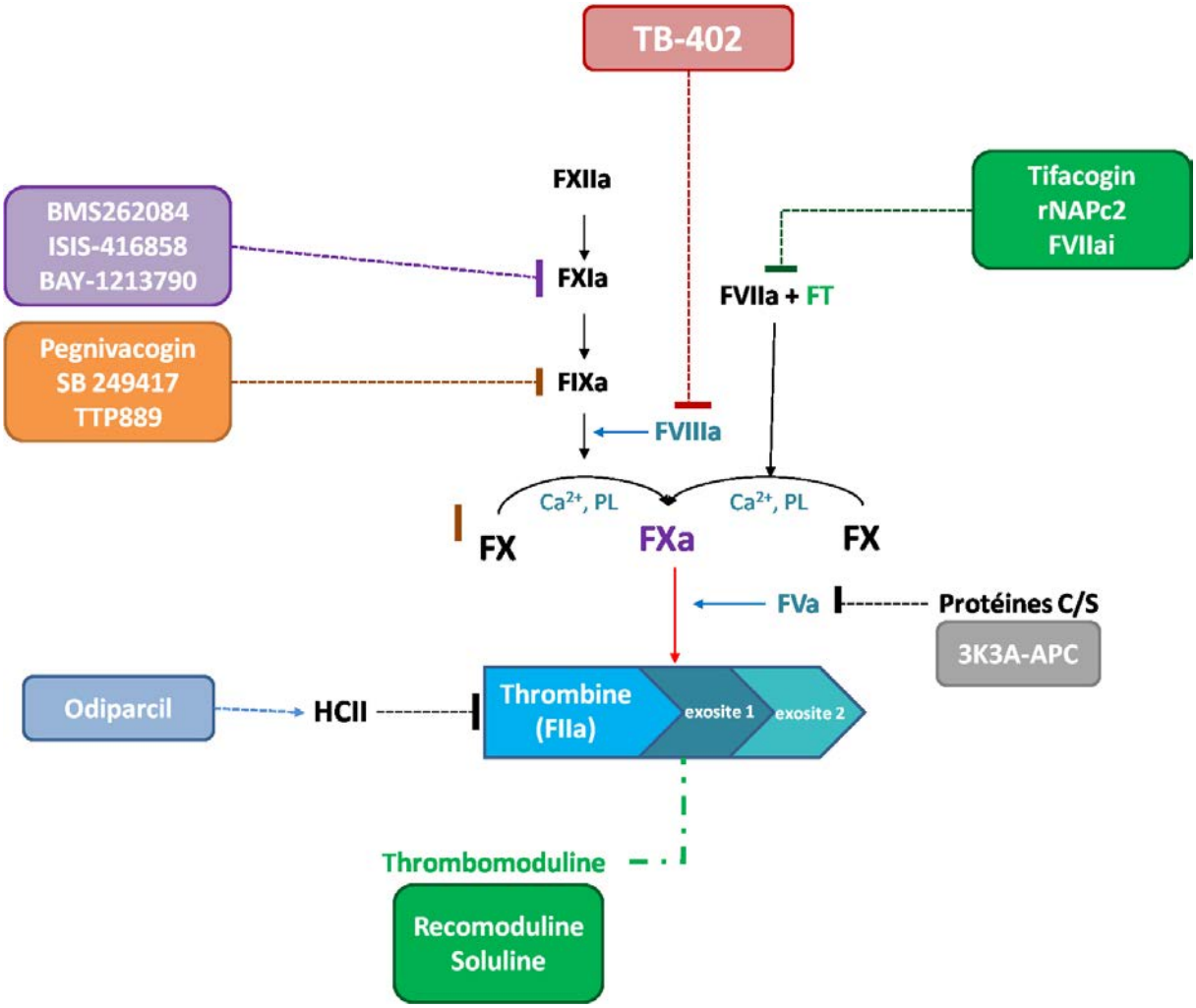


Figure 44 : Synthèse des molécules anticoagulantes faisant actuellement l'objet de recherche clinique, et de leurs cibles pharmacologiques

Plus généralement, nous nous étonnons du nombre de molécules anticoagulantes présentées ici et pour lesquelles le développement clinique s'est arrêté sans explication. Ces interruptions brusques pourraient traduire la survenue d'effets indésirables au cours des essais cliniques menés sur ces molécules.

4- FIBRINOLYSE

4.1 Molécules promouvant la fibrinolyse endogène

4.1.1 Les inhibiteurs du TAFIa

La TAFIa et son rôle dans la fibrinolyse ont été mis en évidence récemment (Bajzar et Nesheim, 1993). Depuis qu'il est admis que son inhibition constitue une approche intéressante pour le développement de médicaments thrombolytiques, plusieurs types de molécules ont été développés. Citons notamment des anticorps dirigés contre le TAFIa, ainsi que des « nanocorps ». Toutefois, d'un point de vue clinique, ce sont de petites molécules inhibitrices du TAFIa qui se sont avérées les plus pertinentes (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

Une molécule développée par la société Daiichi Sankyo a déjà fait l'objet d'un essai de **phase I**. Il s'agit de DS-1040, un inhibiteur du TAFIa issu de synthèse chimique. Cette molécule pourrait trouver une indication dans le traitement de l'AVC. L'étude de phase I dont a fait l'objet DS-1040 (NCT02071004) était un essai ouvert, non-randomisé, à dose-unique, ayant pour objectif d'évaluer la tolérance et la sécurité à l'administration de 6 mg de DS-1040, par voie IV chez 18 volontaires sains, après 15 jours de traitement par aspirine. L'étude s'est terminée en février 2014 et les résultats ne sont pas publiés à ce jour (Daiichi Sankyo CO, LTD, 2015).

Toutefois, des études précliniques ont permis de montrer que l'administration d'inhibiteurs du TAFIa chez certains mammifères aboutissait paradoxalement à l'augmentation de l'activité du TAFIa. Ceci pourrait s'expliquer par certaines modulations allostériques du site actif du TAFIa lorsque de faibles doses de ces molécules inhibitrices sont administrées chez l'animal. Si ce phénomène était observé pour tous les inhibiteurs du TAFIa, notamment lorsqu'ils sont administrés chez l'Homme, la détermination d'une dose thérapeutique optimale pourrait s'avérer problématique (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

4.1.2 Les inhibiteurs du PAI-1

Les molécules inhibitrices du PAI-1 ont fait l'objet de recherches précliniques. Actuellement, de nombreuses molécules ayant la capacité d'inhiber le PAI-1 sont développées. Il s'agit à la fois de peptides de synthèse, mais également de petites molécules issues de synthèse chimique, d'aptamères, d'anticorps monoclonaux ou de composés naturels. Toutefois, parmi toutes ces molécules, seules deux font actuellement l'objet de développement clinique comme molécules thrombolytiques. D'autres inhibiteurs de PAI-1 sont actuellement développés comme antiangiogéniques, notamment dans le traitement des carcinomes hépatocellulaires (Rouch *et al.,* 2015).

Les deux molécules thrombolytiques actuellement développées comme inhibiteurs de PAI-1 sont Tiplasinin (PAI-039) et Diaplasinin (PAI-749) (figure 45). Toutes deux appartiennent à la société Pfizer et toutes deux ont fait l'objet d'un essai de **phase I** (Rouch *et al.,* 2015).

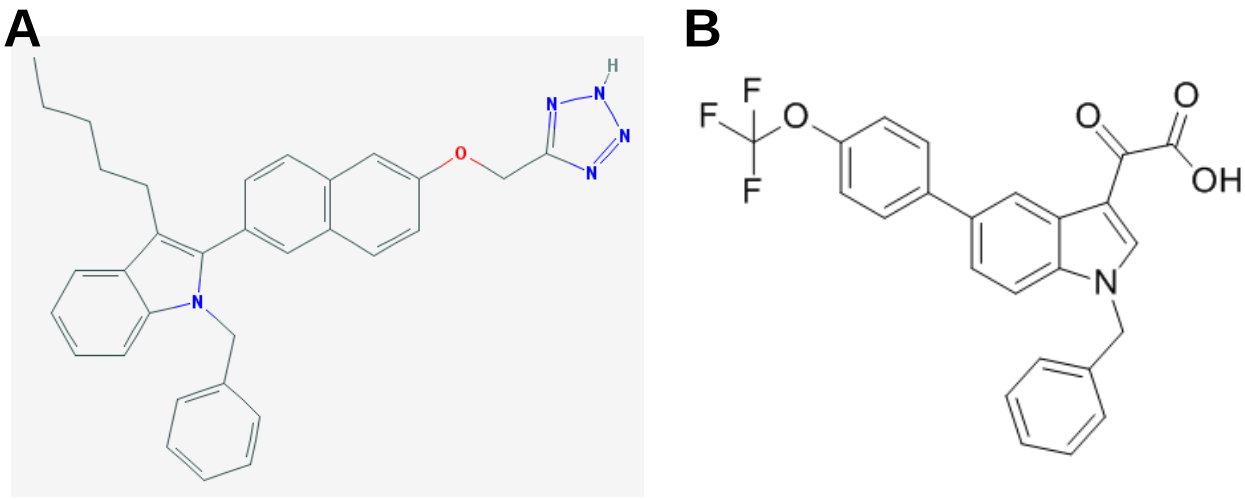


Figure 45 : Formules de Diaplasinin (A) et Tiplasinin (B) (Lloyd *et al.,* 2015)

Ces deux molécules sont administrées par voie orale. Tiplasinin a été testée à des doses de 10 à 1 500 mg chez des volontaires sains, sans que des effets indésirables aient pu être démontrés. L'essai de phase I concernant Diaplasinin a permis de montrer que son administration permettait de réduire les événements athérothrombotiques (Lloyd *et al.,* 2015).

Le faible succès des inhibiteurs de PAI-1 au cours des essais cliniques menés à ce jour pourrait s'expliquer par l'instabilité de la molécule de PAI-1 lorsqu'elle circule dans le plasma. En effet, cette dernière change rapidement de conformation pour adopter une forme latente, non sensible à ses inhibiteurs. Ceci explique que la structure exacte du PAI-1 ne soit pas encore connue, ainsi que le site de liaison des inhibiteurs de PAI-1 sur ce dernier (Rouch *et al.,* 2015).

4.2 Molécules thrombolytiques

4.2.1 La plasmine et ses dérivés

Dans les années 1950, la plasmine était particulièrement étudiée comme agent thrombolytique. C'est ainsi qu'a été développée la « thrombolysine » aux Etats-Unis par la société Merck Sharp & Dohme. La thrombolysine consistait en une préparation enzymatique de streptokinase et de plasminogène. Cette préparation a été administrée chez des modèles précliniques et chez des patients, ce qui a permis de mettre en évidence son efficacité. Cependant, le développement de cette préparation a été interrompu, au profit des activateurs du plasminogène pour plusieurs raisons (Dellon, Curtis et Chen, 1979 ; Marder et Novokhatny, 2010) :

- la plasmine administrée par voie IV était immédiatement inhibée par l'α2-antiplasmine de l'organisme
- les activateurs du plasminogène n'exercent leur action qu'au niveau du plasminogène lié à la fibrine du thrombus

- les résultats des essais cliniques menés pour les activateurs du plasminogène étaient plus probants que ceux de la thrombolysine.

La plasmine est une peptidase qui a physiologiquement une action fibrinolytique. Il semble donc pertinent que des thérapeutiques utilisant la plasmine humaine ou des formes recombinantes de celles-ci aient été développées comme traitement fibrinolytique. Les molécules dérivant de la plasmine faisant actuellement l'objet de développement comme agents fibrinolytiques sont : la plasmine elle-même, la mini-plasmine, micro-plasmine, delta-plasmine et l'Alfiméprase. Ce dernier sera présenté plus loin. De plus, seules la plasmine entière (figure 46A) et la micro-plasmine (figure 46B) ont, à ce jour, fait l'objet d'essais cliniques (Marder et Novokhatny, 2010).

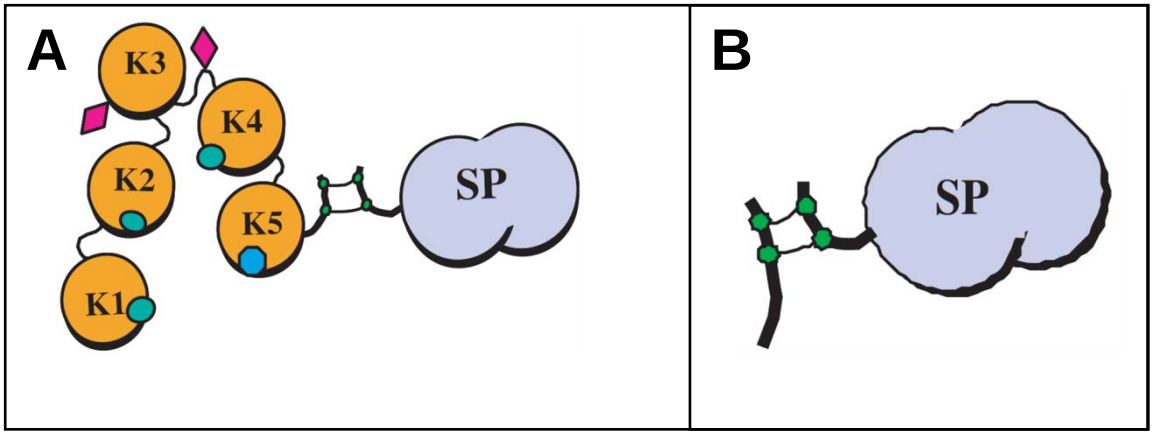


Figure 46 : Schéma de la plasmine (A) et de la micro-plasmine (B) (Marder et Novokhatny, 2010)
Les cercles sur les kringles représentent les sites de liaison à la lysine, les losanges représentent les glucides
K : *kringles* ; **SP** : sérine-protéase

4.2.1.1 Plasmine

La plasmine entière possède une masse moléculaire de 82 kDa. Elle est composée de deux sous-unités reliées entre elles par deux ponts disulfures (figure 46A). Lorsqu'elle est utilisée comme traitement fibrinolytique, la plasmine peut dériver de plasma humain, ou bien il peut s'agir d'une forme recombinante, ou encore d'une forme transgénique. Toutefois, actuellement seule la plasmine dérivant de plasma humain et purifiée par chromatographie d'affinité, fait réellement l'objet d'essais cliniques (Marder et Novokhatny, 2010).

La chaîne légère située en C-terminal (25 kDa) contient la région à activité sérine protéase et qui confère à la plasmine son action fibrinolytique. Le t-PA et/ou l'u-PA activent le plasminogène en plasmine. La liaison de la plasmine à la fibrine d'un thrombus est permise par des sites de liaison à la lysine présents sur les *kringles* qui constituent la plasmine (Marder et Novokhatny, 2010). La liaison la plus forte est établie avec le *kringle* 1 qui se lie également à l'inhibiteur physiologique de la plasmine, l'α2-antiplasmine. L'inhibition de l'action de la plasmine dans le plasma est très rapide (10^7 $M^{-1}.s^{-1}$) (Marder et Novokhatny, 2010).

Une plasmine entière (**BAY-57-9602** ou **TAL-05-00018**), dérivant de plasma humain, fait actuellement l'objet d'essais cliniques. Cette plasmine est développée par les sociétés Talecris Biotherapeutics Inc. et Grifols. Elle a été évaluée pour la sécurité de son administration chez 30 patients présentant une thrombose au niveau de la jonction avec un

rein greffé. Il s'agissait d'un essai ouvert, non randomisé, de **phase I**. Six doses de plasmine ont été administrées en perfusions de 30 minutes (1 à 24 mg). L'étude a permis de mettre en évidence une relation dose-efficacité quant à la capacité de cette plasmine à fibrinolyser le thrombus formé. La lyse du caillot atteignait plus de 75 % pour les patients ayant reçu 24 mg de plasmine. Il n'a pas été observé de changement de concentrations plasmatiques d'α2-antiplasmine et de fibrinogène. Il n'y a pas eu d'événement hémorragique sévère ni de décès. Toutefois, notons que la sécurité à l'administration de cette plasmine n'a pas été évaluée pour la plus haute dose (24 mg) (Shlansky-Goldberg *et al.,* 2008).

Par la suite, un essai de **phase I/IIa** (NCT00418483) a été mené chez 83 patients présentant une ischémie des membres inférieurs. Sept doses de plasmine, de 25 à 175 mg ont été évaluées à l'occasion de cette étude non randomisée, ouverte et visant à évaluer l'efficacité et la sécurité à l'administration de la plasmine dans cette indication. Le critère principal d'évaluation de l'étude était l'efficacité de la thrombolyse. L'étude a permis de tirer les mêmes conclusions que celles présentées précédemment en termes de tolérance, de sécurité et d'efficacité (Shlansky-Goldberg *et al.,* 2008). Par ailleurs, les essais de **phase II** ont permis de montrer la bonne tolérance et une sécurité à l'administration satisfaisante de cette plasmine. Ainsi, elle doit faire l'objet d'un essai de **phase III** au cours de l'année 2015 (Lloyd *et al.,* 2015).

4.2.1.2 Micro-plasmine

La micro-plasmine (figure 46B) est issue du clivage de la plasmine. Il s'agit donc d'une forme recombinante de cette dernière. Elle ne comporte que le domaine à activité sérine-protéase de la plasmine et sa masse moléculaire est de 29 kDa. Son inhibition dans le plasma par l'α2-macroglobuline, et dans une moindre mesure par α2-antiplasmine est rapide (10^7 $M^{-1}.s^{-1}$). La micro-plasmine ne comportant pas les kringles de la plasmine, cette dernière ne se lie pas à la fibrine (Marder et Novokhatny, 2010). L'administration de micro-plasmine vise donc à neutraliser l'α2-antiplasmine présente au niveau d'un thrombus, de sorte que la plasmine endogène puisse exercer son action fibrinolytique.

Des essais précliniques ont permis de mettre en évidence l'efficacité de la microplasmine. Cela a notamment été le cas avec un modèle de thrombose, chez le lapin, où il a été possible de montrer que la lyse du thrombus atteignait 64 % et était dose-dépendante. L'administration de micro-plasmine n'a pas eu d'effet sur le temps de saignement (Nagai *et al.,* 2003).

La micro-plasmine a fait l'objet d'un essai de **phase I** visant à évaluer la tolérance de son administration à différentes doses chez des volontaires sains, ainsi que sa capacité à neutraliser l'α2-antiplasmine. Cette étude était randomisée, en double-aveugle, contre placebo et a permis de mettre en évidence la bonne tolérance de la micro-plasmine chez ces volontaires sains. Par ailleurs, la micro-plasmine neutralise l'α2-antiplasmine de manière dose-dépendante (Pakola *et al.,* 2009).

Cette dernière a été évaluée chez des patients qui présentaient une thrombose d'une artère cérébrale basilaire, au cours d'un essai de **phase IIa** (NCT00123266). Toutefois les résultats de cette étude n'ont pas encore été publiés. En revanche, la micro-plasmine a également été évaluée au cours d'un essai multicentrique de **phase II** qui inclut 40 patients

présentant un AVC. Il s'agissait d'une étude randomisée, en double-aveugle, contre placebo[5]. Trois doses de micro-plasmine ont été testées, de 2 à 4 $mg.kg^{-1}$. Cet essai avait pour objectif d'évaluer la tolérance et l'efficacité de la micro-plasmine chez ces patients. L'étude conclut à une bonne tolérance de la molécule et à la neutralisation de l'α2-antiplasmine ainsi qu'une diminution du taux plasmatique de fibrinogène (Thijs *et al.,* 2009).

4.2.2 Alfiméprase

Alfiméprase est une forme recombinante tronquée de la fibrolase développée par la société Nuvelo Inc. La fibrolase est une métalloprotéase à zinc présente dans le venin de *Agkistrodon contortrix contortrix*, le « serpent cuivré » de la famille des *Viperidae*. Alfiméprase est identique à la fibrolase, sauf pour deux acides-aminés au niveau de la terminaison $–NH_2$, ce qui permet d'obtenir une molécule plus stable dans le temps, autorisant ainsi son stockage. Alfiméprase est constitué de 203 acides aminés. Cette molécule clive directement les chaînes α de la fibrine et du fibrinogène sans interaction avec le plasminogène. Le peptide clive également les chaînes β mais dans une moindre mesure, et il n'a aucune action sur les chaînes γ (Markland et Swenson, 2010 ; Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

Cette molécule présente plusieurs intérêts :

- son action est indépendante de la quantité de plasmine endogène
- elle est également indépendante de la présence de plasminogène
- elle ne peut être inhibée par le PAI-1

De manière générale, Alfiméprase est à la fois capable de dégrader la fibrine formée, mais également d'en inhiber la génération en dégradant le fibrinogène.

Les études précliniques, notamment dans des modèles canins, ont permis de mettre en évidence le mode d'action d'Alfiméprase. Avec ce composé, une thrombolyse efficiente est obtenue six fois plus rapidement qu'avec les activateurs du plasminogène actuellement disponibles sur le marché. De plus, dans l'organisme, Alfimeprase est rapidement inhibée par l'α2-macroglobuline, ce qui lui confère une demi-vie courte, de l'ordre de 15 minutes. Cette propriété permet de limiter le risque hémorragique. Afin d'optimiser l'efficacité d'Alfiméprase, il convient de l'administrer par voie IV à proximité du thrombus (Han *et al.,* 2010 ; Marder et Novokhatny, 2010 ; Markland et Swenson, 2010).

Le tableau XI reprend et synthétise les études cliniques dont a fait l'objet Alfiméprase. Globalement, ce composé a présenté de bons résultats au cours d'un essai de **phase I** et d'un essai de **phase II**. Une bonne tolérance a pu être mise en évidence, ainsi que des profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques prévisibles et prometteurs, comparativement aux thrombolytiques alors disponibles (Ouriel, Cynamon et Pinto , 2004 ; Ouriel *et al.,* 2005). Des études de **phase III** ont alors pu débuter. Ces études, HA004 et HA007, ont présenté des résultats décevants. Il apparaissait qu'Alfiméprase n'était pas plus efficace que les thrombolytiques classiques (t-PA, u-PA, …). De même, son administration s'est accompagnée de plus d'événements indésirables, notamment hémorragiques, que pour le traitement contrôle. Les auteurs expriment leur surprise quant à ces résultats, et émettent

[5] Ici, le traitement « placebo » correspond à l'administration d'un activateur du plasminogène.

l'hypothèse que la dose d'Alfiméprase administrée pourrait être insuffisante et/ou que la voie d'administration par cathéter intra- ou péri-thrombus n'était pas adéquate (Han *et al.,* 2010 ; Markland et Swenson, 2010).

Enfin, Alfiméprase a fait l'objet d'un essai de **phase II** et un essai de **phase III** pour la thromboprophylaxie de patients chez qui un cathéter veineux a été posé, à des fins de chimiothérapie, d'antibiothérapie, ou encore de nutrition parentérale. Les études ont présenté les mêmes conclusions que les essais réalisés chez des patients présentant une occlusion artérielle périphérique. A ce jour, cette molécule ne fait plus l'objet de développement clinique, et ce depuis 2012 (Moll *et al.,* 2006 ; Markland et Swenson, 2010).

Tableau XI : Synthèse des essais cliniques pour Alfiméprase

TYPE D'ESSAI	REFERENCES DE L'ETUDE	METHODOLOGIE	OBJECTIFS	BRAS DE TRAITEMENT	EFFECTIFS	RESULTATS	REFERENCES
Phase I	-	Etude multicentrique, ouverte, une seule administration	Evaluation de la tolérance à l'administration d'Alfiméprase chez des patients présentant une aggravation des symptômes d'une ischémie membres inférieurs	Cinq doses de 0,025 à 0,5 $mg.kg^{-1}$	20	- toutes les doses ont été bien tolérées, sans complications de type hémorragiques - la demi-vie d'Alfiméprase est de l'ordre de 11 à 54 minutes, avec une médiane à 25 minutes - le taux plasmatique d'α2-macroglobuline décroit de manière dose-dépendante avec l'administration en infusion d'Alfiméprase, et revient à la normale après 14 jours	Ouriel *et al.,* 2005
Phase II	HA002 NAPA-1	Etude ouverte, multicentrique,	Evaluation de l'efficacité et de la sécurité à l'administration d'Alfiméprase à deux doses, chez des patients présentant une occlusion artérielle périphérique	Trois doses De 0,1 à 0,6 $mg.kg^{-1}$	113	- restauration du flux artériel dans les 4 h, contre 24 à 36 h avec les thrombolytiques classiques, ce qui a permis à 82 – 69 % des patients de ne pas subir d'intervention chirurgicale - pas d'épisode hémorragique grave -fréquence des effets indésirable dose-dépendante	Ouriel *et al.,* 2004
Phase III	HA004 NAPA-2	Etude multicentrique, randomisée, en double-aveugle partiel, contre placebo*	Evaluation de l'efficacité et de la sécurité à l'administration d'Alfiméprase administré par cathéter, comme traitement initial de patients présentant une occlusion artérielle périphérique	Bras 1 : administration IT d'Alfiméprase (0,3 $mg.kg^{-1}$) Bras 2 : placebo IT Bras 3 : placebo PT	300	- pas de différence significative dans le nombre de patients devant subir une chirurgie vasculaire ouverte 30 jours après administration de l'un ou l'autre traitement - le traitement par Alfiméprase est d'autant plus efficace que le taux plasmatique d'α2-macroglobuline est bas - généralement plus d'effets indésirables avec Alfiméprase qu'avec le placebo - l'étude permet tout de même de mettre en évidence l'efficacité d'Alfiméprase dans cette indication - la méthode d'administration et/ou la dose ont pu être inadéquat, ce qui expliquerait ces résultats décevants	Han *et al.,* 2009
Phase III	HA007 NAPA-3	Etude multicentrique, randomisée, en double-aveugle, contre placebo*		Bras 1 : administration IT d'Alfiméprase (0,3 $mg.kg^{-1}$) Bras 2 : placebo IT	102		

IT : intra-thrombus – **PT** : péri-thrombus
***** ici le placebo le placebo correspond à un agent thrombolytiques classique

4.2.3 Troplasminogène alpha

Développé par la société Vernalis, Troplasminogène (V-10153) est une version recombinante du plasminogène humain. Contrairement à ce dernier, Troplasminogène est activé par la thrombine et non par les activateurs physiologiques du plasminogène (t-PA, u-PA,...). Lorsque Troplasminogène est lié à la fibrine, cette dernière est clivée par la thrombine liée à la fibrine. Il s'agit de la thrombine générée au cours de la coagulation. Une fois activée, cette molécule présente les mêmes propriétés fibrinolytiques que la plasmine humaine (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

Considérant que l'action de la thrombine est restreinte spatialement au site de formation du thrombus, Troplasminogène devrait présenter une action fibrinolytique relativement spécifique en termes de localisation, ce qui limiterait le risque hémorragique (Curtis *et al.,* 2005).

Le site de clivage de Troplasminogène par la thrombine dérive du FXI. En effet, le FXI peut être activé par le FXIIa, la thrombine et par lui-même. Le site d'activation du plasminogène P3-P1' a été substitué par le résidu P7-P1' (Thr363-Ile370) du FXI, ce qui explique que Troplasminogène soit activé par la thrombine. Deux autres mutations ont été introduites dans le domaine du plasminogène qui présente une action de type protéase (Glu606Lys et Glu623Lys) (Comer *et al.,* 2005).

Le concept développé ici est celui d'une molécule de demi-vie longue, qui circulerait longtemps dans l'organisme sous forme de prodrogue, jusqu'à être activée par la thrombine présente au niveau du thrombus. L'efficacité du composé a été démontrée dans des modèles animaux (lapin, chien) pour la lyse du caillot et la prévention de la réocclusion après administration en bolus. Dans ces essais, la capacité de Troplasminogène à lyser un caillot a été évaluée sur un modèle de thrombose, contre le t-PA, tandis que ses propriétés thromboprophylactiques ont été évaluées contre l'héparine (Comer *et al.,* 2005).

Dans un essai de **phase I**, visant à dresser les profils pharmacodynamiques et pharmacocinétique de Troplasminogène alpha, ce dernier a été administré chez 22 volontaires sains. Il s'agissait d'un essai randomisé, en double-aveugle, contre placebo, au cours duquel la molécule a été testée à 8 doses de 0,08 à 4,8 $mg.kg^{-1}$.Trois doses ont été testées chez chaque volontaire. Cette étude a montré que la concentration plasmatique de Troplasminogène alpha était dose-dépendante. De plus, l'élévation du taux plasmatique de D-dimères était également dose-dépendante. Par ailleurs, *ex vivo*, la lyse du caillot est observée pour des doses de 3,6 et 4,8 $mg.kg^{-1}$. Ce thrombolytique est administré par voie IV et présente une demi-vie de 4,4 heures chez l'Homme. Cette longue demi-vie permet une unique administration en bolus de la molécule. Enfin, l'administration de la molécule ne modifie pas le taux plasmatique d'α-2 antiplasmine ou de fibrinogène. La molécule a été bien tolérée par l'ensemble des volontaires sains et elle ne modifie pas le temps de saignement ni les tests classiques de coagulation (TC+A, TP). Aucun volontaire sain n'a développé d'anticorps dirigés contre Troplasminogène (Curtis *et al.,* 2005).

Troplasminogène a fait l'objet d'un essai de **phase IIa** qui inclut 50 patients présentant un infarctus du myocarde. L'étude était randomisée, ouverte, et a permis d'évaluer l'efficacité et la sécurité à l'administration de Troplasminogène. Après l'administration d'un unique bolus à différentes doses (5 à 10 $mg.kg^{-1}$), ce composé a permis à 34 % des patients inclus un rétablissement total du flux sanguin au niveau de la zone infarcie, et ce de manière dose-dépendante. Trois patients ont présenté une hémorragie grave, six autres ont présenté une hémorragie modérée (Gibson *et al.,* 2006).

Toutefois, à la suite de cette étude, la société Vernalis annonçait l'arrêt du développement de Troplasminogène alpha (Vernalis plc, 2010).

4.3 Conclusion

La figure 47 synthétise les molécules thrombolytiques en cours de développement clinique présentées précédemment, ainsi que leurs cibles pharmacologiques.

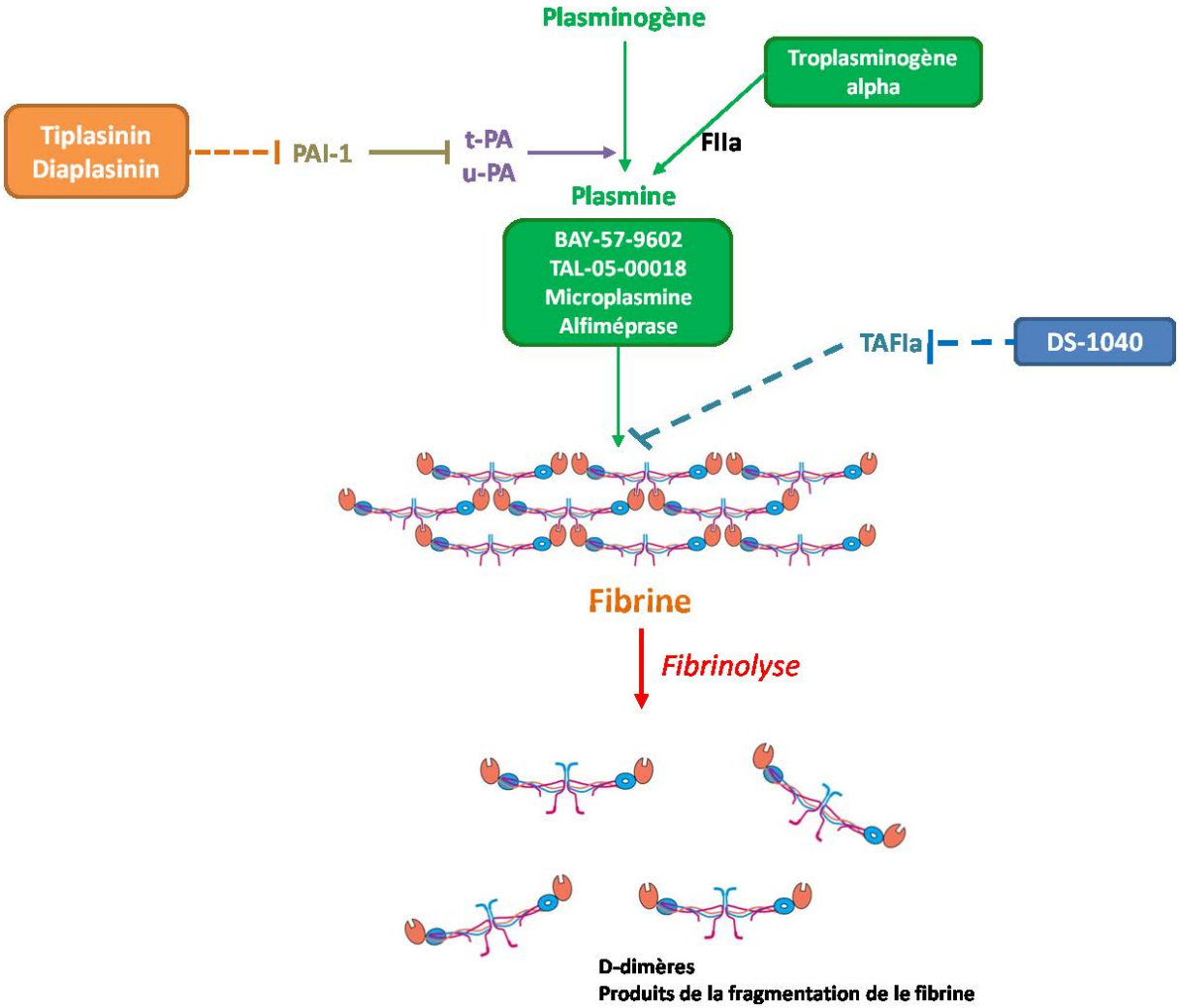


Figure 47 : Synthèse des molécules thrombolytiques en cours de dévelopement clinique et de leurs cibles pharmacologiques

Les études cliniques menées sur les inhibiteurs du TAFIa ont mis en évidence que ce dernier ne constituait pas, *a priori*, une cible pertinente pour le développement de nouveaux thrombolytiques. En effet, l'administration d'une faible dose de certains inhibiteurs du TAFIa tend à promouvoir l'activité du TAFIa plutôt que de l'inhiber. Ceci s'expliquerait par des changements allostériques du TAFIa.

A l'inverse, de nombreux inhibiteurs de PAI-1, issus de synthèse chimique, font actuellement l'objet d'études précliniques et cliniques. Toutes ces molécules ne sont pas développées comme thrombolytiques.

Toutefois, comme les activateurs du plasminogène actuellement sur le marché, les inhibiteurs de TAFIa et les inhibiteurs de PAI-1 présentent un mécanisme thrombolytique indirect. Or, les médicaments thrombolytiques sont administrés le plus souvent dans des situations d'urgence vitale (IDM, AVC, EP, …). C'est pourquoi un médicament thrombolytique doit avoir un délai d'action court. Cette propriété semble partagée par la plasmine, le plasminogène et leurs dérivés présentés précédemment. Il s'agit de fibrinolytiques au sens strict qui, à ce jour, ont franchi avec succès les phases des essais cliniques auxquels ils ont été soumis. De plus, ces fibrinolytiques sont efficaces, quel que soit le taux plasmatique de plasminogène endogène. Enfin, ils peuvent être administrés pour neutraliser les inhibiteurs naturels de la plasmine que sont l'α2-macroglobuline et l'α2-antiplasmine. Dans ce cas, ces fibrinolytiques seraient co-administrés avec des activateurs du plasminogène.

QUATRIÈME PARTIE
CONCLUSION ET PERSPECTIVES

"The Holy-Grail for antithrombotic therapy –
a drug that will prevent coagulation
without promoting bleeding -
has yet to be found."

Nigel MACKMAN, PhD
UNIVERSITY OF NORTH CALIFORNIA

Certains auteurs comparent la recherche d'un antithrombotique idéal à la légendaire quête du Saint-Graal. Nous considérons qu'en cela ils se trompent car il existerait potentiellement trois antithrombotiques idéaux :

- le premier serait indiqué dans la thromboprophylaxie de pathologies exposant à la thrombose veineuse et à ses complications (thrombose veineuse profonde, embolie pulmonaire,…). Typiquement, il interagirait avec la coagulation.
- le second serait indiqué pour la prévention de la thrombose artérielle et ses complications que sont notamment l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébrale. Il interagirait avec l'hémostase primaire.
- le dernier serait un thrombolytique afin de traiter un thrombus déjà installé dans le système vasculaire. Il interagirait avec la fibrinolyse.

Avant la commercialisation des AOD, la mise en place d'un traitement prophylactique de la thrombose reposait principalement sur l'administration d'héparines et/ou d'AVK. Toutefois, ces médicaments posent plusieurs problèmes. L'administration d'héparines ne se fait pas par voie *per os* et expose à un risque de thrombocytopénie. Quant aux AVK, les posologies sont difficiles à établir et nécessitent un suivi biologique régulier. C'est pour pallier à ces difficultés qu'ont été développés les AOD. Commercialisés dans les années 2010, il existe pour chacun une unique posologie par indication. Leur emploi ne nécessite pas de suivi biologique. Toutefois, aucun antidote aux AOD n'est à ce jour commercialisé. De plus, leur suivi biologique est particulièrement difficile et nécessite le dosage des facteurs de la coagulation qui sont ciblés par ces molécules (FIIa ou FXa).

Au sujet des antidotes, deux conceptions s'opposent. Dans un premier cas, nous considérons le développement de molécules antithrombotiques dont l'action expose nécessairement à un risque hémorragique, dans la mesure où celles-ci perturbent un ou plusieurs mécanismes de l'hémostase. Dans ce cas, un antidote sûr et d'action rapide doit être disponible (Smiley et Becker, 2014). Notons qu'en Juin 2015, Pollack *et al.* présentaient dans le *New England Journal of Medicine* les résultats d'un essai de **phase III** (NCT02104947) évaluant Idarucizumab comme antidote au Dabigatran (PRADAXA®). Cette étude prospective évaluait la sécurité à l'administration de 5 g de cet anticorps, ainsi que sa capacité à inverser l'effet de dabigatran chez 90 patients présentant une hémorragie sévère ou nécessitant une intervention chirurgicale en urgence. Cette étude, promue par la société Boehringer-Ingelheim, a montré l'efficacité d'Idracizumab à inhiber complètement l'action antithrombotique de dabigatran en quelques minutes (Pollack *et al.,* 2015).

Dans un deuxième cas, nous considérons le développement de molécules antithrombotiques dont le mécanisme d'action n'expose pas, par nature, à un risque hémorragique. C'est notamment le cas de certains antiplaquettaires présentés dans la troisième partie de ce manuscrit tel que Revacept. Rappelons que ce dernier se lie au collagène sous-endothélial exposé à la circulation sanguine lorsque l'endothélium a été lésé.

Par ailleurs, toutes les cibles pharmacologiques potentielles ne font pas encore l'objet d'essais cliniques. C'est notamment le cas du facteur XII de la coagulation. Les souris présentant un défaut en FXIIa ne semblent pas développer de thrombus. Il en est de même chez l'Homme. Il pourrait donc s'agir d'une cible pertinente pour le développement d'antithrombotiques. Plusieurs

molécules ciblant le FXIIa font actuellement l'objet d'essais précliniques (Furie et Furie, 2008 ; Weitz, Eikelboom et Samama, 2012).

De plus, certaines molécules antithrombotiques n'interagissent qu'avec une seule cible pharmacologique, ce qui explique la possibilité d'échappement à un traitement. De nouvelles approches cliniques proposent l'association de plusieurs médicaments antithrombotiques interagissant chacun avec une cible pharmacologique différente. L'association d'antiplaquettaires et d'anticoagulants est notamment à l'étude (Mackman, 2008). De bons résultats ont été observés pour l'association de l'aspirine et de Clopidogrel lors d'essais cliniques de **phase II**. Cette association fait d'ailleurs l'objet d'un essai clinique de **phase III** (NCT00991029) chez des patients présentant un accident ischémique transitoire (Smyth *et al.,* 2009).

Toutefois, dans la recherche de l'antithrombotique idéal, il est peu probable que l'on parvienne à s'affranchir de la variabilité interindividuelle qui explique des réponses différentes aux traitements. Cette variabilité peut s'expliquer par l'observance du traitement mis en place, par des facteurs pharmacogénétiques, ou encore des cellules aux caractéristiques particulières telles que les plaquettes (Weitz, Eikelboom et Samama, 2012). Certains experts ont même émis l'idée de tests génétiques et fonctionnels sur les plaquettes d'un individu afin de lui proposer la thérapie antiplaquettaire la plus adaptée (Verstuyft, Simon et Kim, 2009).

Enfin, le traitement médicamenteux n'est pas le seul levier permettant une bonne prise en charge du risque thrombotique. En effet, la biologie médicale constitue un outil de diagnostic, de suivi et de pronostic des pathologies cardiovasculaires. Les tests dits « en un temps » (TC+A, TQ) ne mettent en évidence que l'activité de certains facteurs de la coagulation. Toutefois, ces tests ne permettent pas d'explorer l'effet d'un antithrombotique sur un facteur précis. Aussi, des méthodes telles que le test de génération de thrombine pourraient trouver un intérêt dans le suivi biologique des inhibiteurs directs ou indirects de la thrombine (Hemker *et al.,* 2003).

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Synthèse des médicaments antithrombotiques commercialisés et en cours de développement clinique ……...**126**

Annexe 2 : Modèles murins *knocked-out* pour des gènes de protéines impliquées dans l'hémostase…....**131**

Annexe 3 : Modifications chimiques des aptamères…….....**132**

Annexe 4 : Comparaison des avantages et inconvénients des anticorps et des aptamères……**136**

Annexe 5 : Principe de l'obtention d'une banque d'oligonucléotides pour la méthode SELEX……...…**137**

Annexe 6 : Principes et méthodologie du développement clinique d'un médicament……...**139**

ANNEXE 1

Synthèse des médicaments antithrombotiques commercialisés et en cours de développement clinique

Tableau I : Médicaments antithrombotiques commercialisés

Nom	Cible pharmacologique	Indications	Rapidité d'action	Demi-vie	Mode d'administration	Suivi biologique nécessaire ?	Antidote(s)	Intéractions médicamenteuses	Effets indésirables
Aspirine	Cyclo-oxygénases	Thromboprophylaxie artérielle secondaire	30 minutes	Dose-dépendante	*per os*	non	Non	Méthotrexate, AOD, AINS, autres anticoagulants à forte dose	Hémorragie, Ulcères gastriques
Ticlopidine	$P2Y_{12}$	Thromboprophylaxie artérielle secondaire	2 heures	30 - 50 heures	*per os*	non	Non	Aspirine, AINS, autres antiplaquettaires, anticoagulants	Hémorragie, Troubles gastriques, réactions allergiques
Clopidogrel	$P2Y_{12}$	Thromboprophylaxie artérielle primaire et/ou secondaire en cas d'athérosclérose	45 minutes	6 heures	*per os*	non	Non	Anticoagulants oraux, antiplaquettaires, thrombolytiques, azolés, IPP, …	Hémorragie, Troubles gastriques (diarrhées, douleurs abdominales, ...)
Prasugrel	$P2Y_{12}$	Thromboprophylaxie artérielle liée à l'athérosclérose	30 minutes	7,4 heures	*per os*	non	Non	Dérivés coumariniques, AINS, azolés, IPP, statines, rifampicine, carbamazépine, …	Hémorragie
Ticagrelor	$P2Y_{12}$	Thromboprophylaxie artérielle secondaire	30 minutes	7 - 8,5 heures	*per os*	non	Non	Azolés, rifampicine, ciclosporine, statines, …	Hémorragie, Dyspnées, bradycardie, troubles gastriques, céphalées, …
Abciximab	GPIIb/IIIa	Thromboprophylaxie artérielle, en association avec d'autres antiplaquettaires	Quelques minutes	30 minutes	IV	non	Non	-	Hémorragie, Bradycardie, céphalées, nausées, vomissements, fièvre, douleurs abdominales, gonflement des membres
Eptifibatide	GPIIb/IIIa	Thromprophylaxie artérielle de la survenue d'IDM avec ou sans décalage du segment ST	Quelques minutes	4 heures	IV	non	Non	Aucune preuve à ce jour	Hémorragie, sinon le plus souvent liés à la pathologie cardiovasculaire : fibrillation auriculaire, hypotension, insuffisance cardique congestive, …
Tirofiban	GPIIb/IIIa	Thromboprophylxie artérielle de la survenue d'IDM	Quelques minutes	8 heures	IV	non	Non	Antiplaquettaires	Hémorragie,, Nausées, fièvres, céphalées.
Nadroparine	**anti-Xa** - anti-IIa	Thromboprophylaxie veineuse de la survenue de TVP, angor instable, IDM, EP …	Quelques minutes	3 à 4 heures	SC	oui	Sulfate de protamine	Antiplaquettaires, médicaments favorisant l'hyperkaliémie (inhbiteurs de récepteurs à l'angiotensine, IEC), AINS, ciclosporine, …	Hémorragie, Elevation des transaminases, hématomes au point d'injection,TIH (rares), hypersensibilité, hyperkaliémie.

Enoxaparine	**anti-Xa** - anti-IIa	Thromboprophylaxie veineuse de la survenue de TVP, angor instable, IDM, EP …	Quelques minutes	3 à 4 heures	SC	oui	Sulfate de protamine	Antiplaquettaires, médicaments favorisant l'hyperkaliémie (inhbiteurs de récepteurs à l'angiotensine, IEC), AINS, ciclosporine, …	Hémorragie, Elevation des transaminases, hématomes au point d'injection,TIH (rares), hypersensibilité, hyperkaliémie.
Dalteparine	**anti-Xa** - anti-IIa	Thromboprophylaxie veineuse de la survenue de TVP, angor instable, IDM, EP …	Quelques minutes	3 à 4 heures	SC	oui	Sulfate de protamine	Antiplaquettaires, médicaments favorisant l'hyperkaliémie (inhbiteurs de récepteurs à l'angiotensine, IEC), AINS, ciclosporine, …	Hémorragie, Elevation des transaminases, hématomes au point d'injection,TIH (rares), hypersensibilité, hyperkaliémie.
Tinzaparine	**anti-Xa** - anti-IIa	Thromboprophylaxie veineuse de la survenue de TVP, angor instable, IDM, EP …	Quelques minutes	3 à 4 heures	SC	oui	Sulfate de protamine	Antiplaquettaires, médicaments favorisant l'hyperkaliémie (inhbiteurs de récepteurs à l'angiotensine, IEC), AINS, ciclosporine, …	Hémorragie, Elevation des transaminases, hématomes au point d'injection,TIH (rares), hypersensibilité, hyperkaliémie.
Danaparoide	**anti-Xa** - anti-IIa	Thromboprophylaxie veineuse de la survenue de TVP, angor instable, IDM, EP …	Quelques minutes	25 h pour l'action anti-FXa et 7 h pour l'action anti-FIIa	SC	oui	Sulfate de protamine	Antiplaquettaires, médicaments favorisant l'hyperkaliémie (inhbiteurs de récepteurs à l'angiotensine, IEC), AINS, ciclosporine, …	Hémorragie, Elevation des transaminases, hématomes au point d'injection,TIH (rares), hypersensibilité, hyperkaliémie.
Fondaparinux	FXa	Thromboprophylaxie veineuse de la survenue de TVP ou d'EP.	Quelques minutes	17 heures	SC	oui	Sulfate de protamine	-	Hémorragie, Céphalées, hypersensibilité, nausée, vomissements, douleur au point d'injection, …
Acénocoumarol	FIIa, FVIIa, FIXa, FXa	Thromboprophylaxie veineuse secondaire, relais à l'héparine	Quelques minutes	8 heures	per os	oui	Vitamine K, Kanokad	Aspirine, AINS pyrazolés, miconazole, Millepertuis, 5-FU, allopurinol, aminogluthétimide, amiodarone, androgènes, azathioprine, …	Hémorragie, Réaction immunoallergique (urticaire notamment), diarrgées, stéatorrhée, alopécie, ….
Warfarine	FIIa, FVIIa, FIXa, FXa	Thromboprophylaxie veineuse secondaire, relais à l'héparine	Quelques minutes	35-45 heures	per os	oui	Vitamine K, Kanokad	Aspirine, AINS pyrazolés, miconazole, Millepertuis, 5-FU, allopurinol, aminogluthétimide, amiodarone, androgènes, azathioprine, …	Hémorragie, Réaction immunoallergique (urticaire notamment), diarrgées, stéatorrhée, alopécie, ….
Fluindione	FIIa, FVIIa, FIXa, FXa	Thromboprophylaxie veineuse secondaire, relais à l'héparine	Quelques minutes	31 heures	per os	oui	Vitamine K, Kanokad	Aspirine, AINS pyrazolés, miconazole, Millepertuis, 5-FU, allopurinol, aminogluthétimide, amiodarone, androgènes, azathioprine, …	Hémorragie, Réaction immunoallergique (urticaire notamment), diarrgées, stéatorrhée, alopécie, ….
Dabigatran étéxilate	FIIa	Thromboprophylaxie veineuse primaire (chirurgie orthopédique, fibrillation auriculaire,), curatif des TVP et EP	Quelques minutes	11 heures	per os	oui	Non	Inhibiteurs de la P-gp et CYP3A4 (amiodarone, vérapamil, quinidine, kétoconazole, …) et inducteurs de la P-GP et CYP3A4 (Hypericum perforatum, carbamazépine, rifampicine, ...)	Hémorragie, anémie, thrombopénie, diminution de l'hématocrite, réaction allergique, diarrhées, dyspepsie, ulcère gastro-duodénal, douleurs abdominales, …
Rivaroxaban	FXa	Thromboprophylaxie veineuse primaire (chirurgie orthopédique, fibrillation auriculaire,), curatif des TVP et EP	Quelques minutes	4,5 heures	per os	oui	Non	Inhibiteurs de la P-gp et CYP3A4 (amiodarone, vérapamil, quinidine, kétoconazole, …) et inducteurs de la P-GP et CYP3A4 (Hypericum perforatum, carbamazépine, rifampicine, ...)	Hémorragie, anémie, céphalées, tachycardie, réactions allergiques, fièvres, élévation des trasaminases, ...

Apixaban	FXa	Thromboprophylaxie veineuse primaire (chirurgie orthopédique, fibrillation auriculaire,), curatif des TVP et EP	Quelques minutes	12 heures	per os	oui	Non	Inhibiteurs de la P-gp et CYP3A4 (amiodarone, vérapamil, quinidine, kétoconazole, …) et inducteurs de la P-GP et CYP3A4 (Hypericum perforatum, carbamazépine, rifampicine, ...)	Hémorragie, anémie, nausées, élévation des transaminases, ...
Streptokinase	Plasminogène	Traitement de l'infarctus du myocarde en phase aigue	10 minutes	80 minutes	IV	urgence	Aprotinine, acide aminocaproïque	Aspirine, AINS, autres antiplaquettaires, anticoagulants	Hémorragie intra-crânienne, hypotension, nausées, vomissements, réactions allergiques, vascularite, convulsions, …
Urokinase humaine	Plasminogène	Traitement de l'infarctus du myocarde en phase aigue	2 à 3 minutes	10 à 15 minutes	IV	urgence	Aprotinine, acide aminocaproïque	Aspirine, AINS, autres antiplaquettaires, anticoagulants	Hémorragie intra-crânienne, hypotension, nausées, vomissements, réactions allergiques, vascularite, convulsions, …
Altéplase	Plasminogène	Traitement de l'infarctus du myocarde en phase aigue	Quelques minutes	10 à 15 minutes	IV	urgence	Aprotinine, acide aminocaproïque	Aspirine, AINS, autres antiplaquettaires, anticoagulants	Hémorragie intra-crânienne, hypotension, nausées, risque infectieux
Ténectéplase	Plasminogène	Traitement de l'infarctus du myocarde en phase aigue	Quelques minutes	10 à 15 minutes	IV	urgence	Aprotinine, acide aminocaproïque	Aspirine, AINS, autres antiplaquettaires, anticoagulants	Hémorragie intra-crânienne, hypotension, nausées, vomissements, réactions allergiques, …
Rétéplase	Plasminogène	Traitement de l'infarctus du myocarde en phase aigue	18 minutes	5,5 heures	IV	urgence	Aprotinine, acide aminocaproïque	Aspirine, AINS, autres antiplaquettaires, anticoagulants	Hémorragie intra-crânienne, hypotension, nausées, vomissements, réactions allergiques, vascularite, convulsions, …

*

* *

Tableau II : Médicaments antithrombotiques en cours de développement

Nom	Cible pharmacologique	Nature chimique	Statut	Indications espérée	Rapidité d'action	Demi-vie	Profil dose/réponse	Mode d'administration	Antidote(s)	Effets indésirables
ARC1779	vWF	aptamère	En attente de phase III	Thromboprophylaxie de SCA, maladies de Willebrand	-	2 à 3 heures	Prévisible	IV	Brin complémentaire ?	Hémorragies, réactions allergiques
Caplacizumab	vWF	nanocorps	En attente de phase III	Purpura thrombotique thrombopénique	-	10 à 30 heures	Prévisible	IV/SC	non	Hémorragies, réactions allergiques
AJW200	vWF	anticorps monoclonal	Arrêté en phase I	N/A	-	-	-	IV	-	Hémorragies, réactions allergiques
Anfibatide	GPIb	dérivé de l'agkisacucétine	En attente de phase IIb	Thromboprophylaxie de SCA	-	-	-	IV	non	Hémorragies
Terutroban	TxA_2	dérivé du tétrahydro-naphtalène	Arrêt après la phase III	Thromboprophylaxie secondaire de l'AVC	2 heures	6 à 10 heures	Prévisible	*per os*	non	Hémorragies
Picotamide	TxA_2	dérivé de l'acide méthoxy-isophtalique	Arrêt après la phase III	Thromboprophylaxie de patients présentant une artériopathie périphérique	-	-	-	*per os*	-	Hémorragies
Z-335	TxA_2	cycle bicyclo-nonane	Arrêté en phase I	-	1 heure	48 heures	-	-	-	-

DG-041	EP_3	-	Arrêté en phase II	Thromboprophylaxie de patients présentant une artériopathie périphérique	-	-	-	-	non	Hémorragies
Vorapaxar	PAR-1	analogue synthétique de la himbacine	Commercialisé	Thromboprophylaxie artérielle secondaire de d'AVC ou d'IDM	2 heures	126 à 269 heures	Prévisible	*per os*	non	Hémorragies
Atopaxar	PAR-1	amidine bicyclique	En attente de phase III	Thromboprophylaxie du SCA	-	50 heures	Prévisible	*per os*	non	Hémorragies, élévation des transaminases, prolongation de l'intervalle QT
Revacept	GPVI	protéine de fusion	Phase II en cours	Thromboprophylaxie du SCA, d'AVC ou d'un acident ischémique transitoire	-	2 à 7 jours	Prévisible	IV	non	Hémorragies
DZ-697b	GPVI	-	Arrêté après la phase I	Thromboprophylaxie artérielle secondaire de d'AVC ou d'IDM	-	-	-	*per os*	-	Hémorragies
Temanogrel	$5HT_{2A}$	3-methoxy-*N*-(3-(1-methyl-1*H*-pyrazol-5-yl)-4-(2-morpholinoethoxy)phenyl)benzamide	Phases I en cours	Traitement de l'angor instable	20 minutes	1 heure	Prévisible	*per os*	non	Hémorragies
Tifacogin	FIXa	TFPI humain recombinant	Phase III terminée	Sepsis sévère	-	8 heures	Prévisible	IV	non	Hémorragies
rNAPc2	FVIIa-FT	NAPc2 recombinant	Arrêt après la phase II	Thromboprophylaxie en chirurgie orthopédique	-	50 heures	Prévisible	SC	rFVIIa	Hémorragies
FVIIai	FVIIa-FT	FVIIa recombinant inactivé	Arrêt après la phase II	Thromboprophylaxie dans un contexte d'angioplastie	-	-	-	IV	-	Hémorragies
NU172	FIIa	aptamère	Phase II interrompue	Anticoagulation d'urgence, lorsqu'une intervention chirurgicale vasculaire doit être pratiquée	Quelques minutes	10 minutes	Prévisible	IV	-	-
Odiparcil	HCII	β-D-xyloside	Arrêt après la phase II	Thromboprophylaxie en chirurgie orthopédique	-	-	-	-	Sulfate de protamine	-
Thrombomoduline alpha	FIIa	thrombomoduline recombinante	Commercialisé au Japon depuis 2008	Traitement de la CIVD	-	48 à 72 heures	Prévisible	SC	-	Hémorragies
TB-402	FVIIIa	anticorps monoclonal	Arrêt après les phases II	Thromboprophylaxie de patients à risque de TVP	30 minutes à 2 heures	19,5 à 22,9 jours	Prévisible	IV	-	Hémorragies, céphalées, hématomes au point d'injection, …
3K3A-APC	Protéine C	Variant de la protéine C recombinante	Phase II en cours	Thromboprophylaxie secondaire de l'AVC	Quelques minutes	16 minutes	Prévisible	IV	-	Hémorragies, céphalées, nausées, …
IXai	FIXa	dérivé de l'agkisacucétine	Préclinique	Patients bénéficiant d'une circulation extra-corporelle	-	-	-	IV	non	-

SB249417	FIXa	anticorps monoclonal	Arrêté après la phase I	-	-	21 heures	Prévisible	IV	non	Hémorragies
TTP889	FIXa	-	Arrêté après la phase II	Thromboprophylaxie en chirurgie orthopédique	-	20 heures	Prévisible	*per os*	non	Hémorragies
Pegnivacogin	FIXa	Aptamère	Arrêté après la phase II	Theomboprophjylaxie de patients bénéficiant d'une ICP	Quelques minutes	12 heures	Prévisible	*per os*	Anivamersen	Hémorragies, réactions allergiques
BMS262084	FXIa	dérivé de l'azetidinone	Phase I en cours	-	-	-	Prévisible	IV	-	-
ISIS-416858	FXIa	ASO	Phase II terminée	Thromboprophylaxie en chirurgie orthopédique	-	14 heures	Prévisible	IV	concentré en FXI dérivant du plasma	Hémorragies, élévationd des transaminases
DS-1040	TAFIa	-	Phase I terminée	-	Quelques minutes	-	Non-prévisible	IV	-	Hémorragies
Diaplasinin	PAI-1	-	Phase I terminée	Thromboprophylaxie de patients présentant de l'athérosclérose	-	-	-	-	-	Hémorragies
Tiplasinin	PAI-1	-	Phase I terminée	Thromboprophylaxie de patients présentant de l'athérosclérose	-	-	-	-	-	Hémorragies
BAY-57-9602 & TAL-05-00018	Fibrine	Plasmine humaine	Phase II terminée, en attente de phase III	Traitement en urgence de la thrombose	Quelques minutes	-	-	IV	-	Hémorragies
Microplasmine	α2-antiplasmine	Dérivé de la plasmine humaine	Phase I terminée	Traitement en urgence de la thrombose	Quelques minutes	-	-	IV	-	Hémorragies
Alfiméprase	Fibrine	Variant de la fibrolase recombinante	Arrêt après la phase III	Traitement en urgence de la thrombose	Quelques minutes	11 à 54 minutes	Prévisible	IV	-	Hémorragies
Troplasminogène alpha	Fibrine	Variant du plasminogène recombinant	Arrêt après la phase IIa	Traitement en urgence de la thrombose	Quelques minutes	4,4 heures	Prévisible	IV	-	Hémorragies

ANNEXE 2 :

Modèles murins *knocked-out* pour des gènes de protéines impliquées dans l'hémostase

Gène réprimé	Viabilité	Développement embryonnaire / Survie
COAGULATION		
Protéine C	Non	Normal, mort péri-natale
Fibrinogène	Oui	Normal, mort péri-natale
FV	Non	Mort péri-natale
FVII	Oui	Normal, mort péri-natale
FVIII	Oui	Normal
FIX	Oui	Normal
FXI	Oui	Normal
Facteur tissulaire	Non	Léthal
TFPI	Non	Léthal
vWF	Oui	Normal
Prothrombine	Non	Perte embryonnaire partielle
FIBRINOLYSE		
u-PA et t-PA	Oui	Normal, retard de croissance
uPAR	Oui	Normal
Plasminogène	Oui	Normal, retard de croissance
PAI	Oui	Normal
Thrombomoduline	Non	Léthal
PLAQUETTES		
Sélectine P	Oui	Normal
GPIIb/IIIa	Oui	Normal, perte embryonnaire partielle
PAR-1	Oui	Normal, perte embryonnaire partielle
PAR-3	Oui	Normal
Récepteur au TxA_2	Oui	Normal
P2Y12	Oui	Normal

ANNEXE 3 :
MODIFICATIONS CHIMIQUES DES APTAMÈRES

En tant qu'acides nucléiques, les aptamères sont particulièrement sensibles aux nucléases, des enzymes ubiquitaires dans l'organisme. Un aptamère développé pour cibler la thrombine a présenté une demi-vie de l'ordre de 100 millisecondes chez le singe (Toulmé et Giegé, 1998). Afin d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques et d'accroitre la biodisponibilité de ces molécules, des modifications chimiques post-SELEX sont nécessaires.

Toutefois, les potentielles modifications chimiques ne doivent pas ou peu modifier la structure tridimensionnelle de la molécule, garante de son efficacité thérapeutique. De même, ces modifications chimiques pouvant intervenir en amont de la constitution de la banque de nucléotides, elles ne doivent pas empêcher les processus d'amplifications de la méthode du SELEX (Jayasena, 1999). C'est par exemple le cas de la substitution en 2' par le groupement $-OCH_3$ (Toulmé et Giegé, 1998), même si des polymérases recombinantes développées récemment semblent tout de même capables d'incorporer de tels nucléotides lors des phases d'amplification des acides nucléiques (Chauveau, Pestourie et Tavitian, 2006).

Après ces modifications chimiques, la spécificité des aptamères pour leur cible est de nouveau évaluée par différentes techniques afin de s'assurer que les modifications n'ont pas altérer ces caractéristiques (Sundaram *et al.*, 2013).

1. Modification du phosphodiester

Une des approches a consisté à modifier la fonction phosphodiester présente dans l'enchainement des oligonucléotides afin de substituer celle-ci par un groupement phosphorothioate (figure I), voire boranophosphate (BH_3) (Chauveau Pestourie, et Tavitian, 2006). Il a été montré que de tels nucléotides étaient résistants aux nucléases.

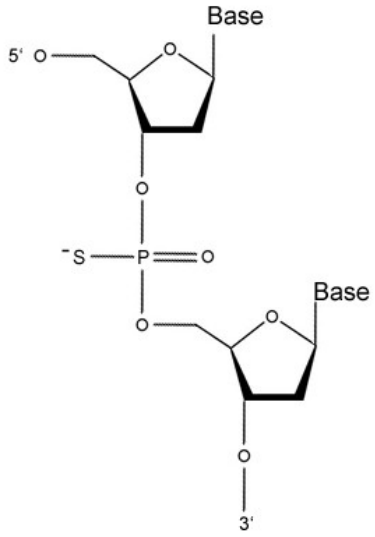


Figure I : Modification du groupement phosphodiester en phosphorothioate (Jayasena, 1999)

Toutefois il apparait que de telles modifications affectent l'action de l'aptamère sur sa cible. La réponse de l'aptamère devient dès lors imprévisible (Stein, 1996). Par ailleurs, il a été montré que la création d'un pontage 3'-3' de phosphodiesters terminaux augmentait la résistance de

l'aptamère aux nucléases et donc accroissait la demi-vie plasmatique (Pestourie, Tavitian et Duconge, 2005).

2. Modification de sucres

Il a également été envisagé la possibilité de modifier le groupement hydroxyle en 2' du ribose ou désoxyribose. C'est ce groupement qu'attaquent spécifiquement les nucléases de l'organisme. En le substituant par un groupement –F ou $–NH_2$, le nucléotide est protégé de certaines nucléases, ce qui en augmente la durée de demi-vie dans l'organisme (figure II).

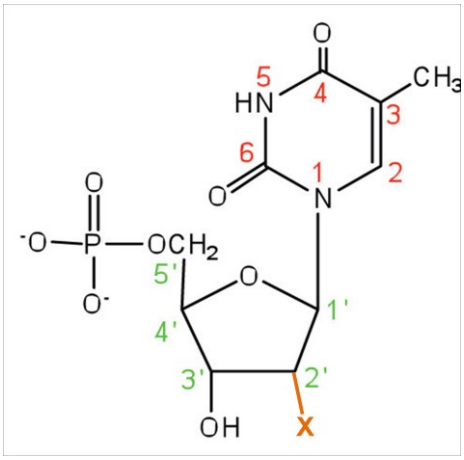


Figure II : Modifications chimiques de désoxythymidine monophosphate
X = F ou NH_2 ou $–OCH_3$

Certaines approches proposent également de substituer l'oxygène du cycle furanose par un atome de soufre. Cette modification s'accompagne d'une plus grande résistance aux nucléases ainsi que d'une thermostabilité accrue (Darmostuk *et al.*, 2015).

Une autre approche consisterait à exploiter les aptamères énantiomériques encore appelés *Spiegelmers*. L'aptamère sélectionné contre une cible et qui lui est spécifique, le restera quelle que soit sa chiralité (L-ribose ou D-ribose). En revanche, les nucléases sont spécifiques des riboses et désoxyriboses de la série D. L'énantiomère est donc potentiellement résistant aux nucléases (Chauveau, Pestourie et Tavitian, 2006).

Enfin, une stratégie utilisée pour certains aptamères actuellement en cours de développement est l'ajout d'un nucléotide inversé terminal en 3' tel que présenté en figure III (Keefe, Pai et Ellington, 2010).

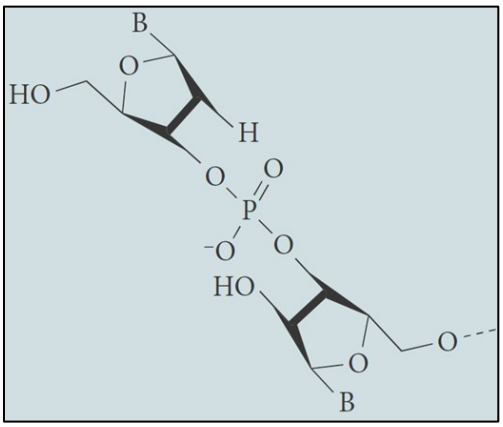


Figure III : Ajout d'un nucléotide terminal inversé (Keefe *et al.*, 2010)

3. Modification de la base azotée

Dans une publication de 1994, Latham *et al.*, présentent un aptamère anti-thrombine dont la thymidine a été substituée par la 5-(1(pentynyl)-2'-déoxyuridine. Il s'agit en fait d'une modification en C5 de l'uracile telle que présentée en figure IV.

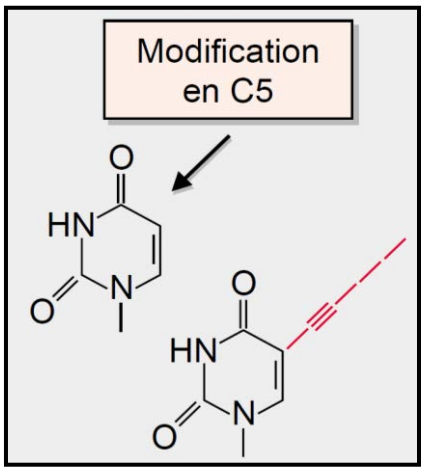


Figure IV : Modification en C5 de l'uracile (Toulmé et Giegé, 1998)

Cette modification chimique n'a pas pour objectif de protéger l'aptamère de l'action des nucléases, mais de moduler la liaison de celui-ci avec sa cible (Latham, Johnson et Toole, 1994). Une autre approche consiste à utiliser les LNA pour *Locked Nucleic Acids* (acides nucléiques fermés). La constitution de la banque d'oligonuclétides s'effectue avec de telles bases azotées (figure V).

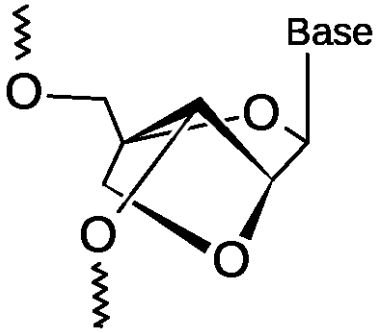


Figure V: Structure d'un LNA

Les LNA sont connus pour être à la fois plus thermorésistants et résistants à la plupart des nucléases (Schmidt *et al.*, 2004).

4. Autres types de modifications

Pegaptanib (MACUGEN®) est un aptamère anti-VEGF chez lequel un groupement de polyéthylène glycol (PEG) a été ajouté à l'extrémité 5' de la molécule (figure VI).

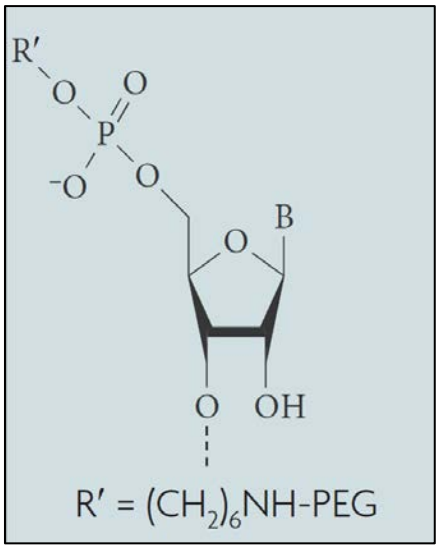


Figure VI : Ajout d'un groupement PEG en 5' d'une séquence nucléotidique (Keefe *et al.*, 2010)

L'ajout du PEG est permis par l'adjonction d'une amine primaire au nucléotide en 5'. Ce groupement a pour objectif d'améliorer la distribution de l'aptamère dans l'organisme et d'en augmenter la demi-vie tel que présenté en figure VII (Ruckman *et al.*, 1998 ; Darmostuk *et al.*, 2015). Un groupe de 40kDa de PEG a également été ajouté en 5' au RB006 (Bunka, Platonova et Stockley, 2010).

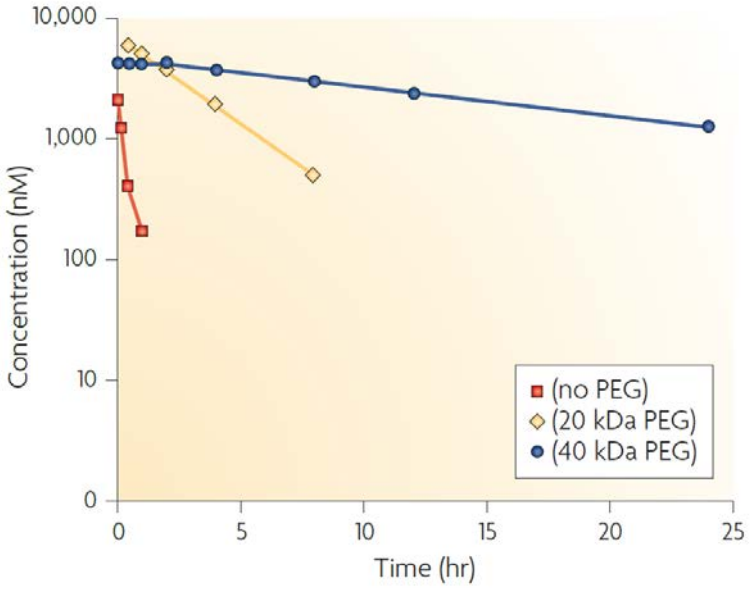


Figure VII : Influence de la taille du groupement PEG ajouté à un aptamère sur la concentration plasmatique de celui-ci en fonction du temps (Keefe *et al.*, 2010)

Il est également possible d'adjoindre un diacyl-glycérol à un aptamère afin d'en augmenter la demi-vie plasmatique (Pestourie, Tavitian et Duconge, 2005).

ANNEXE 4

COMPARAISON DES AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES ANTICORPS ET DES APTAMERES

ANTICORPS	APTAMERES
Inconvénient	**Avantages**
Procédés de production biotechnologiques rendant la transposition d'échelle difficile sans affecter les caractéristiques du produit	Synthèse purement chimique autorisant facilement des transpositions d'échelle
Procédé très susceptible aux contaminations microbiologiques (virales, bactériologiques et fongiques)	Procédé de synthèse non sensible aux contaminations microbiologiques
Risque immunogène	Non-immunogène, *a priori*
La masse moléculaire limite la biodisponibilité et empêche l'accès à certaines cibles (intracellulaires notamment)	Poids moléculaire faible permettant l'accès à une plus grande diversité de compartiments cellulaires
Les anticorps ne sont pas sélectionnés contre leur cible	Sélection de la molécule contre la cible, de sorte que la spécificité de l'une pour l'autre est assurée
Risque de dénaturation, stabilité du produit courte	Dénaturation généralement réversible ; le pont phosphodiester est particulièrement stable chimiquement
Modifications chimiques difficiles et risquant d'atténuer l'activité biologique	Modifications chimiques possibles dans une certaine mesure

Avantages	Inconvénient	Solutions
Profil pharmacocinétique souvent favorable, facilitant le développement clinique du produit	Difficulté à prédire les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de ces molécules	➔ Il est possible de moduler l'activité des aptamères, de sorte à rendre leurs propriétés pharmacocinétiques prévisibles
Molécules de grosse taille, ce qui limite la filtration rénale et ce qui permet d'accroitre la demi-vie plasmatique	Le faible poids moléculaire les rend plus susceptibles à la filtration rénale, ce qui réduit leur demi-vie plasmatique	➔L'ajout de groupements de type PEG permet d'accroitre la demi-vie plasmatique des aptamères
Résistants aux nucléases	Sans modification chimique, grande sensibilité aux nucléases	➔Des modifications chimiques permettent de rendre les aptamères moins sensibles aux nucléases
La technologie est largement disponible et diffusée en raison de l'expiration de nombreux brevets	Technologie restreinte à un petit nombre de société détentrices de cette propriété intellectuelle	➔Le brevet couvrant la technologie du SELEX va bientôt expirer

D'après Keefe *et al.*, 2010

ANNEXE 5

PRINCIPE DE L'OBTENTION D'UNE BANQUE D'OLIGONUCLEOTIDES POUR LA METHODE SELEX
(Ellington et Szostak, 1990 ; Toulmé et Giegé, 1998 ; Tuerk et Gold, 1990)

La constitution d'une banque de désoxyribo-oligonucléotides de taille conséquente est un préalable nécessaire à la sélection d'un aptamère spécifique d'une cible donnée. Pour la recherche d'un aptamère à ARN, la banque de séquences d'ADN constituée est transcrite en ARN par une ARN polymérase. Les séquences sont généralement de l'ordre de 60 oligonucléotides, ce qui autorise 4^{60}, soit 10^{35} séquences possibles.

Les oligonucléotides d'une banque sont tous conçus selon un modèle. Ce modèle dépend de la cible pharmacologique choisie. Dans certains cas, la cible est connue et caractérisée moléculairement, dans d'autres, il n'existe aucune donnée sur la cible.

1. Cas d'une cible pharmacologique moléculairement décrite

La figure I présente la structure-modèle pour chacun des oligonucléotides d'une banque.

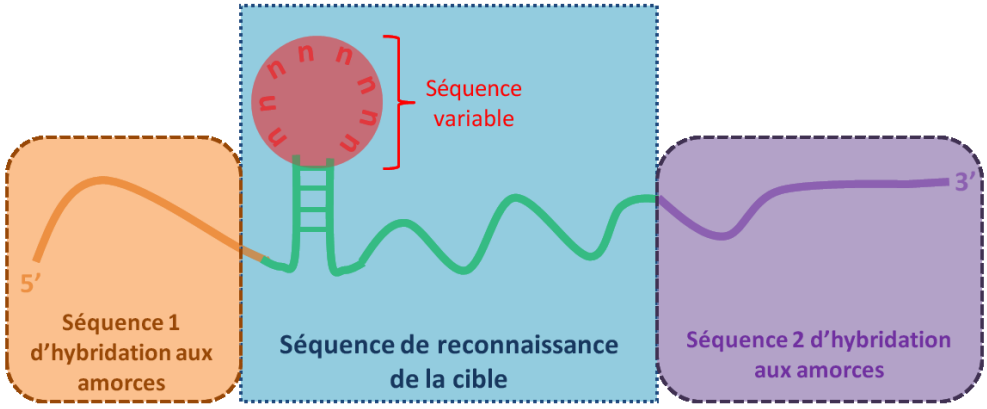


Figure I : Modèle de la séquence d'oligonucléotides spécifiques de la gp43 (d'après Tuerk et Gold, 1990)

Une séquence centrale (verte) est conçue selon la structure de la cible pharmacologique afin de permettre une liaison entre l'oligonucléotide et la protéine-cible. A cette séquence centrale, est adjointe une structure en épingle à cheveux avec une séquence variable de 8 nucléotides (rouge). Cette séquence centrale est flanquée de deux séquences constantes (orange et violet) permettant la liaison à l'ARN polymérase, le cas échéant. Ces deux séquences permettent également la conception et l'hybridation des amorces 3' et 5' pour l'amplification des acides nucléiques et leur séquençage au cours du SELEX. Les séquences sont ensuite amplifiées par PCR ou RT-PCR.

2. Cas d'une cible pharmacologique non caractérisée moléculairement

La figure II présente le modèle de séquence dans le cas de la constitution d'une banque d'oligonucléotides pour une cible pharmacologique non caractérisée moléculairement.

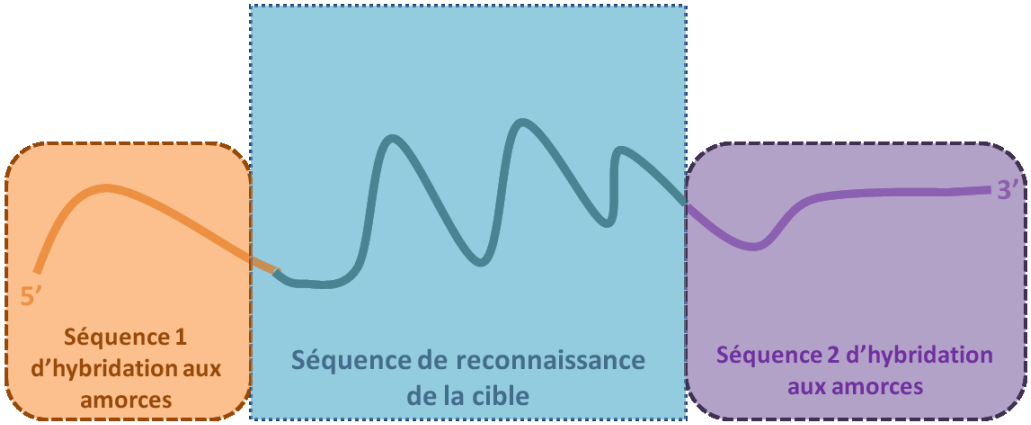


Figure II : Modèle d'une séquence d'oligonucléotides spécifiques d'une cible non caractérisée (Ellington et Szostak, 1990)

Dans ce cas, les séquences placées aux deux extrémités 3' et 5' sont définies de la même façon que précédemment. La séquence variable centrale (bleu), dite dégénérée, peut atteindre une longueur de 25 nucléotides, et est générée aléatoirement à l'aide d'un synthétiseur chimique et d'un mélange équimolaire des quatre bases (RealTimeDesign®, Biosearch Company©).

Le taux d'attrition au cours du SELEX des séquences ainsi générées est évidemment beaucoup plus important que lorsque la cible pharmacologique est connue et caractérisée. C'est pourquoi la taille de la séquence variable centrale, ou région dégénérée, est plus grande que dans l'exemple précédent. Près de 10^{15} (soit 4^{25}) séquences différentes sont ainsi générées. Les séquences sont ensuite amplifiées par PCR ou RT-PCR.

En plus des régions variables, ou dégénérées décrites dans chacun de ces deux cas, des variations aléatoires peuvent se produire du fait d'erreurs d'amplification par les polymérases. Après les étapes de sélection, les séquences terminales dédiées à l'hybridation aux amorces pourront être retirées pour ne garder que la portion de l'aptamère qui interagit avec sa cible.

ANNEXE 6

PRINCIPES ET METHODOLOGIE DU DEVELOPPEMENT CLINIQUE D'UN MEDICAMENT
(Bouvenot et Vray, 2006)

La médecine moderne base ses pratiques, ses protocoles, ses schémas de traitements, de suivi et d'intervention, sur les « faits ». Les anglo-saxons parlent de « *Evidence Based Medicine* », autrement dit, la « médecine factuelle ». Cette médecine se définit comme une « médecine dont les pratiques sont directement inspirées de faits scientifiques validés d'interprétation indiscutable ».

Loin de considérer comme acquis, les résultats de la recherche clinique, cette approche de la médecine doit connaitre et critiquer ces essais. Les données actuelles de la science (DAS) constituent donc une source d'information que doit consulter le praticien, afin de résoudre les problèmes concrets de ses patients. Ces DAS sont notamment alimentées par les résultats des essais cliniques qui permettent d'évaluer une molécule à visée thérapeutique.

Le développement d'un nouveau médicament est une succession d'obstacles scientifiques et administratifs que doit franchir la molécule en développement. Ces phases sont longues, et durent en moyenne 7 à 12 ans. Il s'agit également d'un investissement conséquent pour une société pharmaceutique. Actuellement, il est estimé que 800 millions de dollars sont nécessaire pour la recherche, le développement et la mise sur la marché d'un nouveau médicament.

Ce développement se compose classiquement de quatre étapes :

- Recherche *in vitro*
- Recherche *in vivo*, chez l'animal
- Essais cliniques chez l'Homme
- Phases administratives pour l'obtention de l'AMM

1. La recherche préclinique

Les études précliniques constituent un préalable indispensable à la première administration d'une nouvelle molécule thérapeutique chez l'Homme. Ces études permettent d'isoler et d'identifier la molécule candidate, puis de mettre en évidence son mécanisme d'action avant que d'effectuer les premiers essais chez l'animal.

Lorsqu'une molécule est identifiée comme candidate, il convient d'en définir les conditions d'efficacité et de sécurité.

1.1 Conditions d'efficacité

Ces études ont pour objectif de dresser les profils pharmacocinétique et pharmacodynamique de la molécule candidate. Le profil pharmacodynamique d'une molécule définit l'effet thérapeutique du produit en termes de durée et de dose efficace. Il permet également de déterminer les tissus et/ou organes ciblés par la molécule. Ces études peuvent être réalisées sur différentes espèces d'animaux, et différents modèles de pathologies.

Par ailleurs, les études pharmanocinétiques menées chez l'animal permettent de définir les profils d'absorption, de diffusion, de métabolisme et d'élimination de la molécule.

1.2 Conditions de sécurité

Il s'agit des études toxicologiques. Distinguons les études de toxicité aiguë qui visent à déterminer les doses toxiques chez l'animal et les organes majoritairement atteints, et les études de

toxicité subaiguë et chronique qui permettent de déterminer, chez l'animal, les doses tolérées sans effet indésirable observé.

A ces études, s'ajoutent les études de reproduction, de mutagénèse, de cancérogénèse, de toxicité cutanée et de photosensibilité.

2. Le développement clinique

Les études cliniques, qui constituent la première administration de la molécule chez l'Homme, n'auront lieu qu'à la condition que les résultats des études précliniques permettent d'espérer un effet thérapeutique de la molécule, ainsi qu'un emploi sûr et un potentiel commercial satisfaisant.

La promulgation le 20 décembre 1988 de la loi dite loi Huriet-Sérusclat, a permis de redéfinir le cadre législatif français quant à la recherche biomédicale. Elle a notamment abolit la distinction entre les recherches avec et sans bénéfice individuel direct des volontaires qui se prêtaient aux essais cliniques. Ajoutons à cette loi, celle du 9 août 2004 qui a permis de mettre en place les procédures suivantes :

- demande à l'ANSM d'une autorisation administrative à la réalisation d'un essai clinique
- l'obtention d'un avis favorable du Comité de Protection des Personnes régional (CPP)
- l'octroi d'une autorisation de la CNIL pour le recueil des données de patients dans le cadre du CRF (*Case Report Form*, cahier d'observation)

Les études cliniques pré-AMM se distinguent en trois phases :

- **Phase I** : réalisée avec un petit nombre de volontaires sains, sauf lorsqu'il s'agit de molécules trop toxiques de type cytotoxiques. Cette phase vise :
  - à la détermination de la dose à laquelle apparaissent les premiers effets pharmacodynamiques
  - à la détermination de la dose entraînant les premiers effets indésirables

Les doses testées dans cette phase sont déterminées en fonction des doses tolérées par les animaux au cours des essais précliniques. Cette première phase peut également intégrer une étude de la tolérance à l'administration.

- **Phase II** : cette phase vise à étudier l'efficacité pharmacologique du médicament candidat, c'est-à-dire à déterminer les conditions optimales de son utilisation. Cette phase vise également à dresser les profils pharmacocinétique et pharmacodynamique de la molécule chez l'Homme. Les études de phase II incluent un petit nombre de patients, ou parfois de volontaires sains qui reçoivent, dans ce cas, une substance qui modifie un état basal.

Pour la pharmacologie humaine, une relation dose-réponse est recherchée, ce qui permettra de déterminer la dose administrée au cours de la phase III. Le profil pharmacocinétique doit être établi en utilisant la forme galénique définitive du médicament. Ces études visent notamment à définir la biodisponibilité de ce composé. A la fin de la phase II, les effets indésirables doivent être connus.

Le tableau I présente la probabilité d'observer un effet indésirable, selon sa fréquence d'apparition et la taille de la population incluse dans un essai. Ce tableau traduit l'importance de disposer d'échantillons de patients suffisamment grands, notamment au cours de la phase II, afin de mettre en évidence les effets indésirables inhérents à l'administration de la molécule étudiée.

Tableau I : Probabilité d'observer au moins un cas d'un événement en fonction de la taille de l'échantillon surveillé et de la probabilité de survenue de cet événement (Bouvenot et Vray, 2006)

	Probabilité de survenue de l'événement						
Nombre de sujets	1/100	2/1000	1/1000	2/10000	1/10000	2/100000	1/100000
100	0,63	0,39	0,095	0,05	0,01	0,005	0
500	0,99	0,63	0,39	0,095	0,05	0,01	0,005
1000	1	0,99	0,63	0,39	0,095	0,05	0,01
5000	1	1	0,99	0,63	0,39	0,095	0,05
10000	1	1	1	0,99	0,63	0,39	0,095
50000	1	1	1	1	0,99	0,63	0,39
100000	1	1	1	1	1	0,99	0,63

- **Phase III :** parfois appelées « études pivot », les essais de phase III visent à évaluer l'efficacité du médicament dans les indications revendiquées pour l'AMM. Ces essais visent également à évaluer la tolérance du traitement. L'effet thérapeutique de cette molécule est évalué sur un paramètre précis.

D'un point de vue méthodologique, ces études cherchent à mettre en évidence une différence significative entre deux bras de traitement pour le paramètre mesuré. Les études portent en général sur plusieurs centaines, voire plusieurs milliers de patients.

Si les résultats de la phase III sont favorables, l'autorisation de mise sur le marché (AMM) est délivrée par l'ANSM en France. Une AMM est obtenue pour cinq ans. Puis le dossier d'AMM est réévalué par l'ANSM.

3. Etude post-AMM

Après la mise sur le marché d'un médicament, débute la phase IV. Cette phase consiste non seulement à relever et transmettre les effets indésirables liés à l'administration de la molécule, mais également à repositionner ou à étendre les indications de la molécule.

BIBLIOGRAPHIE

ABANE M., DOUDALI L., HAY B., PALLOT D., BOUILLON K., ZUREIK M., CANARELLI T., VEYRIES M.-L. Les anticoagulants en France en 2014 : état des lieux, synthèse et surveillance. Paris : ANSM, 2014.

Ablynx NV. Ablynx's - Annual Report - 2014. Ghent, Belgium , 2014, 214 p.

ABRAHAM E., LATERRE P.-F., GARG R., LEVY H., TALWAR D., TRZASKOMA B. L., FRANÇOIS B., GUY J. S., BRÜCKMANN M., REA-NETO A., ROSSAINT R., PERROTIN D., SABLOTZKI A., ARKINS N., UTTERBACK B. G., MACIAS W. L., Administration of Drotrecogin Alfa (Activated) in Early Stage Severe Sepsis (ADDRESS) Study Group. « Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. » *N. Engl. J. Med.* 29 septembre 2005. Vol. 353, n°13, p. 1332‑1341.

ABRAHAM E., REINHART K., OPAL S., DEMEYER I., DOIG C., RODRIGUEZ A. L., BEALE R., SVOBODA P., LATERRE P. F., SIMON S., LIGHT B., SPAPEN H., STONE J., SEIBERT A., PECKELSEN C., DE DEYNE C., POSTIER R., PETTILÄ V., ARTIGAS A., PERCELL S. R., SHU V., ZWINGELSTEIN C., TOBIAS J., POOLE L., STOLZENBACH J. C., CREASEY A. A., OPTIMIST Trial Study Group. « Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. » *JAMA*. 9 juillet 2003. Vol. 290, n°2, p. 238‑247.

ADAMS J. W., RAMIREZ J., SHI Y., THOMSEN W., FRAZER J., MORGAN M., EDWARDS J. E., CHEN W., TEEGARDEN B. R., XIONG Y., AL-SHAMMA H., BEHAN D. P., CONNOLLY D. T. APD791, 3-methoxy-n-(3-(1-methyl-1h-pyrazol-5-yl)-4-(2-morpholinoethoxy)phenyl)benzamide, a novel 5-hydroxytryptamine 2A receptor antagonist: pharmacological profile, pharmacokinetics, platelet activity and vascular biology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* octobre 2009. Vol. 331, n°1, p. 96‑103.

ADITYA S. Oral and parenteral anticoagulants: New kids on the block. » *J. Postgrad. Med*. 2012. Vol. 58, n°4, p. 275.

AdvanceCor Gmbh. « Revacept. » [En ligne]. Disponible sur : < http://www.advancecor.com/revacept.html (consulté le 14 mai 2015)

AMELI. Accompagnement des patients sous AVK. Disponible sur : http://www.ameli.fr/professionnels-de-sante/pharmaciens/votre-caisse-allier/en-ce-moment/accompagnement-des-patients-sous-avk_allier.php > (consulté le 18 janvier 2015)

ANSM. Bon usage des AVK. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé, 2012.

Asahi KASEI. Mechanism of Action - Recomodulin™ (ART-123) activates protein C through its binding to thrombin. [En ligne]. Disponible sur : < http://www.recomodulin.com/en/recomodulin/index.html > (consulté le 4 juin 2015)

BAJZAR L., NESHEIM M. The effect of activated protein C on fibrinolysis in cell-free plasma can be attributed specifically to attenuation of prothrombin activation. » *J. Biol. Chem.* 25 avril 1993. Vol. 268, n°12, p. 8608‑8616.

BAL DIT SOLLIER C., CRASSARD I., SIMONEAU G., BERGMANN J.-F., BOUSSER M. G., DROUET L. Effect of the thromboxane prostaglandin receptor antagonist terutroban on arterial thrombogenesis after repeated administration in patients treated for the prevention of ischemic stroke. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* 2009. Vol. 28, n°5, p. 505‑513.

BALSANO F., VIOLI F. Effect of picotamide on the clinical progression of peripheral vascular disease. A double-blind placebo-controlled study. The ADEP Group. » *Circulation*. mai 1993. Vol. 87, n°5, p. 1563‑1569.

BARTUNEK J., BARBATO E., HEYNDRICKX G., VANDERHEYDEN M., WIJNS W., HOLZ J.-B. Novel Antiplatelet Agents: ALX-0081, a Nanobody Directed towards von Willebrand Factor. *J Cardiovasc. Transl. Res.* 11 janvier 2013. Vol. 6, n°3, p. 355‑363.

BARTUNEK J., BARBATO E., VERCRUYSSE K., DUBY C., WIJNS W., HEYNDRICKX G., HOLZ J.-B. Abstract 15084: Safety and Efficacy of Anti-von Willebrand Factor Nanobody(R) ALX-0081 in Stable Angina Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *Circulation*. 23 novembre 2010. Vol. 122, n°21 Supplement, p. A15084.

BELHASSEN L., PELLE G., DUBOIS-RANDE J.-L., ADNOT S. Improved endothelial function by the thromboxane a2 receptor antagonist s 18886 in patients with coronary artery disease treated with aspirin. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2 avril 2003. Vol. 41, n°7, p. 1198‑1204.

BELLAMY F., HORTON D., MILLET J., PICART F., SAMRETH S., CHAZAN J. B. « Glycosylated derivatives of benzophenone, benzhydrol and benzhydril as potential venous antithrombotic agents. » *J. Med. Chem*. 1 avril 1993. Vol. 36, n°7, p. 898‑903.

BERGUM P. W., CRUIKSHANK A., MAKI S. L., KELLY C. R., RUF W., VLASUK G. P. Role of zymogen and activated factor X as scaffolds for the inhibition of the blood coagulation factor VIIa-tissue factor complex by recombinant nematode anticoagulant protein c2. *J. Biol. Chem*. 30 mars 2001. Vol. 276, n°13, p. 10063‑10071.

BERNARD G. R., VINCENT J.-L., LATERRE P.-F., LAROSA S. P., DHAINAUT J.-F., LOPEZ-RODRIGUEZ A., STEINGRUB J. S., GARBER G. E., HELTERBRAND J. D., ELY E. W., OTHERS. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* 2001. Vol. 344, n°10, p. 699–709.

BERNDT M. C., FOURNIER D. J., CASTALDI P. A. Four Bernard-Soulier syndrome. *Baillières Clin. Haematol*. juillet 1989. Vol. 2, n°3, p. 585‑607.

BOCK L. C., GRIFFIN L. C., LATHAM J. A., VERMAAS E. H., TOOLE J. J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*. 6 février 1992. Vol. 355, n°6360, p. 564‑566.

BONEU B., CAZENAVE J.-P. Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose. Laboratoires Boehringer-Ingelheim, 1982. 206 p.

BOUDALI L. Les anticoagulants - bénéfices cliniques et risques iatrogéniques. Communication, ANSM, Paris, 27 novembre 2013.

BOUSSER M. G., AMARENCO P., CHAMORRO A., FISHER M., FORD I., FOX K., HENNERICI M. G., MATTLE H. P., ROTHWELL P. M., PERFORM Study Investigators. Rationale and design of a randomized, double-blind, parallel-group study of terutroban 30 mg/day versus aspirin 100 mg/day in stroke patients: the prevention of cerebrovascular and cardiovascular events of ischemic origin with terutroban in patients with a history of ischemic stroke or transient ischemic attack (PERFORM) study. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz*. 2009. Vol. 27, n°5, p. 509‑518.

BOUSSER M.-G., AMARENCO P., CHAMORRO A., FISHER M., FORD I., FOX K. M., HENNERICI M. G., MATTLE H. P., ROTHWELL P. M., DE CORDOÜE A., FRATACCI M.-D., PERFORM Study Investigators. Terutroban versus aspirin in patients with cerebral ischaemic events (PERFORM): a randomised, double-blind, parallel-group trial. *Lancet*. 11 juin 2011. Vol. 377, n°9782, p. 2013‑2022.

BOUVENOT G., VRAY M. *Essais cliniques : théorie, pratique et critique*. 4e édition revue et augmentée. Médecine Sciences Publications, Paris. 2006. 462 p.

Bristol-Myers Squibb. « Bristol-Myers Squibb: In the Pipeline. » [En ligne]. 2015. Disponible sur : < http://www.bms.com/research/pipeline/Pages/default.aspx > (consulté le 22 juin 2015)

BROOS K., FEYS H. B., DE MEYER S. F., VANHOORELBEKE K., DECKMYN H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev*. juillet 2011. Vol. 25, n°4, p. 155‑167.

BROUSSALIS E., ANNA W., TRINKA E., MUTZENBACH S., KILLER M. Latest developments in anticoagulant drug discovery. *Drug Discov. Today*. juillet 2014. Vol. 19, n°7, p. 921‑935.

BROWN S. L., SOBEL B. E., FUJII S. Attenuation of the Synthesis of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 by Niacin A Potential Link Between Lipid Lowering and Fibrinolysis. *Circulation*. 15 août 1995. Vol. 92, n°4, p. 767‑772.

BÜLLER H. R., BETHUNE C., BHANOT S., GAILANI D., MONIA B. P., RASKOB G. E., SEGERS A., VERHAMME P., WEITZ J. I., FXI-ASO TKA Investigators. Factor XI antisense oligonucleotide for prevention of venous thrombosis. *N. Engl. J. Med.* 15 janvier 2015. Vol. 372, n°3, p. 232‑240.

BULTAS J. Antiplatelet therapy—A pharmacologist's perspective. *Cor Vasa*. avril 2013. Vol. 55, n°2, p. e86‑e94.

BUNKA D. H., PLATONOVA O., STOCKLEY P. G. Development of aptamer therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol*. octobre 2010. Vol. 10, n°5, p. 557‑562.

CAPODANNO D., BHATT D. L., GOTO S., O'DONOGHUE M. L., MOLITERNO D. J., TAMBURINO C., ANGIOLILLO D. J. Safety and efficacy of protease-activated receptor-1 antagonists in patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J. Thromb. Haemost.* 1 octobre 2012. Vol. 10, n°10, p. 2006‑2015.

CDC. « Centers for Disease Control and Prevention. » [En ligne]. Disponible sur : < http://www.cdc.gov/ > (consulté le 12 juin 2015)

CEGARRA-SANMARTÍN V., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ R., PANIAGUA-IGLESIAS P., SANTAMARÍA-ORTIZ A., CUEVA L. F., GALÁN-SERRANO J., VICTORIA MORAL-GARCÍA M. Fondaparinux as a Safe Alternative for Managing Heparin-Induced Thrombocytopenia in Postoperative Cardiac Surgery Patients. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth*. août 2014. Vol. 28, n°4, p. 1008‑1012.

CHAN M. Y., COHEN M. G., DYKE C. K., MYLES S. K., ABERLE L. G., LIN M., WALDER J., STEINHUBL S. R., GILCHRIST I. C., KLEIMAN N. S., VORCHHEIMER D. A., CHRONOS N., MELLONI C., ALEXANDER J. H., HARRINGTON R. A., TONKENS R. M., BECKER R. C., RUSCONI C. P. Phase 1b Randomized Study of Antidote-Controlled Modulation of Factor IXa Activity in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Circulation*. 6 mars 2008. Vol. 117, n°22, p. 2865‑2874.

CHAN M. Y., RUSCONI C. P., ALEXANDER J. H., TONKENS R. M., HARRINGTON R. A., BECKER R. C. A randomized, repeat-dose, pharmacodynamic and safety study of an antidote-controlled factor IXa inhibitor. *J. Thromb. Haemost. JTH*. mai 2008. Vol. 6, n°5, p. 789‑796.

CHAUVEAU F., PESTOURIE C., TAVITIAN B. Les aptamères ou l'évolution moléculaire dirigée : sélection et applications. *Pathologie Biologie*. mai 2006. Vol. 54, n°4, p. 251-258.

CHOW F.-S., BENINCOSA L. J., SHETH S. B., WILSON D., DAVIS C. B., MINTHORN E. A., JUSKO W. J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of humanized anti–factor IX antibody (SB 249417) in humans. *Clin. Pharmacol. Ther*. 1 avril 2002. Vol. 71, n°4, p. 235‑245.

CITELINE. About Citeline. [En ligne]. Disponible sur : < https://citeline.com/about/about-citeline/ > (consulté le 21 mai 2015)

COHEN A. T., IMFELD S., MARKHAM J., GRANZIERA S. The use of aspirin for primary and secondary prevention in venous thromboembolism and other cardiovascular disorders. *Thromb. Res.* février 2015. Vol. 135, n°2, p. 217‑225.

COHEN M. G., PURDY D. A., ROSSI J. S., GRINFELD L. R., MYLES S. K., ABERLE L. H., GREENBAUM A. B., FRY E., CHAN M. Y., TONKENS R. M., ZELENKOFSKE S., ALEXANDER J. H., HARRINGTON R. A., RUSCONI C. P., BECKER R. C. First clinical application of an actively reversible direct factor IXa inhibitor as an anticoagulation strategy in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Circulation*. 10 août 2010. Vol. 122, n°6, p. 614‑622.

Collectif Larousse. Le petit Larousse illustré - 2011. Editions Larousse, Paris, 2010. 1181 p.

COMER M. B., CACKETT K. S., GLADWELL S., WOOD L. M., DAWSON K. M. Thrombolytic activity of BB-10153, a thrombin-activatable plasminogen. *J. Thromb. Haemost*. 1 janvier 2005. Vol. 3, n°1, p. 146‑153.

CORBETT N. A. S. L., BUTLER R., SHIER J.D. Hole's Human Anatomy & Physiology, 7th. 7th Edition edition. William C Brown Communications. Dubuque, IA, 1995. 1125 p.

COSTOPOULOS C., NIESPIALOWSKA-STEUDEN M., KUKREJA N., GOROG D. A. Novel oral anticoagulants in acute coronary syndrome. *Int. J. Cardiol*. 10 septembre 2013. Vol. 167, n°6, p. 2449‑2455.

CREASEY A. A. New Potential Therapeutic Modalities: Tissue Factor Pathway Inhibitor. *Sepsis*. 1 octobre 1999. Vol. 3, n°2, p. 173‑182.

CROSBY J. R., MARZEC U., REVENKO A. S., ZHAO C., GAO D., MATAFONOV A., GAILANI D., MACLEOD A. R., TUCKER E. I., GRUBER A., HANSON S. R., MONIA B. P. Antithrombotic Effect of Antisense Factor XI Oligonucleotide Treatment in Primates. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* juillet 2013. Vol. 33, n°7, p. 1670‑1678.

CUI H., TAN W., SHI J., XIA Y. Recent Development in Thrombin Receptor Antagonist as Novel Antithrombotic Agent. *Open J. Med. Chem*. 2012. Vol. 02, n°04, p. 112‑118.

CURTIS L. D., BROWN A., COMER M. B., SENIOR J. M., WARRINGTON S., DAWSON K. M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of BB-10153, a thrombin-activatable plasminogen, in healthy volunteers. *J. Thromb. Haemost. JTH*. juin 2005. Vol. 3, n°6, p. 1180‑1186.

DAHLBACK B., CARLSSON M., SVENSSON P. J. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1 février 1993. Vol. 90, n°3, p. 1004‑1008.

Daiichi Sankyo CO, LTD. A year of achievements, a Future of Innovation - Annual Report 2008. Tokyo, Japon. Daiichi Sankyo CO., LTD, 2008.

Daiichi Sankyo CO, LTD. Pipeline Chart - R&D - Daiichi Sankyo. [En ligne]. Disponible sur : < http://www.daiichisankyo.com/rd/pipeline/development_pipeline/index.html > (consulté le 18 juin 2015)

DARMOSTUK M., RIMPELOVÁ S., GBELCOVÁ H., RUML T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol. Adv*. février 2015.

DeCODE genetics. deCODE Submits IND for Novel Anti-atherosclerosis Compound DG041. 13 janvier 2005. Disponible sur : < http://www.decode.com/decode-submits-ind-for-novel-anti-atherosclerosis-compound-dg041/> (consulté le 12 juin 2015)

DeCODE genetics. Positive Clinical Results for DG041 Lead Product Development Highlights at deCODE R &D Event. 25 juin 2007. Disponible sur : < http://www.decode.com/positive-clinical-results-for-dg041-lead-product-development-highlights-at-decode-r-d-event/ > (consulté le 12 juin 2015)

DELLON A. L., CURTIS R. M., CHEN C. Prevention of femoral vein occlusion by local injection of Thrombolysin in the rat. *J. Hand Surg*. mars 1979. Vol. 4, n°2, p. 121‑128.

DENAS G., PENGO V. Investigational anticoagulants for hematological conditions: a new generation of therapies. *Expert Opin. Investig. Drugs*. octobre 2013. Vol. 22, n°10, p. 1281‑1294.

DUBB J., HENDERSON L., OKADA S., PEYROU V., SAMUELS R., SHETH S., SPERA P., TOOMEY J., WILSON D. Methods of Treatment and Prevention. Brevet WO/2006/060647. 9 juin 2006.

Durand D. V., Jeunne C. L. Guide pratique des médicaments Dorosz 2014. 33e édition, Maloine. Paris, 2013. 1908 p.

DYKE C. K., STEINHUBL S. R., KLEIMAN N. S., CANNON R. O., ABERLE L. G., LIN M., MYLES S. K., MELLONI C., HARRINGTON R. A., ALEXANDER J. H., BECKER R. C., RUSCONI C. P. First-in-human experience of an antidote-controlled anticoagulant using RNA aptamer technology: a phase 1a pharmacodynamic evaluation of a drug-antidote pair for the controlled regulation of factor IXa activity. *Circulation*. 5 décembre 2006. Vol. 114, n°23, p. 2490‑2497.

EGUCHI Y., GANDO S., ISHIKURA H., SAITOH D., MIMURO J., TAKAHASHI H., KITAJIMA I., TSUJI H., MATSUSHITA T., TSUJITA R., NAGAO O., SAKATA Y. Post-marketing surveillance data of thrombomodulin alfa: sub-analysis in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *J. Intensive Care*. 30 avril 2014. Vol. 2, n°1, p. 30.

ELALAMY I., HATMI M. Quelle place pour l'aspirine en prophylaxie antithrombotique veineuse ?. *Ann. Cardiol. Angéiologie*. novembre 2002. Vol. 51, n°5, p. 296‑302.

ELLINGTON A. D., SZOSTAK J. W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 30 août 1990. Vol. 346, n°6287, p. 818‑822.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Résumé EPAR à l'intention du public - ZONTIVITY, Vorapaxar. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002814/human_med_001839.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 > (consulté le 14 mai 2015)

ERIKSSON B. I., DAHL O. E., LASSEN M. R., WARD D. P., ROTHLEIN R., DAVIS G., TURPIE A. G. G. Fixit Study Group. « Partial factor IXa inhibition with TTP889 for prevention of venous thromboembolism: an exploratory study. » *J. Thromb. Haemost. JTH*. mars 2008. Vol. 6, n°3, p. 457‑463.

FARMER E., BESSENGER J. deCODE Initiates Enrollment in Phase I Clinical Trial of DG041 for atherosclerosis. Disponible sur : < http://www.decode.com/decode-initiates-enrollment-in-phase-i-clinical-trial-of-dg041-for-atherosclerosis/ > (consulté le 12 juin 2015)

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION (FDA). Revacept in Symptomatic Carotid Stenosis (Revacept/CS/02) - (NCT01645306). [En ligne]. Disponible sur : <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01645306 > (consulté le 14 mai 2015)

FIESSINGER J. N., BOUNAMEAUX H., CAIROLS M. A., CLEMENT D. L., COCCHERI S., FLETCHER J. P., HOFFMANN U., TURPIE A. G. G. TAIPAD investigators. « Thromboxane Antagonism with terutroban in Peripheral Arterial Disease: the TAIPAD study. » *J. Thromb. Haemost. JTH*. novembre 2010. Vol. 8, n°11, p. 2369‑2376.

FIRBAS C., SILLER-MATULA J. M., JILMA B. Targeting von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib receptor. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* décembre 2010. Vol. 8, n°12, p. 1689‑1701.

FLAHAUT J. The diatessaron theriaque or low people theriaque. *Rev. Hist. Pharm.* 1998. Vol. 46, n°318, p. 173‑182.

FOLEY J. H., PETERSEN K.-U., REA C. J., HARPELL L., POWELL S., LILLICRAP D., NESHEIM M. E., SØRENSEN B. Solulin increases clot stability in whole blood from humans and dogs with hemophilia. *Blood*. 12 avril 2012. Vol. 119, n°15, p. 3622‑3628.

FRENCH S. L., ARTHUR J. F., TRAN H. A., HAMILTON J. R. Approval of the first protease-activated receptor antagonist: Rationale, development, significance, and considerations of a novel anti-platelet agent. *Blood Rev*. mai 2015. Vol. 29, n°3, p. 179-189.

FRIEDERICH P. W., LEVI M., BAUER K. A., VLASUK G. P., ROTE W. E., BREEDERVELD D., KELLER T., SPATARO M., BARZEGAR S., BÜLLER H. R. Ability of Recombinant Factor VIIa to Generate Thrombin During Inhibition of Tissue Factor in Human Subjects. *Circulation*. 29 mai 2001. Vol. 103, n°21, p. 2555‑2559.

FUJII S., SOBEL B. E. Direct effects of gemfibrozil on the fibrinolytic system. Diminution of synthesis of plasminogen activator inhibitor type 1. *Circulation*. 5 janvier 1992. Vol. 85, n°5, p. 1888‑1893.

FUNG V. Patients Enrollment Completed in Phase II Clinical Study of Anfibatide in China. [En ligne]. Disponible sur : < http://www.leespharm.com/en/media-detail.php?id=204 > (consulté le 26 mai 2015)

FUNG V. First patient enrolled in Phase Ib-IIa clinical study of Anfibatide for acute coronary syndrome (ACS). Disponible sur : < http://www.leespharm.com/en/media-detail.php?id=146> (consulté le 26 mai 2015)

FURIE B., FURIE B. C. Mechanisms of Thrombus Formation. *N. Engl. J. Med*. 28 août 2008. Vol. 359, n°9, p. 938‑949.

GANDRILLE S. Protéine C activée : de la relation structure/activité à la conception de molécules à propriétés thérapeutiques ciblées. *Hématologie*. 1 mars 2012. Vol. 18, n°2, p. 96‑108.

GAUSSEM P., RENY J.-L., THALAMAS C., CHATELAIN N., KROUMOVA M., JUDE B., BONEU B., FIESSINGER J.-N. The specific thromboxane receptor antagonist S18886: pharmacokinetic and pharmacodynamic studies. *J. Thromb. Haemost. JTH*. juillet 2005. Vol. 3, n°7, p. 1437‑1445.

GIBSON C. M., ZORKUN C., MOLHOEK P., ZMUDKA K., GREENBERG M., MUELLER H., WESDORP J., LOUWERENBURG H., NIEDERMAN A., WESTENBURG J., BIKKINA M., BATTY J., DE WINTER J., MURPHY S. A., MCCABE C. H. Dose escalation trial of the efficacy, safety, and pharmacokinetics of a novel fibrinolytic agent, BB-10153, in patients with ST elevation MI: results of the TIMI 31 trial. *J. Thromb. Thrombolysis*. août 2006. Vol. 22, n°1, p. 13‑21.

GILBERT J. C., DEFEO-FRAULINI T., HUTABARAT R. M., HORVATH C. J., MERLINO P. G., MARSH H. N., HEALY J. M., BOUFAKHREDDINE S., HOLOHAN T. V., SCHAUB R. G. First-in-human evaluation of anti von Willebrand factor therapeutic aptamer ARC1779 in healthy volunteers. *Circulation*. 4 décembre 2007. Vol. 116, n°23, p. 2678‑2686.

GIUGLIANO R. P., WIVIOTT S. D., STONE P. H., SIMON D. I., SCHWEIGER M. J., BOUCHARD A., LEESAR M. A., GOULDER M. A., DEITCHER S. R., MCCABE C. H., BRAUNWALD E. ANTHEM-TIMI-32 Investigators. « Recombinant nematode anticoagulant protein c2 in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome: the ANTHEM-TIMI-32 trial. » *J. Am. Coll. Cardiol*. 26 juin 2007. Vol. 49, n°25, p. 2398‑2407.

GÓMEZ-OUTES A., SUÁREZ-GEA M. L., LECUMBERRI R., ROCHA E., POZO-HERNÁNDEZ C., VARGAS-CASTRILLON E. New parenteral anticoagulants in development. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis*. 2 novembre 2010. p. 1753-62.

GOPINATH S. C. B. Anti-coagulant aptamers. *Thromb. Res*. 2008. Vol. 122, n°6, p. 838‑847.

GOUIN-THIBAUT I., SAMAMA M.-M. Thrombose veineuse et cancer. *Ann. Biol. Clin*. 24 novembre 2000. Vol. 58, n°6, p. 675‑82.

GRIFFIN J. H., ZLOKOVIC B. V., MOSNIER L. O. Activated protein C: biased for translation. » *Blood* . 7 mai 2015. Vol. 125, n°19, p. 2898‑2907.

HAMILTON J. R., CORNELISSEN I., COUGHLIN S. R. Impaired hemostasis and protection against thrombosis in protease-activated receptor 4-deficient mice is due to lack of thrombin signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost*. 1 août 2004. Vol. 2, n°8, p. 1429‑1435.

HANKEY G. J., EIKELBOOM J. W. Dabigatran Etexilate A New Oral Thrombin Inhibitor. *Circulation*. 4 mai 2011. Vol. 123, n°13, p. 1436‑1450.

HAN S. M., WEAVER F. A., COMEROTA A. J., PERLER B. A., JOING M. Efficacy and safety of alfimeprase in patients with acute peripheral arterial occlusion (PAO). *J. Vasc. Surg.* mars 2010. Vol. 51, n°3, p. 600‑609.

HANSSON G. K., LIBBY P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol*. juillet 2006. Vol. 6, n°7, p. 508‑519.

HE L., VICENTE C. P., WESTRICK R. J., EITZMAN D. T., TOLLEFSEN D. M. Heparin cofactor II inhibits arterial thrombosis after endothelial injury. *J. Clin. Invest*. 15 janvier 2002. Vol. 109, n°2, p. 213‑219.

HEMKER H. C., GIESEN P., DIERI R. AL, REGNAULT V., DE SMEDT E., WAGENVOORD R., LECOMPTE T., BÉGUIN S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol. Haemost. Thromb*. 2003. Vol. 33, n°1, p. 4‑15.

HEMKER, HENRIK COENRAAD, BEGUIN, SUZETTE. Pourquoi les schemas de coagulation sont-ils faux? *STV*. 1994. Vol. 6, n°Novembre, p. 619‑625.

HERDEWIJN P., MARLIÈRE P. Toward safe genetically modified organisms through the chemical diversification of nucleic acids. *Chem. Biodivers*. juin 2009. Vol. 6, n°6, p. 791‑808.

HIGHLAND CAPITAL PARTNERS. Archemix and Nuvelo Close Phase I Trial for Thrombin Inhibitor, ARC183 - With “Proof of Concept” Achieved, Companies Actively Pursuing an Optimized Second Generation Molecule. [En ligne]. Disponible sur : < http://www.hcp.com/content5788.html > (consulté le 28 avril 2015)

HIRSH J. Current anticoagulant therapy—unmet clinical needs. *Thromb. Res*. juillet 2003. Vol. 109, p. S1‑S8.

HIRSH J. New anticoagulants. *Blood*. 15 janvier 2005. Vol. 105, n°2, p. 453‑463.

HIRSH J., RASCHKE R. Heparin and low-molecular-weight heparin : The seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest*. 1 septembre 2004. Vol. 126, n°3_suppl, p. 188S‑203S.

HOFFBRAND V., MOSS P. Essential Haematology, Includes Desktop Edition. John Wiley & Sons, Chichester, Royaume-Uni, 2011. 467

HOFFMAN M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev.* septembre 2003. Vol. 17, n°Suppl. 1, p. 1‑5.

HOLZ J.-B. « The TITAN trial – Assessing the efficacy and safety of an anti-von Willebrand factor Nanobody in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfus. Apher. Sci*. juin 2012. Vol. 46, n°3, p. 343‑346.

HONG T.-T., HUANG J., DRISCOLL E., LUCCHESI B. R. Preclinical evaluation of S18886 in an experimental model of coronary arterial thrombosis. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. novembre 2006. Vol. 48, n°5, p. 239‑248.

HOU Y., LI B. X., DAI X., YANG Z., QIAN F., ZHANG G., XU Z., LIU J., LIANG C., ZHAO Y., SHEN J., ZHOU H., WANG Y., MARSHALL A. H., NI H. The First In Vitro and In Vivo Assessment Of Anfibatide, a Novel Glycoprotein Ib Antagonist, In Mice and In a Phase I Human Clinical Trial. *Blood*. 15 novembre 2013. Vol. 122, n°21, p. 577‑577.

HOWARD E. L., BECKER K. C. D., RUSCONI C. P., BECKER R. C. Factor IXa Inhibitors as Novel Anticoagulants. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 4 janvier 2007. Vol. 27, n°4, p. 722‑727.

JAYASENA S. D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. » *Clin. Chem.* septembre 1999. Vol. 45, n°9, p. 1628‑1650.

JIANG P., JANDROT-PERRUS M. New advances in treating thrombotic diseases : GPVI as a platelet drug target. 9 septembre 2014. Vol. 19, No. 19. p. 14711475.

JING F., ZHANG W. Thrombosis Therapy : Focus on Antiplatelet Agents. *Int. J. Genomic Med*. 2013. Vol. 1, n°1, p. 8.

KAGEYAMA S., YAMAMOTO H., NAKAZAWA H., MATSUSHITA J., KOUYAMA T., GONSHO A., IKEDA Y., YOSHIMOTO R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of AJW200, a humanized monoclonal antibody to von Willebrand factor, in monkeys. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* janvier 2002. Vol. 22, n°1, p. 187‑192.

KAI Y., HIRANO K., MAEDA Y., NISHIMURA J., SASAKI T., KANAIDE H. Prevention of the hypercontractile response to thrombin by proteinase-activated receptor-1 antagonist in subarachnoid hemorrhage. *Stroke J. Cereb. Circ*. décembre 2007. Vol. 38, n°12, p. 3259‑3265.

KANNEMEIER C., SHIBAMIYA A., NAKAZAWA F., TRUSHEIM H., RUPPERT C., MARKART P., SONG Y., TZIMA E., KENNERKNECHT E., NIEPMANN M., VON BRUEHL M.-L., SEDDING D., MASSBERG S., GÜNTHER A., ENGELMANN B., PREISSNER K. T. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 10 avril 2007. Vol. 104, n°15, p. 6388‑6393.

KEARON C., COMP P., DOUKETIS J., ROYDS R., YAMADA K., GENT M. Dose–response study of recombinant human soluble thrombomodulin (ART-123) in the prevention of venous thromboembolism after total hip replacement. *J. Thromb. Haemost*. 1 mai 2005. Vol. 3, n°5, p. 962‑968.

KEEFE A. D., PAI S., ELLINGTON A. Aptamers as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* juillet 2010. Vol. 9, n°7, p. 537‑550.

KINI R. M., CLEMETSON K. J., MARKLAND F. S., MCLANE M. A., MORITA T. Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside. Springer Science & Business Media, Hollande, 2010. 790 p.

KLEIMAN N. S., CALIFF R. M. Results from late-breaking clinical trials sessions at ACCIS 2000 and ACC 2000. *J. Am. Coll. Cardiol*. juillet 2000. Vol. 36, n°1, p. 310‑325.

KLEINSCHNITZ C., DE MEYER S. F., SCHWARZ T., AUSTINAT M., VANHOORELBEKE K., NIESWANDT B., DECKMYN H., STOLL G. Deficiency of von Willebrand factor protects mice from ischemic stroke. *Blood*. 9 avril 2009. Vol. 113, n°15, p. 3600‑3603.

KÖHLER G., MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 7 août 1975. Vol. 256, n°5517, p. 495‑497.

KUMAR D. R., HANLIN E., GLURICH I., MAZZA J. J., YALE S. H. Virchow's Contribution to the Understanding of Thrombosis and Cellular Biology. *Clin. Med. Res*. décembre 2010. Vol. 8, n°3-4, p. 168‑172.

LAPCHAK P. A., DOYAN S., FAN X., WOODS C. M. Synergistic Effect of AJW200, a von Willebrand Factor Neutralizing Antibody with Low Dose (0.9 mg/mg) Thrombolytic Therapy Following Embolic Stroke in Rabbits. *J. Neurol. Neurophysiol*. 1 avril 2013. Vol. 4, n°2,.

LATHAM J. A., JOHNSON R., TOOLE J. J. The application of a modified nucleotide in aptamer selection: novel thrombin aptamers containing 5-(1-pentynyl)-2'-deoxyuridine. *Nucleic Acids Res*. 25 juillet 1994. Vol. 22, n°14, p. 2817-2822.

LEADLEY JR. R. J., CHI L., REBELLO S. S., GAGNON A. Contribution of in vivo models of thrombosis to the discovery and development of novel antithrombotic agents. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. mars 2000. Vol. 43, n°2, p. 101‑116.

LEE A., AGNELLI G., BÜLLER H., GINSBERG J., HEIT J., ROTE W., VLASUK G., COSTANTINI L., JULIAN J., COMP P., VAN DER MEER J., PIOVELLA F., RASKOB G., GENT M. Dose-Response Study of Recombinant Factor VIIa/Tissue Factor Inhibitor Recombinant Nematode Anticoagulant Protein c2 in Prevention of Postoperative Venous Thromboembolism in Patients Undergoing Total Knee Replacement. *Circulation*. 7 mars 2001. Vol. 104, n°1, p. 74‑78.

LEE A. Y. Y., VLASUK G. P. Recombinant nematode anticoagulant protein c2 and other inhibitors targeting blood coagulation factor VIIa/tissue factor. *J. Intern. Med*. 1 octobre 2003. Vol. 254, n°4, p. 313‑321.

LEE M., OVBIAGELE B. Vascular events after stroke: terutroban fails to PERFORM. *The Lancet.* juin 2011. Vol. 377, n°9782, p. 1980‑1982.

LEI X., REHEMAN A., HOU Y., ZHOU H., WANG Y., MARSHALL A. H., LIANG C., DAI X., LI B. X., VANHOORELBEKE K., NI H. Anfibatide, a novel GPIb complex antagonist, inhibits platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo in murine models of thrombosis. *Thromb. Haemost.* février 2014. Vol. 111, n°2, p. 279‑289.

LIBBY P., RIDKER P. M., HANSSON G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 19 mai 2011. Vol. 473, n°7347, p. 317‑325.

LIEF J., DUCH M. C., WALSEY D. Arena Pharmaceuticals Announces Positive Phase 1b Clinical Trial Results of ADP791 for the Treatment of Arterial Thrombosis. San Diego, USA : Ablynx NV, 2014.

LI T.-T., FAN M.-L., HOU S.-X., LI X.-Y., BARRY D. M., JIN H., LUO S.-Y., KONG F., LIU L.-K., DAI X.-R., ZHANG G.-H., ZHOU L.-L. A novel snake-venom derived GPIb antagonist, anfibatide, protects mice from acute experimental ischemic stroke and reperfusion injury. *Br. J. Pharmacol*. 27 avril 2015.

LI W., WANG K., ZHAO M., YANG X., CHEN M., LAN X. Development of Aptamer oligonucleotides as Anticoagulants and Antithrombotics for Cardiovascular Diseases: Current Status. *Thromb. Res*. 1 octobre 2014. Vol. 134, n°4, p. 769‑773.

LI Z., NARDI M. A., LI Y.-S., ZHANG W., PAN R., DANG S., YEE H., QUARTERMAIN D., JONAS S., KARPATKIN S. C-terminal ADAMTS-18 fragment induces oxidative platelet fragmentation, dissolves platelet aggregates, and protects against carotid artery occlusion and cerebral stroke. *Blood*. 11 juin 2009. Vol. 113, n°24, p. 6051‑6060.

LLOYD I., BENSON A., STIRZAKER T., BRIDGE R. PharmaProjects. Disponible sur : < https://citeline.com/ > (consulté le 2 août 2015)

LOVE T. Safety Study of Recombinant NAPc2 to Prevent Tumor Progression and Metastases in Metastatic Colon Cancer. Disponible sur : < https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00443573?term=NAPc2&rank=1 > (consulté le 24 mars 2015)

LOWE G. D. O. Venous and arterial thrombosis: epidemiology and risk factors at various ages. *Maturitas*. avril 2004. Vol. 47, n°4, p. 259‑263.

LYDEN P., LEVY H., WEYMER S., PRYOR K., KRAMER W., GRIFFIN J. H., DAVIS T. P., ZLOKOVIC B. Phase 1 safety, tolerability and pharmacokinetics of 3K3A-APC in healthy adult volunteers. *Curr. Pharm. Des.* 2013. Vol. 19, n°42, p. 7479‑7485.

MACKMAN N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*. 21 février 2008. Vol. 451, n°7181, p. 914‑918.

MANGIN P-H., TANG CJ., BOURDON C., LOYAU S., FREUND M., HECHLER B., GACHET C, JANDROT-PERRUS M. A Humanized Glycoprotein VI (GPVI) Mouse Model to Assess the Antithrombotic Efficacies of Anti-GPVI Agents. *J. Pharm. and Exp. Ther.* 9 janvier 2012. Vol. 341, No. 1, p. 156-163.

MARDER V. J., NOVOKHATNY V. Direct fibrinolytic agents: biochemical attributes, preclinical foundation and clinical potential. *J. Thromb. Haemost*. 1 mars 2010. Vol. 8, n°3, p. 433‑444.

MARDER V. J., STEWART D. Towards safer thrombolytic therapy. *Semin. Hematol.* juillet 2002. Vol. 39, n°3, p. 206‑216.

MARKLAND F. S., SWENSON S. Fibrolase: Trials and Tribulations. *Toxins*. 20 avril 2010. Vol. 2, n°4, p. 793‑808.

MARKUS H. S., MCCOLLUM C., IMRAY C. The von Willebrand Inhibitor ARC1779 Reduces Cerebral Embolization After Carotid Endarterectomy a Randomized Trial. *J. Vasc. Surg*. décembre 2011. Vol. 54, n°6, p. 1847‑1848.

MARTINELLI I., DE STEFANO V., MANNUCCI P. M. Inherited risk factors for venous thromboembolism. *Nat. Rev. Cardiol*. 14 janvier 2014. Vol. 11, n°3, p. 140‑156.

MASSON P. J., COUP D., MILLET J., BROWN N. L. The effect of the beta-D-xyloside naroparcil on circulating plasma glycosaminoglycans. An explanation for its known antithrombotic activity in the rabbit. *J. Biol. Chem.* 10 février 1995. Vol. 270, n°6, p. 2662‑2668.

MATSUNO H., UEMATSU T., NIWA M., KOZAWA O., NAGASHIMA S., KOHNO K.-I., KATO H., KAWABATA Y., YOSHIDA Y., KANAMARU M. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of a New Thromboxane Receptor Antagonist (Z-335) after Single and Multiple Oral Administrations to Healthy Volunteers. *J. Clin. Pharmacol*. 1 juillet 2002. Vol. 42, n°7, p. 782‑790.

Mc CHESNEY C., HOERST S., PHILIP C. Cardiac Interventions Today - REG1 Novel Anticoagulant Falters in REGULATE PCI Trial. Disponible sur : < http://citoday.com/2015/02/reg1-novel-anticoagulant-falters-in-regulate-pci-trial/ > (consulté le 23 mars 2015)

MEIJERS J. C., TEKELENBURG W. L., BOUMA B. N., BERTINA R. M., ROSENDAAL F. R. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N. Engl. J. Med*. 9 mars 2000. Vol. 342, n°10, p. 696‑701.

MENDONSA S. D., BOWSER M. T. In Vitro Evolution of Functional DNA Using Capillary Electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc*. 1 janvier 2004. Vol. 126, n°1, p. 20‑21.

de MEYER S. F., STOLL G., WAGNER D. D., KLEINSCHNITZ C. Von Willebrand factor: an emerging target in stroke therapy. » *Stroke J. Cereb. Circ*. février 2012. Vol. 43, n°2, p. 599‑606.

MILANI M., LONGONI A., MADERNA M. Effects of picotamide, an antiplatelet agent, on cardiovascular, events in 438 claudicant patients with diabetes: a retrospective analysis of the ADEP study. *Br. J. Clin. Pharmacol.* décembre 1996. Vol. 42, n°6, p. 782‑785.

MIMURO J., TAKAHASHI H., KITAJIMA I., TSUJI H., EGUCHI Y., MATSUSHITA T., KURODA T., SAKATA Y. Impact of recombinant soluble thrombomodulin (thrombomodulin alfa) on disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Res.*. mai 2013. Vol. 131, n°5, p. 436‑443.

MOELLER J. Deutsche Bank : 40th Annual Health Care Conference [En ligne]. Disponible sur : < http://www.jnj.com/news/all/Johnson-Johnson-to-Participate-in-the-2015-Deutsche-Bank-40th-Annual-Health-Care-Conference > (consulté le 25 juin 2015)

MOLL S., KENYON P., BERTOLI L., MAIO J. D., HOMESLEY H., DEITCHER S. R. Phase II Trial of Alfimeprase, a Novel-Acting Fibrin Degradation Agent, for Occluded Central Venous Access Devices. *J. Clin. Oncol*. 7 janvier 2006. Vol. 24, n°19, p. 3056‑3060.

MONSUEZ J.-J. Rudolf Virchow: la thrombose, la triade et le duel. *Arch. Mal. Coeur Vaiss. Prat.* 2012. n°207, p. 33‑34.

MORROW D. A., SCIRICA B. M., FOX K. A. A., BERMAN G., STRONY J., VELTRI E., BONACA M. P., FISH P., MCCABE C. H., BRAUNWALD E. TRA 2(o)P-TIMI 50 Investigators. « Evaluation of a novel antiplatelet agent for secondary prevention in patients with a history of atherosclerotic disease: design and rationale for the Thrombin-Receptor Antagonist in Secondary Prevention of Atherothrombotic Ischemic Events (TRA 2 degrees P)-TIMI 50 trial. » *Am. Heart J.* septembre 2009. Vol. 158, n°3, p. 335‑341.

MOSCHONAS I. C., GOUDEVENOS J. A., TSELEPIS A. D. Protease-activated receptor-1 antagonists in long-term antiplatelet therapy. Current state of evidence and future perspectives. *Int. J. Cardiol*. 15 avril 2015. Vol. 185, p. 9‑18.

MOSES E., ALLAN E.-L. Ablynx's R&D day - Multiple NANOBODY® programmes in clinical and pre-clinical development. Ghent, Belgique. Ablynx NV, 2010.

MOSES E., VERMEERSCH M., ELLIOTT M.-J., BIELECKA A., NEVILLE L. Ablynx's anti-vWF nanobody, Caplacizumab, achieves clinical proof-of-concept in phase II TITAN study. Ghent, Belgique. Ablynx NV, 2014.

MOSNIER L. O., BOUMA B. N. Regulation of Fibrinolysis by Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor, an Unstable Carboxypeptidase B That Unites the Pathways of Coagulation and Fibrinolysis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 11 janvier 2006. Vol. 26, n°11, p. 2445‑2453.

MOSNIER L. O., FERNÁNDEZ J. A., DAVIS T. P., ZLOKOVIC B. V., GRIFFIN J. H. Influence of the 3K3A-activated protein C variant on the plasma clot lysis activity of t-PA and of t-PA on the variant's anticoagulant activity. *J. Thromb. Haemost. JTH*. novembre 2013. Vol. 11, n°11, p. 2059‑2062.

MOSNIER L. O., MEIJERS J. C., BOUMA B. N. Regulation of fibrinolysis in plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin. *Thromb. Haemost.* janvier 2001. Vol. 85, n°1, p. 5‑11.

MOTY-MONNEREAU C., DEVAUD C., CARDOSO R., PAGES F., DIA K. Recherche d'anticorps potentiellement responsables d'une thrombopénie induite par l'héparine. novembre 2005. p. 31.

NADEL S., GOLDSTEIN B., WILLIAMS M. D., DALTON H., PETERS M., MACIAS W. L., ABD-ALLAH S. A., LEVY H., ANGLE R., WANG D., SUNDIN D. P., GIROIR B. REsearching severe Sepsis and Organ dysfunction in children: a gLobal perspective (RESOLVE) study group. « Drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis: a multicentre phase III randomised controlled trial. » *Lancet*. 10 mars 2007. Vol. 369, n°9564, p. 836‑843.

NAGAI N., DEMARSIN E., VAN HOEF B., WOUTERS S., CINGOLANI D., LAROCHE Y., COLLEN D. Recombinant human microplasmin: production and potential therapeutic properties. *J. Thromb. Haemost*. 1 février 2003. Vol. 1, n°2, p. 307‑313.

NAGASHIMA M., WERNER M., WANG M., ZHAO L., LIGHT D. R., PAGILA R., MORSER J., VERHALLEN P. An Inhibitor of Activated Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor Potentiates Tissue-Type Plasminogen Activator-Induced Thrombolysis in a Rabbit Jugular Vein Thrombolysis Model. *Thromb. Res*. 15 mai 2000. Vol. 98, n°4, p. 333‑342.

NAGGI A., TORRI G. European publication server [En ligne]. Disponible sur : < https://data.epo.org/publication-server/rest/v1.0/publication-dates/19840829/patents/EP0116801NWA1/document.html > (consulté le 29 décembre 2014)

NERI SERNERI G. G., COCCHERI S., MARUBINI E., VIOLI F. Drug Evaluation in Atherosclerotic Vascular Disease in Diabetics (DAVID) Study Group. « Picotamide, a combined inhibitor of thromboxane A2 synthase and receptor, reduces 2-year mortality in diabetics with peripheral arterial disease: the DAVID study. *Eur. Heart J.* octobre 2004. Vol. 25, n°20, p. 1845‑1852.

O'DONOGHUE M. L., BHATT D. L., FLATHER M. D., GOTO S., ANGIOLILLO D. J., GOODMAN S. G., ZEYMER U., AYLWARD P. E., MONTALESCOT G., ZIECINA R., KOBAYASHI H., REN F., WIVIOTT S. D. Atopaxar and its effects on markers of platelet activation and inflammation: results from the LANCELOT CAD program. *J. Thromb. Thrombolysis*. 1 juin 2012. Vol. 34, n°1, p. 36‑43.

OGIHARA Y., MURAMATSU S., KANEDA Y., IIJIMA T., SHIBUTANI T., SHIBANO T. Pharmacological Profile of DZ-697b, a Novel Anti-Platelet Agent -Selective Inhibitor of vWF- and Collagen-Induced Platelet Aggregation. *ASH Annu. Meet. Abstr.* 16 novembre 2005. Vol. 106, n°11, p. 1875.

ORFANAKIS A., DELOUGHERY T. Patients with disorders of thrombosis and hemostasis. *Med. Clin. North Am*. novembre 2013. Vol. 97, n°6, p. 1161‑1180.

OTT I. Inhibitors of the initiation of coagulation. *Br. J. Clin. Pharmacol*. octobre 2011. Vol. 72, n°4, p. 547‑552.

OURIEL K., CYNAMON J., PINTO D. Safety and activity of alfimeprase for catheter-directed thrombolysis in patients with lower extremity, acute peripheral arterial occlusion : report of a phase 2, multi-center, multi-national, open-label, dose-escalation study (NAPA-1). *J. Vasc. Interv. Radiol.* 30 septembre 2004. vol 34 : p. 215 - 220

OURIEL K., CYNAMON J., WEAVER F. A., DARDIK H., AKERS D., BLEBEA J., GRUNEIRO L., TOOMBS C. F., WANG-CLOW F., MOHLER M., PENA L., WAN C.-Y., DEITCHER S. R. A Phase I Trial of Alfimeprase for Peripheral Arterial Thrombolysis. *J. Vasc. Interv. Radiol*. août 2005. Vol. 16, n°8, p. 1075‑1083.

PAKOLA S., CAHILLANE G., STASSEN J.-M., LIJNEN H. R., VERHAMME P. Neutralization of α2-antiplasmin by microplasmin: A randomized, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study in healthy male volunteers. *Clin. Ther*. août 2009. Vol. 31, n°8, p. 1688‑1706.

PAPAIOANNOU T. G., STEFANADIS C. Vascular wall shear stress: basic principles and methods. *Hell. J. Cardiol. HJC Hellēnikē Kardiologikē Epitheōrēsē*. février 2005. Vol. 46, n°1, p. 9‑15.

PATRONO C., ANDREOTTI F., ARNESEN H., BADIMON L., BAIGENT C., COLLET J.-P., CATERINA R. D., GULBA D., HUBER K., HUSTED S., KRISTENSEN S. D., MORAIS J., NEUMANN F.-J., RASMUSSEN L. H., SIEGBAHN A., STEG P.-G., STOREY R. F., WERF F. V. DE, VERHEUGT F. Antiplatelet agents for the treatment and prevention of atherothrombosis. » *Eur. Heart J.* 1 décembre 2011. Vol. 32, n°23, p. 2922‑2932.

PESTOURIE C., TAVITIAN B., DUCONGE F. Aptamers against extracellular targets for in vivo applications. *Biochimie*. septembre 2005. Vol. 87, n°9-10, p. 921‑930.

PHARMAPROJECTS. *Citeline - PharmaProject - DG-041 DRUG PROFILE*. Disponible sur : < https://citeline.com/ > (consulté le 2 août 2015)

POLLACK C. V., REILLY P. A., EIKELBOOM J., GLUND S., VERHAMME P., BERNSTEIN R. A., DUBIEL R., HUISMAN M. V., HYLEK E. M., KAMPHUISEN P. W., KREUZER J., LEVY J. H., SELLKE F. W., STANGIER J., STEINER T., WANG B., KAM C.-W., WEITZ J. I. Idarucizumab for Dabigatran Reversal. *N. Engl. J. Med*. 22 juin 2015. [non publié à ce jour]

POVSIC T. J., COHEN M. G., MEHRAN R., BULLER C. E., BODE C., CORNEL J. H., KASPRZAK J. D., MONTALESCOT G., JOSEPH D., WARGIN W. A., RUSCONI C. P., ZELENKOFSKE S. L., BECKER R. C., ALEXANDER J. H. A randomized, partially blinded, multicenter, active-controlled, dose-ranging study assessing the safety, efficacy, and pharmacodynamics of the REG1 anticoagulation system in patients with acute coronary syndromes: Design and rationale of the RADAR Phase IIb trial. *Am. Heart J.* février 2011. Vol. 161, n°2, p. 261‑268.

PREVITALI E., BUCCIARELLI P., PASSAMONTI S. M., MARTINELLI I. Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus*. avril 2011. Vol. 9, n°2, p. 120‑138.

PRIESTLEY E. S. Tissue factor–fVIIa inhibition: update on an unfinished quest for a novel oral antithrombotic. *Drug Discov. Today*. septembre 2014. Vol. 19, n°9, p. 1440‑1444.

PRZYKLENK K., FRELINGER A. L., LINDEN M. D., WHITTAKER P., LI Y., BARNARD M. R., ADAMS J., MORGAN M., AL-SHAMMA H., MICHELSON A. D. Targeted inhibition of the serotonin 5HT2A receptor improves coronary patency in an in vivo model of recurrent thrombosis. *J. Thromb. Haemost. JTH*. février 2010. Vol. 8, n°2, p. 331‑340.

RADOM F., JUREK P. M., MAZUREK M. P., OTLEWSKI J., JELEŃ F. Aptamers: Molecules of great potential. *Biotechnol. Adv*. décembre 2013. Vol. 31, n°8, p. 1260‑1274.

ROSENBERG R. D., ROSENBERG J. S. Natural anticoagulant mechanisms. *J. Clin. Invest.* juillet 1984. Vol. 74, n°1, p. 1‑6.

ROSENDAAL F. R., RASKOB G. E. On World Thrombosis Day. *The Lancet*. novembre 2014. Vol. 384, n°9955, p. 1653‑1654.

ROSENFELD L., GROVER G. J., STIER C. T. Ifetroban sodium: an effective TxA2/PGH2 receptor antagonist. *Cardiovasc. Drug Rev.* 2001. Vol. 19, n°2, p. 97‑115.

ROUCH A., VANUCCI-BACQUÉ C., BEDOS-BELVAL F., BALTAS M. Small molecules inhibitors of plasminogen activator inhibitor-1 – An overview. *Eur. J. Med. Chem*. 6 mars 2015. Vol. 92, p. 619‑636.

RUCKMAN J., GREEN L. S., BEESON J., WAUGH S., GILLETTE W. L., HENNINGER D. D., CLAESSON-WELSH L., JANJIĆ N. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.* 7 août 1998. Vol. 273, n°32, p. 20556-20567.

RUSCONI C. P., SCARDINO E., LAYZER J., PITOC G. A., ORTEL T. L., MONROE D., SULLENGER B. A. RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. *Nature*. 5 septembre 2002. Vol. 419, n°6902, p. 90‑94.

RYANG Y.-M., DANG J., KIPP M., PETERSEN K.-U., FAHLENKAMP A. V., GEMPT J., WESP D., ROSSAINT R., BEYER C., COBURN M. Solulin reduces infarct volume and regulates gene-expression in transient middle cerebral artery occlusion in rats. *BMC Neurosc*. 2011. Vol. 12, n°1, p. 113.

SAITO H., MARUYAMA I., SHIMAZAKI S., YAMAMOTO Y., AIKAWA N., OHNO R., HIRAYAMA A., MATSUDA T., ASAKURA H., NAKASHIMA M., AOKI N. Efficacy and safety of recombinant human soluble thrombomodulin (ART-123) in disseminated intravascular coagulation: results of a phase III, randomized, double-blind clinical trial. *J. Thromb. Haemost*. 1 janvier 2007. Vol. 5, n°1, p. 31‑41.

SALOMON O., STEINBERG D. M., KOREN-MORAG N., TANNE D., SELIGSOHN U. Reduced incidence of ischemic stroke in patients with severe factor XI deficiency. *Blood*. 15 avril 2008. Vol. 111, n°8, p. 4113‑4117.

SAMAMA M.-M., GEROTZIAFAS G. Les nouveaux anticoagulants. *Ann. Pharm. Fr*. mars 2007. Vol. 65, n°2, p. 85‑94.

SCHAFFER C. « DeCode Genetics Buy Adds to Amgen's Genomics Arsenal. » *BioWorld*. 6 octobre 2012

SCHMIDT K. S., BORKOWSKI S., KURRECK J., STEPHENS A. W., BALD R., HECHT M., FRIEBE M., DINKELBORG L., ERDMANN V. A. Application of locked nucleic acids to improve aptamer in vivo stability and targeting function. *Nucleic Acids Res*. 2004. Vol. 32, n°19, p. 5757-5765.

SCIRICA B. M., BONACA M. P., BRAUNWALD E., DE FERRARI G. M., ISAZA D., LEWIS B. S., MEHRHOF F., MERLINI P. A., MURPHY S. A., SABATINE M. S., TENDERA M., VAN DE WERF F., WILCOX R., MORROW D. A. TRA 2°P-TIMI 50 Steering Committee Investigators. « Vorapaxar for secondary prevention of thrombotic events for patients with previous myocardial infarction: a prespecified subgroup analysis of the TRA 2°P-TIMI 50 trial. » *Lancet*. 13 octobre 2012. Vol. 380, n°9850, p. 1317‑1324.

SHLANSKY-GOLDBERG R. D., MATSUMOTO A. H., BAUMBACH G. A., SIEGEL J. B., RAABE R. D., MURPHY T. P., DENG C., DAWKINS J. R., MARDER V. J. A First-In-Human Phase I Trial Of Locally-Delivered Human Plasmin For Hemodialysis Graft Occlusion. *J. Thromb. Haemost. JTH*. juin 2008. Vol. 6, n°6, p. 944‑950.

SMILEY D. A., BECKER R. C. Factor IXa as a target for anticoagulation in thrombotic disorders and conditions. *Drug Discov. Today*. septembre 2014. Vol. 19, n°9, p. 1445‑1453.

SMYTH S. S., WOULFE D. S., WEITZ J. I., GACHET C., CONLEY P. B., GOODMAN S. G., ROE M. T., KULIOPULOS A., MOLITERNO D. J., FRENCH P. A., STEINHUBL S. R., BECKER R. C. 2008 Platelet Colloquium Participants. « G-protein-coupled receptors as signaling targets for antiplatelet therapy. » *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. avril 2009. Vol. 29, n°4, p. 449‑457.

SPANIER T. B., CHEN J. M., OZ M. C., EDWARDS N. M., KISIEL W., STERN D. M., ROSE E. A., SCHMIDT A. M. Selective anticoagulation with active site-blocked factor IXa suggests separate roles for intrinsic and extrinsic coagulation pathways in cardiopulmonary bypass. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* novembre 1998. Vol. 116, n°5, p. 860‑869.

STEIN C. A. Exploiting the potential of antisense: beyond phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Chemistry & Biology*. mai 1996. Vol. 3, n°5, p. 319-323.

SUNDARAM P., KURNIAWAN H., BYRNE M. E., WOWER J. Therapeutic RNA aptamers in clinical trials. *Eur. J. Pharm. Sci*. janvier 2013. Vol. 48, n°1-2, p. 259‑271.

TANAKA T., FUKUTA Y., HIGASHINO R., SATO R., NOMURA Y., FUKUDA Y., ITO S., TAKEI M., KURIMOTO T., TAMAKI H. Antiplatelet effect of Z-335, a new orally active and long-lasting thromboxane receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*11 septembre 1998. Vol. 357, n°1, p. 53‑60.

THERIAQUE.ORG. THALIDOMIDE CLG 50MG GELULE - Monographie specialité. In : *Thériaque.org* [En ligne]. Disponible sur : < http://www.theriaque.org/> (consulté le 24 juin 2014)

THERIAQUE.ORG. INTEGRILIN 0,75mg/mL - Monographie de la specialité. [En ligne]. Disponible sur : < http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=12038&info=INDIC > (consulté le 21 décembre 2014)

THIJS V. N. S., PEETERS A., VOSKO M., AICHNER F., SCHELLINGER P. D., SCHNEIDER D., NEUMANN-HAEFELIN T., RÖTHER J., DAVALOS A., WAHLGREN N., VERHAMME P. Randomized, placebo-controlled, dose-ranging clinical trial of intravenous microplasmin in patients with acute ischemic stroke. *Stroke J. Cereb. Circ.* décembre 2009. Vol. 40, n°12, p. 3789‑3795.

TILLY P., CHARLES A.-L., LUDWIG S., SLIMANI F., GROSS S., MEILHAC O., GENY B., STEFANSSON K., GURNEY M. E., FABRE J.-E. Blocking the EP3 receptor for PGE2 with DG-041 decreases thrombosis without impairing haemostatic competence. *Cardiovasc. Res.*1 mars 2014. Vol. 101, n°3, p. 482‑491.

TOOMEY J. R., ABBOUD M. A., VALOCIK R. E., KOSTER P. F., BURNS-KURTIS C. L., PILLARISETTI K., DANOFF T. M., ERHARDT J. A. A comparison of the beta-D-xyloside, odiparcil, to warfarin in a rat model of venous thrombosis. *J. Thromb. Haemost. JTH*. septembre 2006. Vol. 4, n°9, p. 1989‑1996.

TOOMEY J. R., BLACKBURN M. N., STORER B. L., VALOCIK R. E., KOSTER P. F., FEUERSTEIN G. Comparing the Antithrombotic Efficacy of a Humanized Anti-factor IX(a) Monoclonal Antibody (SB 249417) to the Low Molecular Weight Heparin Enoxaparin In a Rat Model of Arterial Thrombosis. *Thromb. Res.*1 octobre 2000. Vol. 100, n°1, p. 73‑79.

TOOMEY J. R., VALOCIK R. E., KOSTER P. F., GABRIEL M. A., MCVEY M., HART T. K., OHLSTEIN E. H., PARSONS A. A., BARONE F. C. Inhibition of factor IX(a) is protective in a rat model of thromboembolic stroke. *Stroke J. Cereb. Circ.* février 2002. Vol. 33, n°2, p. 578‑585.

TOULME J., GIEGE R. Les aptamères : des ligands et des catalyseurs oligonucléotidiques obtenus par sélection in vitro. *CNRS - médecine/sciences*. 1998. Vol. 14, n°2, p. 155.

TRICOCI P., HUANG Z., HELD C., MOLITERNO D. J., ARMSTRONG P. W., VAN DE WERF F., WHITE H. D., AYLWARD P. E., WALLENTIN L., CHEN E., LOKHNYGINA Y., PEI J., LEONARDI S., RORICK T. L., KILIAN A. M., JENNINGS L. H. K., AMBROSIO G., BODE C., CEQUIER A., CORNEL J. H., DIAZ R., ERKAN A., HUBER K., HUDSON M. P., JIANG L., JUKEMA J. W., LEWIS B. S., LINCOFF A. M., MONTALESCOT G., NICOLAU J. C., OGAWA H., PFISTERER M., PRIETO J. C., RUZYLLO W., SINNAEVE P. R., STOREY R. F., VALGIMIGLI M., WHELLAN D. J., WIDIMSKY P., STRONY J., HARRINGTON R. A., MAHAFFEY K. W. TRACER Investigators. « Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes. » *N. Engl. J. Med*. 5 janvier 2012. Vol. 366, n°1, p. 20‑33.

TROUSSEAU A. *Phlegmasia alba dolens*. Ballière, Paris, 1865. p. 654.

TSAO C.-M., HO S.-T., WU C.-C. Coagulation abnormalities in sepsis. *Acta Anaesthesiol. Taiwan*. mars 2015. Vol. 53, n°1, p. 16‑22.

TSENG Y.-L., CHIANG M.-L., LANE H.-Y., SU K.-P., LAI Y.-C. Selective serotonin reuptake inhibitors reduce P2Y12 receptor-mediated amplification of platelet aggregation. *Thromb. Res*. avril 2013. Vol. 131, n°4, p. 325‑332.

TUERK C., GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 3 août 1990. Vol. 249, n°4968, p. 505‑510.

TURPIE A. G. G., ERIKSSON B. I., LASSEN M. R., BAUER K. A. Fondaparinux, the first selective factor Xa inhibitor. *Curr. Opin. Hematol.* septembre 2003. Vol. 10, n°5, p. 327‑332.

TURPIE A. G. G., ESMON C. Venous and arterial thrombosis – pathogenesis and the rationale for anticoagulation. *Thromb. Haemost.* 12 janvier 2011. Vol. 105, n°4, p. 586‑596.

UNGERER M., LI Z., BAUMGARTNER C., GOEBEL S., VOGELMANN J., HOLTHOFF H.-P., GAWAZ M., MÜNCH G. The GPVI-Fc fusion protein Revacept reduces thrombus formation and improves vascular dysfunction in atherosclerosis without any impact on bleeding times. *PloS One*. 2013. Vol. 8, n°8, p. e71193.

UNGERER M., ROSPORT K., BÜLTMANN A., PIECHATZEK R., UHLAND K., SCHLIEPER P., GAWAZ M., MÜNCH G. Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation*. 3 mai 2011. Vol. 123, n°17, p. 1891‑1899.

VANDENDRIES E. R., HAMILTON J. R., COUGHLIN S. R., FURIE B., FURIE B. C. PAR-4 is required for platelet thrombus propagation but not fibrin generation in a mouse model of thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2 janvier 2007. Vol. 104, n°1, p. 288‑292.

VANHOORELBEKE K., ULRICHTS H., SCHOOLMEESTER A., DECKMYN H. Inhibition of platelet adhesion to collagen as a new target for antithrombotic drugs. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* juin 2003. Vol. 3, n°2, p. 125‑140.

VAN IERSEL T., STROISSNIG H., GIESEN P., WEMER J., WILHELM-OGUNBIYI K. Phase I study of Solulin, a novel recombinant soluble human thrombomodulin analogue. *Thromb. Haemost*. février 2011. Vol. 105, n°2, p. 302‑312.

VERHAMME P., PAKOLA S., JENSEN T. J., BERGGREN K., SONESSON E., SAINT-REMY J.-M., BALCHEN T., BELMANS A., CAHILLANE G., STASSEN J.-M., PEERLINCK K., GLAZER S., JACQUEMIN M. Tolerability and pharmacokinetics of TB-402 in healthy male volunteers. *Clin. Ther.* 1 juin 2010. Vol. 32, n°6, p. 1205‑1220.

VERHAMME P., TANGELDER M., VERHAEGHE R., AGENO W., GLAZER S., PRINS M., JACQUEMIN M., BÜLLER H., Tb-402 Study Group. « Single intravenous administration of TB-402 for the prophylaxis of venous thromboembolism after total knee replacement: a dose-escalating, randomized, controlled trial. » *J. Thromb. Haemost*. 1 avril 2011. Vol. 9, n°4, p. 664‑671.

VERNALIS PLC. *Annual Report and Accounts* [En ligne]. Disponible sur : < http://www.vernalis.com/images/Vernalis_PDFs/vernalis_ar10.pdf > (consulté le 14 juin 2015)

VERSTEEG H. H., HEEMSKERK J. W. M., LEVI M., REITSMA P. H. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol. Rev*. 1 janvier 2013. Vol. 93, n°1, p. 327‑358.

VERSTUYFT C., SIMON T., KIM R. B. Personalized medicine and antiplatelet therapy: ready for prime time?. *Eur. Heart J.* 1 août 2009. Vol. 30, n°16, p. 1943‑1963.

VINCENT J.-L., RAMESH M. K., ERNEST D., LAROSA S. P., PACHL J., AIKAWA N., HOSTE E., LEVY H., HIRMAN J., LEVI M., DAGA M., KUTSOGIANNIS D. J., CROWTHER M., BERNARD G. R., DEVRIENDT J., PUIGSERVER J. V., BLANZACO D. U., ESMON C. T., PARRILLO J. E., GUZZI L., HENDERSON S. J., POTHIRAT C., MEHTA P., FAREED J., TALWAR D., TSURUTA K., GORELICK K. J., OSAWA Y., KAUL I. A randomized, double-blind, placebo-controlled, Phase 2b study to evaluate the safety and efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin, ART-123, in patients with sepsis and suspected disseminated intravascular coagulation. *Crit. Care Med*. septembre 2013. Vol. 41, n°9, p. 2069‑2079.

VLASUK G. P., ROTE W. E. Inhibition of factor VIIa/tissue factor with nematode anticoagulant protein c2: from unique mechanism to a promising new clinical anticoagulant. *Trends Cardiovasc. Med.* novembre 2002. Vol. 12, n°8, p. 325‑331.

WALSH S. FDA approves Zontivity to reduce the risk of heart attacks and stroke in high-risk patients. [En ligne]. Disponible sur : http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm396585.htm (consulté le 14 mai 2015)

WEITZ J. I., EIKELBOOM J. W., SAMAMA M. M. New antithrombotic drugs: Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: american college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 1 février 2012. Vol. 141, n°2_suppl, p. e120S‑e151S.

WEITZ J. I., LINKINS L.-A. Beyond heparin and warfarin: the new generation of anticoagulants. *Expert Opin. Investig. Drugs*. mars 2007. Vol. 16, n°3, p. 271‑282.

WILLIAMS P. D., ZLOKOVIC B. V., GRIFFIN J. H., PRYOR K. E., DAVIS T. P. Preclinical safety and pharmacokinetic profile of 3K3A-APC, a novel, modified activated protein C for ischemic stroke. *Curr. Pharm. Des.* 2012. Vol. 18, n°27, p. 4215‑4222.

WIVIOTT S. D., FLATHER M. D., O'DONOGHUE M. L., GOTO S., FITZGERALD D. J., CURA F., AYLWARD P., GUETTA V., DUDEK D., CONTANT C. F., ANGIOLILLO D. J., BHATT D. L., LANCELOT-CAD Investigators. « Randomized trial of atopaxar in the treatment of patients with coronary artery disease: the lessons from antagonizing the cellular effect of Thrombin–Coronary Artery Disease Trial. » *Circulation*. 3 mai 2011. Vol. 123, n°17, p. 1854‑1863.

WONG P. C., CRAIN E. J., WATSON C. A., SCHUMACHER W. A. A small-molecule factor XIa inhibitor produces antithrombotic efficacy with minimal bleeding time prolongation in rabbits. *J. Thromb. Thrombolysis*. août 2011. Vol. 32, n°2, p. 129‑137.

YEUNG J., HOLINSTAT M. Newer agents in antiplatelet therapy: a review. *J. Blood Med.* 25 juin 2012. Vol. 3, p. 33‑42.

YOUNIS H. S., CROSBY J., HUH J.-I., LEE H. S., RIME S., MONIA B., HENRY S. P. Antisense inhibition of coagulation factor XI prolongs APTT without increased bleeding risk in cynomolgus monkeys. *Blood*. 8 mars 2012. Vol. 119, n°10, p. 2401‑2408.

ZAFAR M. U., IBÁÑEZ B., CHOI B. G., VORCHHEIMER D. A., PIÑERO A., JIN X., SHARMA R. K., BADIMON J. J. A new oral antiplatelet agent with potent antithrombotic properties: comparison of DZ-697b with clopidogrel a randomised phase I study. *Thromb. Haemost*. janvier 2010. Vol. 103, n°1, p. 205‑212.

ZAHID M., MANGIN P., LOYAU S., HECHLER B., BILLIALD P., GACHET C., JANDROT-PERRUS M. The future of glycoprotein VI as antithrombotic target. *J. Thromb anfd Haem.* 2012. Vol. 10. p. 2418-2427

ZHANG H., LOWENBERG E. C., CROSBY J. R., MACLEOD A. R., ZHAO C., GAO D., BLACK C., REVENKO A. S., MEIJERS J. C. M., STROES E. S., LEVI M., MONIA B. P. Inhibition of the intrinsic coagulation pathway factor XI by antisense oligonucleotides: a novel antithrombotic strategy with lowered bleeding risk. *Blood*. 25 novembre 2010. Vol. 116, n°22, p. 4684‑4692.

ZHANG W., LI Y.-S., NARDI M. A., DANG S., YANG J., JI Y., LI Z., KARPATKIN S., WISNIEWSKI T. Dissolution of arterial platelet thrombi in vivo with a bifunctional platelet GPIIIa49-66 ligand which specifically targets the platelet thrombus. *Blood*. 30 septembre 2010. Vol. 116, n°13, p. 2336‑2344.

FACULTE DE PHARMACIE UNIVERSITE DE LORRAINE

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 2 Octobre 2015

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présenté par : Nicolas BALLOIS

Sujet : NOUVELLES CIBLES DE MEDICAMENTS ANTITHROMBOTIQUES EN COURS DE DEVELOPPEMENT

Jury :

Président : Mme. Béatrice FAIVRE, Professeur
Directeur : M. Julien PERRIN, Maître de Conférences
Juges : Mme. Michèle MARTIN, AHU
M. Philippe LADURE, Pharmacien

Vu,

Nancy, le 27 Août 2015

Le Président du Jury

Mme. Béatrice FAIVRE

Directeur de Thèse,

M. Julien PERRIN

Vu et approuvé,

Nancy, le 28.08.2015

Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,

UNIVERSITE DE LORRAINE FACULTE DE PHARMACIE

Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le 12.09.15

Le Président de l'Université de Lorraine,

Pour le Président et par délégation
Le Vice-Président

Martial DELIGNON

Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 7067

N° d'identification :

TITRE

NOUVELLES CIBLES DE MEDICAMENTS ANTITHROMBOTIQUES EN COURS DE DEVELOPPEMENT

Thèse soutenue le 2 octobre 2015

Par Nicolas BALLOIS

RESUME :

Les pathologies cardiovasculaires représentent la cause majoritaire de décès dans le monde. Parmi ces pathologies figure la thrombose. On différencie d'une part la thrombose artérielle dont les complications sont l'AVC et l'infarctus du myocarde. D'autre part, parmi les complications de la thrombose veineuse, citons la thrombose veineuse profonde ou encore l'embolie pulmonaire. Il existe actuellement de nombreux médicaments antithrombotiques sur le marché. Schématiquement, les antiplaquettaires sont utilisés pour prévenir la thrombose artérielle, tandis que les anticoagulants sont administrés pour prévenir la thrombose veineuse. Quant aux thrombolytiques, ils sont utilisés en urgence comme traitement curatif de la thrombose. Toutefois, l'administration de telles molécules n'est pas sans conséquence : les héparines exposent à un risque de thrombopénie, l'administration d'AVK nécessite un strict suivi biologique, il n'existe pas d'antidotes pour les AOD, Ticagrelor exposent à un risque de dyspnées et de bradycardie, …

Aussi, la recherche clinique pour de nouveaux antithrombotiques devrait s'orienter vers des molécules présentant un meilleur rapport bénéfice/risque. Ce document présente le profil de l'antithrombotique idéal. Puis, il est discuté de la pertinence de cibles antithrombotiques potentielles, au vu des connaissances actuelles de la physiologie de l'hémostase. Enfin, sont présentées les molécules antithrombotiques qui font actuellement l'objet d'essais cliniques. Les objectifs, la méthodologie et les résultats de ces essais sont également traités.

MOTS CLES : médicaments antithrombotiques, thrombose, recherche clinique, essais cliniques

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr. Julien PERRIN	**Laboratoire d'hématologie**	**Expérimentale** ☐ **Bibliographique** ☒ **Thème : 3**

Thèmes **1 – Sciences fondamentales** **2 – Hygiène/Environnement**
3 – Médicament **4 – Alimentation – Nutrition**
5 - Biologie **6 – Pratique professionnelle**