

a simulé l'évolution de 1975 à 1997. Un levé de 1997 et celui de 1975 effectué lors des études du Laboratoire central d'hydraulique de France ont vérifié la validité de la modélisation en s'assurant que les résultats du modèle correspondaient à l'évolution connue. Le modèle a ensuite simulé l'évolution prévisible dans un délai de 45 ans à partir de la situation de 1997, d'abord en l'absence de nouveaux travaux, puis sous l'effet de divers aménagements, afin de choisir les plus adaptés.

À la suite de ces études, un programme général d'aménagement a pu être proposé à la fin de 1999. Ce programme comprend une opération demandée depuis les années 1880 : la suppression partielle de la digue-route d'accès au Mont. La digue sera remplacée sur plus de 500 mètres par un pont-passerelle dont les piles n'offriront qu'une faible résistance aux courants.

La pièce maîtresse de ce programme consiste cependant en l'utilisation nouvelle du Couesnon, grâce à la construction d'un nouveau barrage remplaçant celui de La Caserne, construit en 1969. Le Couesnon, qui draine un bassin-versant d'environ 1 100 kilomètres carrés, a un débit moyen annuel de dix mètres cubes par seconde. Les débits de crue qui seuls sont efficaces pour entraîner les sédiments de la baie, sont trop peu fréquents pour dégager les abords du Mont : cinq pour cent des débits journaliers dépassent 50 mètres cubes par seconde et seulement un pour cent sont de l'ordre de 100 mètres cubes par seconde. Dans ces conditions, il faut accroître les débits de jusan du Couesnon pour créer des chasses efficaces.

Fonctionnement du barrage et chasse des sédiments

Pour ce faire, le nouveau barrage, d'une largeur hydraulique de 80 mètres contre les 36 mètres de l'ancien barrage de La Caserne, doit permettre l'entrée d'eau de mer à marée haute, lors des marées de coefficient égal ou supérieur à 75, qui représentent 42 pour cent des marées. Afin de limiter l'entrée des sédiments marins dans le Couesnon, il est prévu d'effectuer le remplissage par surverse, c'est-à-dire par un écoulement au-dessus des vannes, quelque temps après l'arrivée du premier flot. Afin d'accroître les chasses d'eaux, le curage du Couesnon sur quatre kilomètres et le creusement sur 21 hectares d'un ancien lobe de méandre du

Couesnon, l'anse de Moidrey, augmenteront considérablement le volume d'eau disponible pour les chasses. Celui-ci pourrait ainsi atteindre exceptionnellement 1 700 000 mètres cubes.

Ces eaux ainsi emmagasinées seront libérées six heures environ après la pleine mer. Elles s'écouleront pendant environ une heure par sous-verse, c'est-à-dire par un écoulement au-dessous des vannes, afin d'effectuer une chasse puissante, comparable à une crue d'automne, selon deux chenaux principaux de chaque côté d'un seuil de partage couvert par la plupart des pleines mers. Les deux chenaux passeront de part et d'autre du Mont. Le plus important, le chenal occidental, recevra 70 pour cent du débit de chasse, alors que le chenal oriental ne recevra que 30 pour cent du débit et passera sous le nouveau pont. Une série d'épis sont prévus à l'Ouest du bras occidental afin d'éviter des divagations périlleuses pour les polders, ainsi que des épis déflecteurs le long du seuil et des épis écarteurs flanquant le Mont lui-même. L'ensemble redonnera au Mont son caractère insulaire et interdira aux prés salés de l'atteindre.

Le remplacement de la digue-route par un pont-passerelle rétablira le caractère insulaire du Mont-Saint-Michel, tout en en gardant l'accès continu et permanent. La maîtrise du régime du Couesnon, dont les eaux se diviseront artificiellement à l'aval du barrage en deux chenaux, garantira la pérennité de cette insularité en maintenant des écoulements de part et d'autre du Mont et en empêchant ainsi la progression des prés salés jusqu'aux remparts. Ce projet est focalisé sur le Mont lui-même et sur ses abords immédiats. Il n'a ainsi pas retenu le rétablissement des anciens cours de la Guintre et du Ruisseau-Landais, un moment envisagé. En effet, si cette opération, dont le coût n'était pas négligeable, aurait restitué un paysage plus naturel dans les prés salés de l'Est, elle n'aurait guère eu d'efficacité pour le maintien de l'insularité du Mont.

Le projet actuel ne s'inscrit pas dans le mouvement général de retour à la mer des étendues estuariennes, retour que l'on constate en Allemagne, aux Pays-Bas, en Grande-Bretagne ou aux États-Unis notamment. Si l'on fait entrer des eaux salées dans le Couesnon, c'est essentiellement pour obtenir un certain volume de chasse, et non pour recréer des milieux humides sau-

mâtres, les collectivités intéressées ne souhaitant pas un tel retour, qui compromettrait les équilibres existants.

Le programme actuel, dont l'achèvement est prévu pour 2006 et dont le coût est estimé à près de 100 millions d'euros, est commandé par la volonté de conserver le caractère insulaire d'un site du patrimoine mondial, caractère que toutes les actions humaines antérieures menaçaient en favorisant le colmatage naturel. Le programme se propose aussi d'éviter la dégradation du site, notamment celle des grèves, que l'extension du stationnement oblitérait gravement.

Un tel patrimoine – à la fois culturel et naturel – attire déjà plus de trois millions de visiteurs chaque année. L'amélioration des moyens d'accès comme l'autoroute des estuaires qui doit passer à Pontaubault, à une douzaine de kilomètres du Mont-Saint-Michel, la construction éventuelle d'une voie ferrée de desserte, le développement contemporain du tourisme lié au patrimoine augmenteront la fréquentation du site, que la publicité qui entourera l'exécution des travaux ne pourra que favoriser.

Ainsi, si le deuxième millénaire s'est achevé sur l'action toujours plus efficace des sociétés en faveur de la terre, le troisième débute par une entreprise destinée à rétablir l'insularité du Mont-Saint-Michel tout en conservant l'accessibilité du site et à maintenir un caractère maritime à des étendues que l'évolution naturelle tendait à annexer à la terre.

Fernand VERGER est professeur émérite de géographie à l'École normale supérieure et président de la Commission scientifique de la Mission Mont-Saint-Michel.

Marie-Thérèse MORZADEC-KERFOURN, *Variations de la ligne de rivage armoricaine au Quaternaire*, Mémoires de la Société géologique et minéralogique de Bretagne, tome XVII, 1974.

Virginie BOUCHARD et al., *Progression des marais salés à l'ouest du Mont-Saint-Michel entre 1984 et 1994*, Mappemonde, n° 4, pp. 28-34, 1995.

Jean-François SEGUIN, *Mont-Saint-Michel. La reconquête d'un site*, Le Cherche-Midi, Paris, 1998.

Mission Mont-Saint-Michel, *Rétablir le caractère maritime du Mont-Saint-Michel : les solutions proposées*, Programme technique détaillé, chap. IV, avril 1999.

Les anticoagulants de synthèse

MAURICE PETITOU • JEAN-MARC HERBERT

Les médicaments anticoagulants sont essentiels pour combattre la maladie thromboembolique veineuse. Se fondant sur l'analyse d'anticoagulants naturels, les chimistes ont synthétisé de nouveaux médicaments.

Le désordre le plus fréquent du système circulatoire est la maladie thromboembolique veineuse : elle se manifeste initialement par une phlébite localisée dans les veines profondes des jambes, puis se complique parfois par une occlusion des vaisseaux sanguins, ou thrombose, qui évolue, dans un à deux pour cent des cas, vers une embolie pulmonaire fatale. En outre, chez un tiers de malades, il en résulte un syndrome post-thrombotique, souvent très handicapant. Un individu sur 1 000 est atteint dans les pays industrialisés, et la maladie grève lourdement les ressources du système de santé.

La cause ? Une coagulabilité excessive du sang. Normalement, celui-ci est maintenu dans un état de fluidité optimale grâce au « système de la coagulation », un ensemble de réactions biochimiques où des enzymes (la thrombine et d'autres « facteurs ») produites à partir de précurseurs inactifs (la prothrombine et divers autres facteurs) s'activent en cascade. Ces réactions aboutissent à la modification d'une protéine du plasma, le fibrinogène, qui est transformé en fibrine, élément essentiel du caillot sanguin. Normalement le système de la coagulation est finement réglé par d'autres protéines, parmi lesquelles l'antithrombine ; la régulation limite à la fois les hémorragies et la coagulation.

La coagulation du sang étant la cause de la thrombose, les médecins ont naturellement utilisé des composés anticoagulants comme antithrombotiques. On inhibe la coagulation du sang de deux façons.

La première consiste à réduire la concentration du sang en facteurs de coagulation, en limitant l'action de la vitamine K, qui assure leur biosynthèse : les médicaments utilisés sont les antivitamines K.

Ces produits sont administrés par voie orale, mais ils agissent très longtemps, de sorte que les médecins évitent difficilement les surdosages qui provoqueraient des hémorragies : tout au long du traitement, c'est-à-dire parfois à vie, les médecins adaptent les doses de chaque patient et suivent minutieusement (par des dosages sanguins réguliers) l'efficacité anticoagulante et le risque hémorragique. De surcroît, l'utilisation des antivitamines K est parfois compliquée par de nombreuses interactions médicamenteuses et alimentaires.

La seconde façon de réduire la coagulation consiste à bloquer les facteurs de la coagulation. Soit un inhibiteur direct se fixe sur le site actif d'une enzyme et inhibe cette dernière, soit un inhibiteur indirect active l'inhibiteur normal de la coagulation : l'antithrombine.

L'hirudine est le seul inhibiteur direct de la thrombine qui soit utilisé aujourd'hui : la molécule est une petite protéine (un enchaînement de 65 acides aminés) qui fut initialement extraite des glandes salivaires de la sangsue et qui est aujourd'hui produite par génie génétique. En raison de sa nature chimique, cette molécule est seulement administrable par injection. Divers laboratoires pharmaceutiques explorent d'autres inhibiteurs directs, inspirés de pep-

tides (des enchaînements d'acides aminés encore plus courts) présents dans l'estomac des moustiques ou des tiques, ou dans la salive des chauves-souris.

Nous nous sommes davantage intéressés aux inhibiteurs indirects, qui, nous l'avons vu, sont ainsi nommés parce qu'ils agissent par l'intermédiaire de l'antithrombine. Présente dans le sang en concentration relativement élevée, l'antithrombine a la propriété remarquable d'être activable par une déformation : elle limite alors la coagulation. Dans l'organisme, ce « changement de conformation » est provoqué par des molécules de la famille des glucides nommées héparane sulfate, présentes à la surface des vaisseaux sanguins (voir la figure 6).

Les inhibiteurs indirects de la classe des héparines activent l'antithrombine à la manière de l'héparane sulfate. Ils ont été introduits vers la fin des années 1930, bien avant que l'on élucide le mécanisme de leur action anticoagulante (ce travail eut lieu seulement au cours des années 1970).

Des molécules perfectibles

Initialement extraites des poumons de bovins et aujourd'hui récupérées à partir d'intestins de porc, les héparines ont un effet immédiat ou à très court terme, ce qui évite les surdosages. En revanche, leur emploi fait courir un risque de thrombopénie (chute du nombre de plaquettes sanguines circulantes), un effet secondaire plus difficilement acceptable que le faible

risque hémorragique lié à leur mécanisme d'action direct.

Bien que très largement utilisée, l'héparine n'est donc pas l'antithrombotique parfait. Examinons sa structure pour comprendre l'origine de ses défauts. La molécule est ce que l'on nomme communément un glucide ou un sucre.

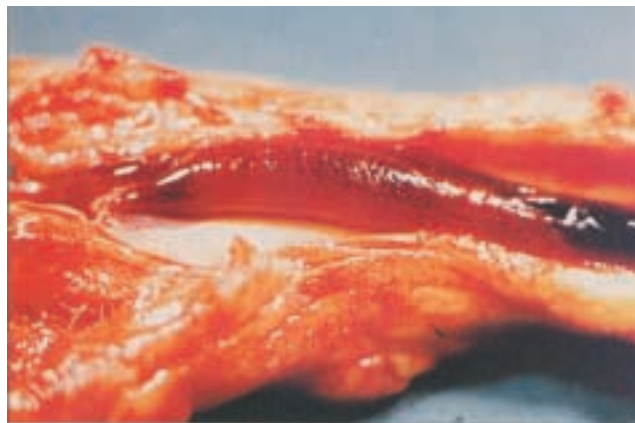
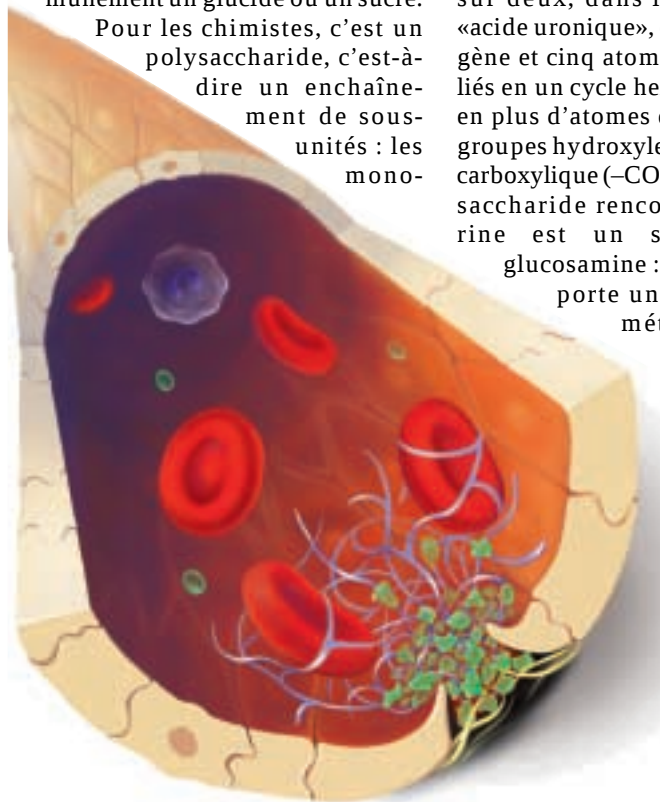
Pour les chimistes, c'est un polysaccharide, c'est-à-dire un enchaînement de sous-unités : les mono-

saccharides. Ces derniers sont des molécules dont le squelette comprend trois à neuf atomes de carbone qui sont liés à des groupes hydroxyle ($-OH$), et aussi, très souvent, à des groupes chimiques variés (voir la figure 6).

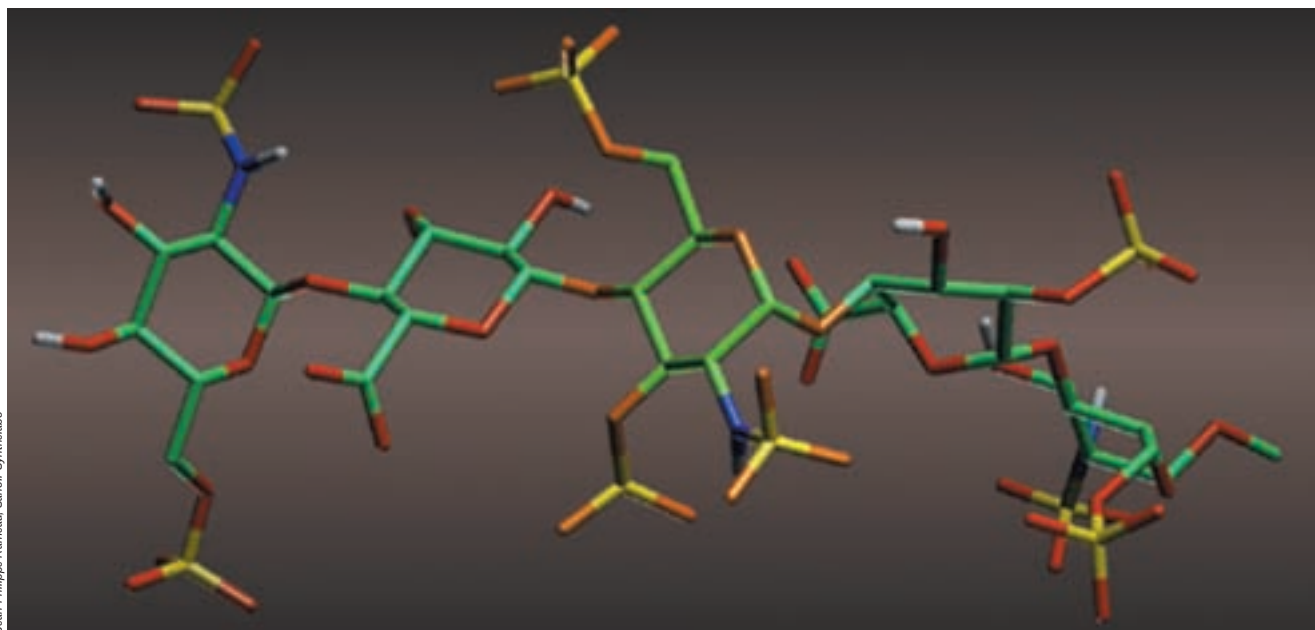
Par exemple, un monosaccharide sur deux, dans l'héparine, est un «acide uronique», où un atome d'oxygène et cinq atomes de carbone sont liés en un cycle hexagonal, qui porte, en plus d'atomes d'hydrogène, deux groupes hydroxyle et un groupe acide carboxylique ($-COOH$). L'autre monosaccharide rencontré dans l'héparine est un sucre aminé, la glucosamine : le cycle hexagonal porte un groupe hydroxyméthyl ($-CH_2OH$) et un groupe amine

($-NH_2$). En raison des divers groupes portés par les monosaccharides, tels les groupes sulfonate ($-SO_3^-$), l'héparine est fortement chargée négativement et, de ce fait, interagit par des forces électrostatiques avec de nombreuses protéines qui ont, dans l'organisme, une charge électrique positive.

Comme la thrombine était une des protéines auxquelles se liait l'héparine, on a longtemps cru que l'activité anticoagulante de cette dernière était due à ses charges électriques. Au point, même, que des chimistes ont cherché de nouvelles molécules d'action analogue à celle de l'héparine en ajoutant des groupes sulfonate à divers polymères naturels ou synthétiques. Non seulement ils ont échoué, mais on



Sano/Synthelabo



Jean-Philippe Rameau, Sano/Synthelabo

1. UN THROMBUS se forme quand la paroi vasculaire est lésée (en haut à gauche). Des cellules nommées plaquettes se fixent alors à la lésion, formant la base d'un caillot qui est consolidé par une protéine, la fibrine. La figure en haut à droite montre un thrombus qui s'est formé dans la veine poplitée humaine (derrière le genou), à la suite d'une phlébite grave. Pour éviter celle-ci et ses complications, on administre des médicaments anticoagulants, qui réduisent la coagulabilité du sang. En bas,

on a ainsi représenté une molécule de synthèse qui active l'antithrombine, une protéine qui inhibe la coagulation du sang. Cette molécule, synthétisée récemment, est un pentasaccharide, c'est-à-dire un glucide composé de cinq sous-unités (la sous-unité centrale est d'une couleur plus vive). Elle a été mise au point à partir d'analyses de l'héparine, médicament couramment administré comme anticoagulant et que l'on extrait aujourd'hui de l'intestin du porc.

sait aujourd'hui que trop de charges électriques réduisent l'activité anticoagulante ; de surcroît, les charges négatives sont responsables des effets secondaires dus aux traitements par l'héparine (particulièrement des thrombopénies) et elles limitent la durée d'action du médicament en favorisant son élimination.

Les travaux que nous rapportons ici, commencés dès la fin des années 1970 par Jean Choay, voulaient pallier ces divers inconvénients : on cherchait à synthétiser de nouveaux activateurs de l'antithrombine, afin d'obtenir des effets coagulants analogues à ceux de l'héparine, sans avoir les effets indésirables de celle-ci. Nous verrons que l'objectif a été atteint et que les molécules obtenues ont éclairé le mécanisme d'action de l'héparine.

Réduire les doses en conservant l'effet

Les premiers essais cliniques de l'héparine contre les thromboses furent effectués indépendamment par des équipes suédoises et canadiennes, au cours des années 1936 et 1937 : les médecins avaient conclu que l'héparine était efficace, mais qu'elle avait des effets secondaires indésirables, telles des fièvres, qui agitaient les malades au point que l'on entendait parfois grincer les sommiers métalliques jusque dans les couloirs des hôpitaux.

On comprend aujourd'hui que la présence de plusieurs charges électriques négatives sur l'héparine favorise sa liaison à de nombreuses molécules biologiques, ce qui compliquait sa purification : la préparation vendue sous le nom d'héparine était un mélange de plusieurs polysaccharides analogues, associés à des molécules biologiques variées.

Puis, vers la fin des années 1960, les médecins observèrent que l'effet antithrombotique n'était pas amoindri quand on diminuait les doses d'héparine administrées ; en revanche, le risque hémorragique était alors considérablement réduit. Aussi, dans les années 1970, les laboratoires pharmaceutiques commercialisèrent de l'«héparine à faible dose».

Une explication de cet effet fut proposée en 1974 : la coagulation, résultant d'une suite de réactions enzymatiques enchaînées, s'amplifie à chaque étape ; de ce fait, on l'inhibe

plus efficacement en agissant sur les étapes en amont, quand l'amplification est encore limitée. Les pharmacologues ont ainsi calculé que un microgramme d'héparine inhibant le facteur Xa, qui active la thrombine, produit le même effet anticoagulant que plus de 1 000 microgrammes d'héparine inhibant la thrombine, qui intervient plus en aval.

Cette découverte a incité les biochimistes à chercher, parmi les diverses familles de molécules qui constituent une préparation d'héparine, celles qui inhibaient le mieux le facteur Xa. En 1976, a ainsi été mise en évidence l'influence de la masse moléculaire sur les propriétés anticoagulantes de l'héparine : au cours d'une expérience, un groupe de chercheurs suédois et britanniques a découvert que l'activité anti-facteur Xa était indépendante de la masse moléculaire, tandis que l'activité antithrombine nécessitait un polysaccharide de masse moléculaire égale à 6 000, composée d'environ 20 monosaccharides enchaînés.

L'observation conduisit à la mise au point de la classe des héparines de faible masse moléculaire : puisque de courts oligosaccharides inhibaient le facteur Xa, clé de l'effet antithrombotique, on avait intérêt à éviter les oligosaccharides plus longs, dont les nombreuses charges électriques provoquaient des effets indésirables.

Les héparines de faible masse moléculaire se révélèrent mieux tolérées que l'héparine initiale. En outre, moins rapidement captées par la surface des vaisseaux sanguins, ces molécules résidaient plus longtemps dans le sang, de sorte que l'on pouvait réduire la fréquence des injections. Après avoir été obtenues par fractionnement, les héparines de faible masse moléculaire sont aujourd'hui préparées par fragmentation de l'héparine standard. Introduites en clinique en 1982, elles représentent plus de la moitié des héparines utilisées.

Toutefois de nombreuses questions restaient ouvertes. Jusqu'où pouvait-on réduire la taille des fragments, tout en conservant l'effet anti-facteur Xa? Suffisait-il d'inhiber le facteur Xa pour obtenir une activité antithrombotique notable? Certains des plus éminents pharmacologues en doutaient, parce que l'on avait observé que les héparines de faible masse moléculaire inhibent également la thrombine, bien qu'à

un degré moindre que l'héparine standard. Un inhibiteur exclusif du facteur Xa serait-il mieux toléré que les héparines de faible masse moléculaire?

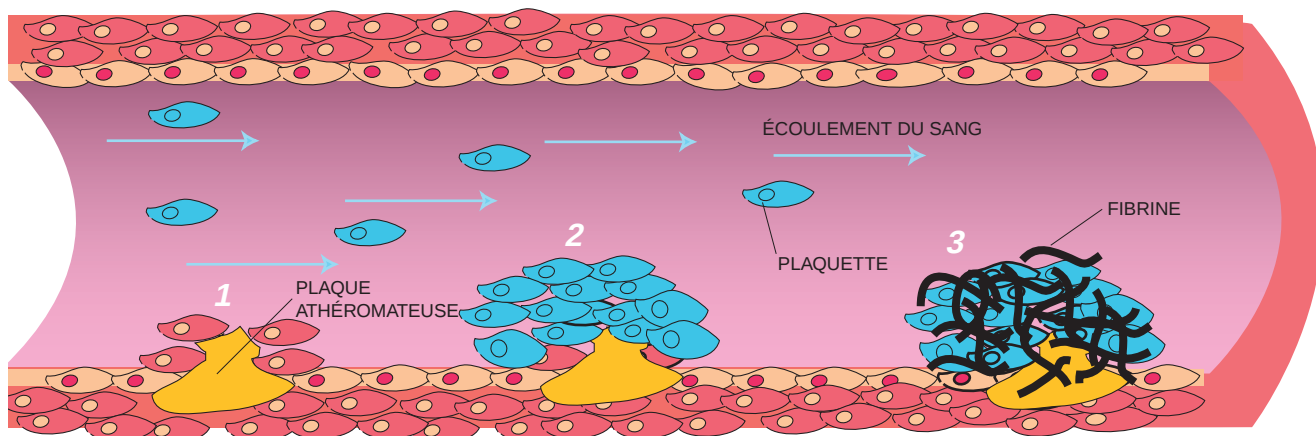
En 1976, Robert Rosenberg et ses collègues de Boston, d'une part, et l'équipe d'Ulf Lindahl, à Uppsala, d'autre part, publièrent indépendamment les résultats d'expériences qui allaient être cruciales pour le perfectionnement de l'héparine : un tiers seulement des molécules composant les préparations d'héparine se fixent à l'antithrombine, et seules ces chaînes réduisent la coagulation.

Les causes d'une liaison

Une analyse comparée de la structure des molécules actives et inactives ne montra pas la différence associée à ces comportements opposés : elle devait être minime. Néanmoins la question qui nous préoccupait, avec J. Choay et Jean-Claude Lormeau, celle du plus court des fragments inhibant le facteur Xa, devint : quelle est la structure du plus court fragment d'héparine ayant de l'affinité pour l'antithrombine et ayant un effet anti-facteur Xa? La méthode de résolution apparut avec la question : nous devons fragmenter l'héparine, sélectionner les fragments qui se liaient à l'antithrombine, purifier les oligosaccharides ainsi liés et, enfin, tester l'effet anti-facteur Xa des diverses fractions.

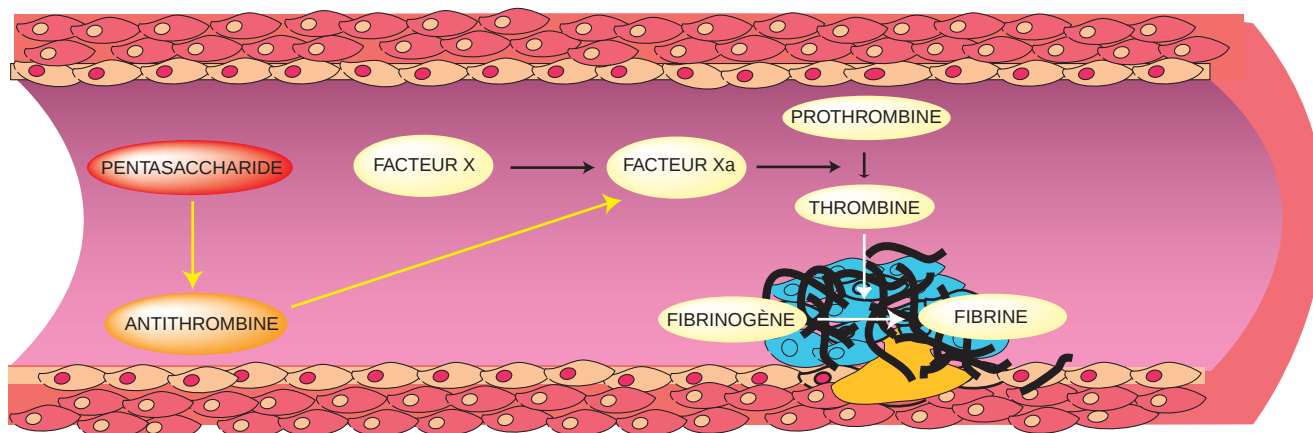
En 1981, en collaboration avec Bénito Casu et ses collègues de Milan, nous avons ainsi déterminé la structure d'un pentasaccharide (une séquence formée par l'enchaînement de cinq monosaccharides, que nous avons nommée DEFGH), qui assure la fixation de l'héparine à l'antithrombine et active cette dernière. Cette séquence (voir la figure 1) comporte notamment une sous-unité sulfonatée (F), qui est cruciale pour cette fixation à l'antithrombine (elle avait été observée juste avant nous par U. Lindahl). Nous avons récemment montré que ce sont les trois sous-unités DEF qui sont déterminantes pour la liaison à l'antithrombine.

Ayant identifié un oligosaccharide qui active l'antithrombine, laquelle inhibe le facteur Xa, nous avons en main la structure de la molécule que nous voulions synthétiser. Une telle synthèse était à la fois un problème classique de synthèse des sucres (voir



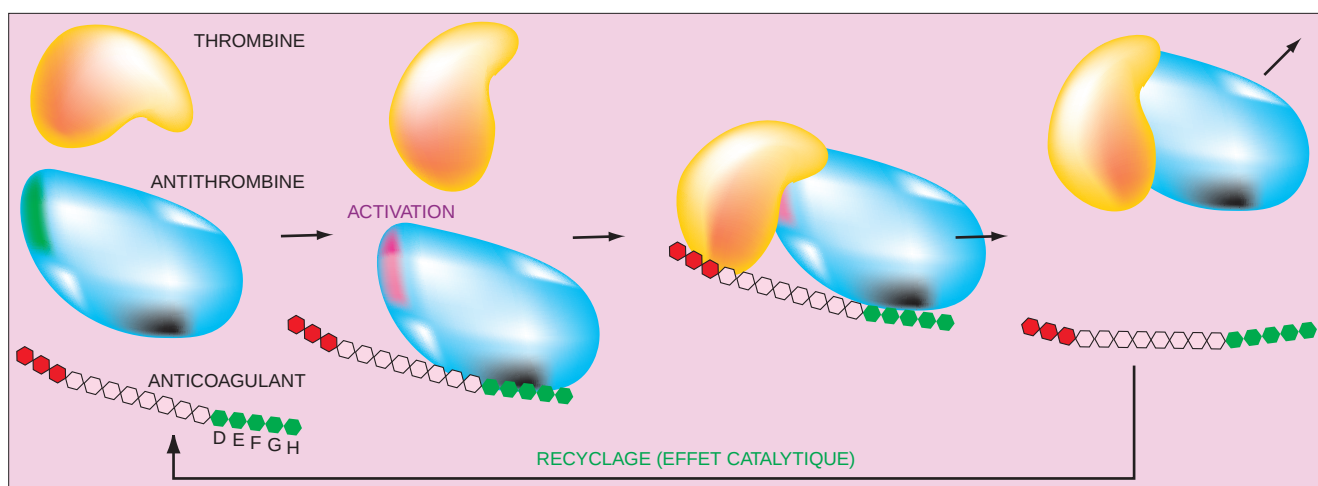
2. FORMATION PROGRESSIVE d'un thrombus artériel. La croissance d'un athérome, par dépôt de graisses, finit par exposer le sous-endothélium (1), ce qui fait adhérer les cellules nommées plaquettes

(2). Une protéine du système de coagulation, la fibrine, polymérise alors et consolide le thrombus (3). Ce dernier gêne la circulation du sang, ce qui provoque des angines de poitrine ou des infarctus.



3. LA COAGULATION DU SANG résulte d'un réseau de réactions chimiques qui conduisent à l'activation du facteur X en facteur Xa. Ce dernier catalyse la formation de la thrombine qui, elle-même, transforme le fibrinogène (soluble) en fibrine (insoluble). La fibrine stabilise les thrombus quand elle polymérise. D'autres facteurs, activés

par les premières traces de thrombine formées, accélèrent la coagulation. L'organisme règle la coagulation par l'antithrombine ; le facteur Xa, inactivé par cette dernière, est la cible des nouveaux médicaments anticoagulants de synthèse, tel le pentasaccharide représenté sur la figure 1.



4. LES OLIGOSACCHARIDES ANTICOAGULANTS utilisent l'antithrombine comme relais pour atteindre leurs cibles : les enzymes de la coagulation que sont la thrombine ou le facteur Xa. L'action des anticoagulants commence avec leur liaison à l'antithrombine par un groupe de cinq sous-unités (DEFGH). Cette liaison démasque un site de l'antithrombine, auquel vient alors se lier à l'enzyme

cible. Dans le cas de la thrombine, représenté ici, l'enzyme est également liée à l'anticoagulant par les trois sous-unités terminales ; dans le cas du facteur Xa (*non représenté*), la liaison à ces trois sous-unités n'est pas nécessaire. Lorsque l'enzyme est fixée sur l'antithrombine (donc inhibée), l'anticoagulant se détache et peut alors activer d'autres molécules d'antithrombine.

la figure 5) et un problème nouveau, car l'oligosaccharide visé était le plus complexe de ceux qui avaient été obtenus : sa structure comprenait des monosaccharides originaux et une dizaine de groupes sulfonate portés par des atomes d'azote ou d'oxygène, qui assurent l'activité de la molécule.

Synthèse chimique et activité biologique

Si les chimistes avaient jusqu'alors négligé de telles synthèses, c'est en grande partie parce qu'aucune cible bien définie ne leur avait été proposée. En 1983, après plusieurs années de recherches, en collaboration avec Pierre Sinaÿ et Jean-Claude Jacquinet, de l'Université d'Orléans, nous avons obtenu, à partir de glucose et de glucosamine (une molécule de glucose dont un groupe hydroxyle est remplacé par un groupe amine), quelques milligrammes de l'oligosaccharide cherché.

C'était assez pour vérifier nos hypothèses sur le site de liaison de l'héparine à l'antithrombine : nous avons observé que la structure réalisée a une forte affinité pour l'antithrombine, ainsi qu'une importante activité anti-facteur Xa. L'activité antithrombotique de cette molécule fut ensuite évaluée chez l'animal : comme nous l'espérions, la molécule était un puissant agent anti-thrombotique. En revanche, sa synthèse était d'une longueur réhabilitaire pour que nous envisagions un jour d'en faire un médicament : elle nécessitait alors 80 opérations successives !

Grâce à des variants sélectivement modifiés (souvent plus simples à synthétiser), nous avons établi le rôle des divers éléments de la molécule dans la liaison à l'antithrombine. La fonction et l'importance de certains groupes sulfonate ont ainsi été clairement démontrées, notamment le rôle clé de celui qui est en position 3 dans la sous-unité glucosamine centrale. Très récemment, à Cambridge, Robin Carrell a effectué l'analyse aux rayons X de cristaux formés par les complexes de l'antithrombine et d'un pentasaccharide de synthèse ; il a confirmé les résultats obtenus au cours de nos études de la relation entre la structure chimique et l'activité.

Quand nous avons étudié l'interaction de pentasaccharides synthétiques avec l'antithrombine, nous

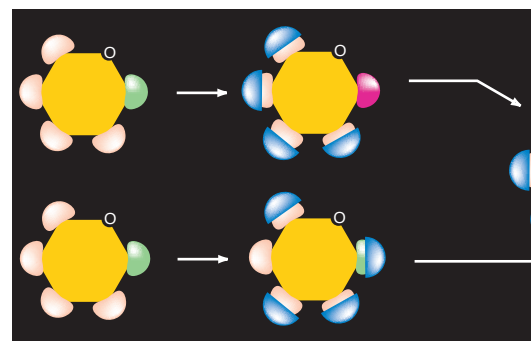
avons constaté que seuls les groupes sulfonate et les groupes carboxylate ($-\text{COO}^-$) assuraient directement la liaison à la protéine, alors que nous nous donnions beaucoup de mal, au cours de la synthèse, pour protéger temporairement les groupes hydroxyle ($-\text{OH}$) des monosaccharides initiaux, afin qu'ils soient présents sur la molécule finale. Nous avons alors vérifié que le blocage de ces groupes, en début de synthèse, n'entravait pas la reconnaissance avec l'antithrombine. L'accès aux oligosaccharides anticoagulants en fut simplifié.

Nous avons également découvert que les atomes d'azote qui portent des groupes sulfonate peuvent être remplacés par des atomes d'oxygène, ce qui simplifie encore la préparation. Ainsi, au cours d'études menées à partir de 1987 avec Constant van Boeckel et Dick Meuleman, de la Société *Organon*, nous avons obtenu plusieurs séries de pentasaccharides antithrombotiques, inhibiteurs du facteur Xa, ayant des durées de vie variées. Plusieurs sont en cours d'essais cliniques.

Une nouvelle classe d'anticoagulants

Contrairement aux inhibiteurs directs des enzymes de la coagulation, qui ont une activité difficilement contrôlable, ces pentasaccharides ont une activité qui est automatiquement réglée par la quantité d'antithrombine circulante. On évite ainsi les surdosages : l'organisme élimine le pentasaccharide en excès.

De surcroît, l'affinité de nos molécules pour l'antithrombine est telle que la quasi-totalité des molécules administrées sont liées à cette seule protéine, qui est leur cible (les autres anticoagulants se fixent à diverses protéines, ce qui provoque des actions parfois indésirables et non maîtrisées). Notamment, grâce à leur petite taille et à leurs charges électriques bien adaptées, les pentasaccharides n'ont pas les effets secondaires gênants de l'héparine et de ses dérivés, parce qu'ils n'interagissent pas avec le facteur 4 plaquettaire (PF4), une protéine responsable, quand elle est complexée avec l'héparine, du déclenchement d'une réaction allergique à l'origine d'effets secondaires graves du traitement par l'héparine : les thrombocytopénies.

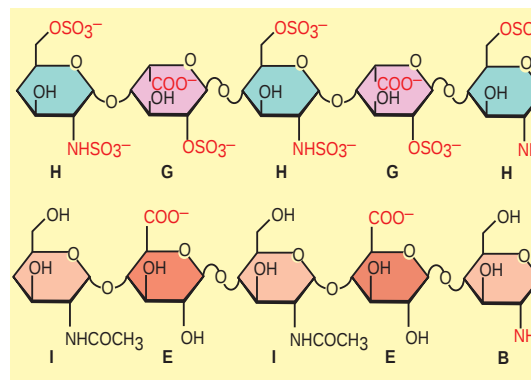


5. LA SYNTHÈSE CHIMIQUE des oligosaccharides utilisés comme antithrombotiques nécessite une série de «protections» et de «dégagements» des groupes chimiques portés par les monosaccharides de base. Ici on a représenté la synthèse d'un tétrasaccharide, c'est-à-dire d'une chaîne de quatre «sucres»

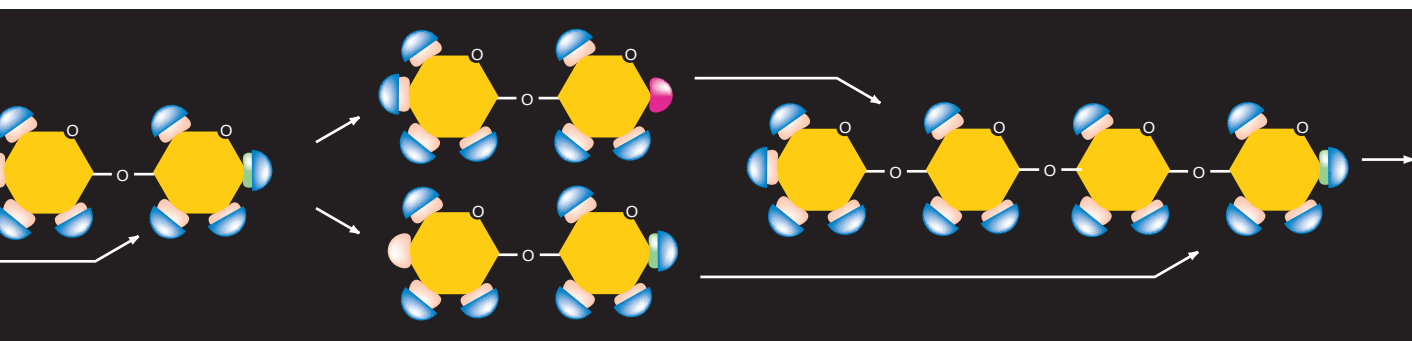
Les inhibiteurs mixtes

Bien que les inhibiteurs du facteur Xa se soient révélés d'excellents agents antithrombotiques, des études sur des rats (chez lesquels on provoque une thrombose en ligaturant la veine jugulaire) avaient indiqué qu'on obtiendrait des composés encore plus puissants si l'on inhibait simultanément la thrombine et le facteur Xa. En reprenant nos méthodes de synthèse des sucres, nous avons alors cherché de tels composés : ils devaient se lier sélectivement à l'antithrombine, et inhiber aussi la thrombine et le facteur Xa, sans les effets indésirables que provoquent les charges négatives sur la molécule d'héparine.

Dans l'organisme, le facteur Xa et la thrombine sont inhibés par l'antithrombine selon deux mécanismes différents. D'une part, l'inhibition du facteur Xa résulte d'un changement de conformation de l'antithrombine, quand le pentasaccharide que nous



6. L'HÉPARINE (en haut), une molécule anticoagulante extraite de l'intestin de porc, et l'héparane sulfate (en bas), de structure apparentée, sont formées par l'enchaînement



élémentaires. Partant d'une première molécule de base (en haut à gauche), on commence par protéger tous les groupes portés par la molécule en les recouvrant par d'autres groupes qui ne réagiront pas ultérieurement et que l'on enlèvera ensuite selon les besoins. Un groupe hydroxyle (représenté par une forme verte) est transformé en un groupe activable (forme pourpre). Sur une seconde molécule de base (en bas à gauche), on recouvre tous les groupes à l'exception du seul groupe

hydroxyle que l'on veut relier à la première molécule. On fait alors réagir les deux molécules ainsi préparées. Sur la molécule obtenue (un disaccharide), on peut introduire un nouveau groupe activable ou démasquer un groupe hydroxyle, ce qui permet de poursuivre les réactions de liaison. On s'arrête ici au stade tétrasaccharide. En raison de la diversité des groupes portés par les sous-unités utilisées, la synthèse des oligosaccharides n'est pas encore automatisée.

avons identifié se lie à elle. D'autre part, l'inhibition de la thrombine nécessite la formation d'un complexe à trois partenaires, entre l'anticoagulant, l'antithrombine et la thrombine ; le glucide sert de support à l'assemblage.

La liaison de la thrombine résulte de l'attraction électrostatique par les charges négatives de l'anticoagulant ; cette attraction est d'autant plus puissante que les charges négatives sur le glucide sont plus nombreuses et, de ce fait, que la molécule est plus longue. Toutefois, nous l'avons vu, les effets secondaires, tel l'effet thrombopénique, augmentent eux aussi avec la charge électrique et la taille des molécules. D'où la question : peut-on synthétiser un polysaccharide qui se fixerait à l'antithrombine, qu'il activerait, et qui se fixerait plutôt à la thrombine qu'au PF4, alors que ces deux molécules interagissent avec selon le même principe d'attraction électrostatique?

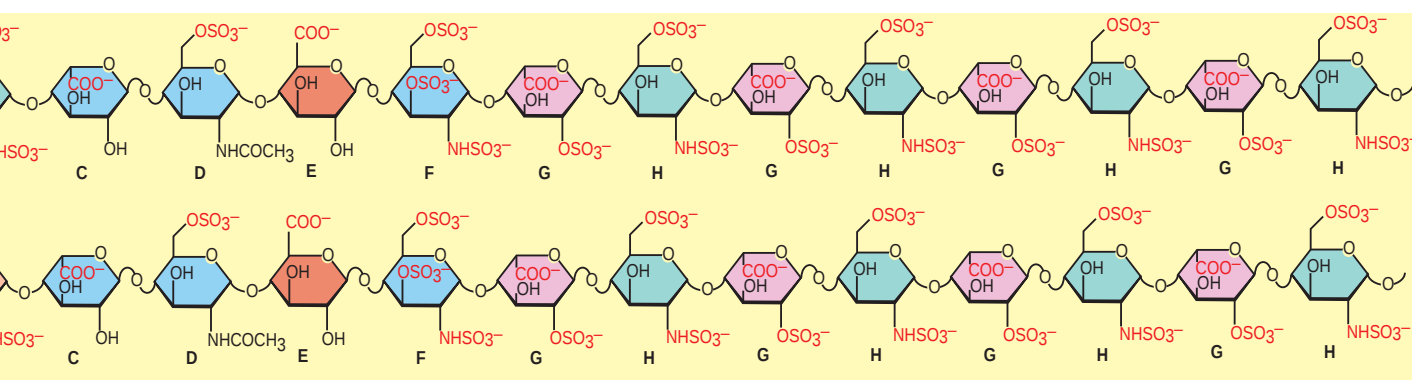
Pour commencer le travail, nous avons pensé qu'un oligosaccharide qui porte le site de liaison à l'antithrombine, puisqu'il est sulfonaté, possède les éléments nécessaires pour attirer la thrombine par des forces électrostatiques. Ainsi une juxtaposition de tels sites devait non seulement catalyser l'inhibition du facteur Xa, mais aussi inhiber la thrombine : il suffisait, pensions-nous, que l'oligosaccharide soit assez long pour fixer simultanément les deux protéines

Afin de simplifier le problème chimique, nous avons d'abord utilisé comme domaine de liaison à l'antithrombine un hexasaccharide construit par assemblage de trois exemplaires d'un seul disaccharide : nous avons obtenu une première série de molécules qui avaient l'inconvénient d'interagir de façon non spécifique avec des protéines chargées négativement, notamment le PF4. Cette propriété étant rédhibitoire, nous avons cherché d'autres molé-

cules qui n'auraient pas cet inconvénient. Toutefois il est alors apparu que les molécules visées devraient être composées par l'enchaînement d'au moins 15 à 16 monosaccharides pour inhiber la thrombine.

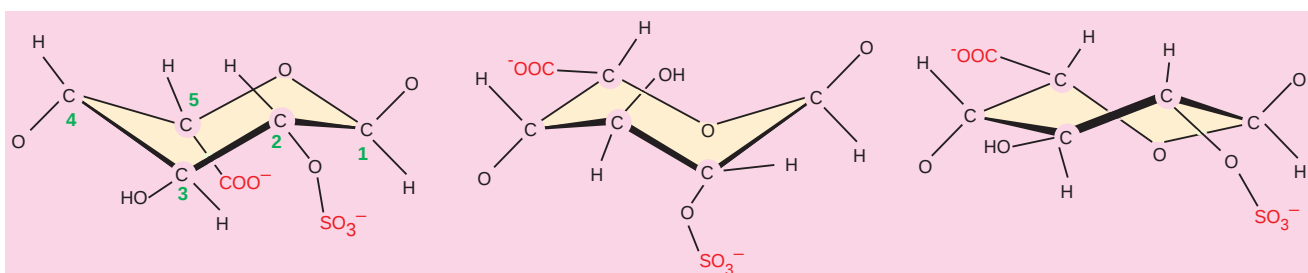
Les molécules que nous avons ensuite construites ont un site pentasaccharidique qui se lie à l'antithrombine (le pentasaccharide DEFGH), prolongé à une extrémité par une série de sous-unités glucose sulfonaté : on reproduit ainsi la répartition de charges électriques qui, dans l'héparine, assure la liaison à la thrombine. Des oligosaccharides à 15, 17 et 19 sous-unités inhibaient le facteur Xa et la thrombine en présence d'antithrombine... mais ils interagissaient encore avec le PF4.

Réduirait-on cette interaction en raccourcissant la molécule, afin de réduire le nombre de ses charges négatives? Ce ne fut pas suffisant. Aussi, nous avons décidé de supprimer les charges électriques de la partie qui



de sous-unités répétées. Les deux molécules comportent des séquences particulières de sous-unités, qui jouent un rôle dans divers phénomènes biologiques. Ainsi le trisaccharide DEF est l'élément clé du site DEFGH de liaison à l'antithrombine. Il est présent dans l'hé-

parine et dans les molécules d'héparane sulfate de la membrane des cellules qui tapissent nos vaisseaux sanguins. Les chimistes cherchent, dans ces molécules, d'autres séquences qui expliqueraient de nombreux effets biologiques récemment découverts.



7. LES MONOSACCHARIDES, c'est-à-dire les sous-unités des glucides, sont des groupes cycliques d'atomes dont la configuration spatiale (la conformation) détermine les propriétés. Ici on voit qu'un cycle à six atomes (cinq atomes de carbone et un atome d'oxygène) peut prendre deux conformations « chaise » (à gauche et au centre) et une conformation bateau déformée (à droite). Les auteurs et leurs collègues ont

analysé la sous-unité G du pentasaccharide DEFGH et découvert qu'elle oscille entre ces trois conformations. Seule la conformation bateau déformée permet la liaison du pentasaccharide DEFGH à l'antithrombine. On voit sur la figure 1 comment le pentasaccharide se présente dans l'espace ; les groupes sulfonate (en jaune et en rouge) sont alors dans des positions qui permettent la liaison à l'antithrombine.

n'intervient ni dans la liaison avec l'antithrombine, ni dans la liaison avec la thrombine. Cette fois, nous avons obtenu des oligosaccharides à deux domaines chargés, séparés par un domaine neutre. Cette modification ne réduit pas l'activité anticoagulante (mesurée *in vitro*), mais elle évite la liaison au PF4. En outre, les expériences avec des rats ont montré une puissante activité contre les thromboses veineuses et artérielles.

Une nouvelle génération d'antithrombotiques

La synthèse chimique procure ainsi des molécules dont on règle à volonté les caractéristiques biologiques : en variant le détail de la structure, on obtient des antithrombotiques ayant des durées de vie appropriées aux applications visées ; on choisit une sélectivité pour le facteur Xa ou une combinaison maîtrisée avec une action sur la thrombine ; on évite les interactions néfastes avec d'autres protéines ; et l'on obtient enfin des produits mieux contrôlés et plus sûrs que ceux qui sont extraits d'organes animaux.

Nous avons vu que l'interaction de l'héparine et de l'antithrombine fait intervenir un pentasaccharide particulier : il ne suffit pas que la molécule porte huit groupes sulfonate et deux groupes carboxylate sur une longueur de 2,5 nanomètres environ ; encore faut-il que ces groupes soient disposés correctement, pour épouser le site récepteur de la protéine. C'est la nature des monosaccharides présents, ainsi que la conformation qu'ils adoptent, qui conduit à cette interaction. L'acide iduronique (G) joue un rôle important, qui semble expliquer les remarquables propriétés biologiques de l'héparine,

de l'héparane sulfate et du dermatane sulfate, trois membres de la famille des glycosaminoglycanes, glucides dont les biochimistes entrevoient seulement la fonction dans les processus biologiques.

La première synthèse d'un composé comportant de l'acide iduronique est à l'origine de la découverte des particularités de ce monosaccharide. La molécule a été analysée par résonance magnétique nucléaire (dans cette méthode d'analyse, on utilise des ondes radio et des champs magnétiques pour déterminer l'environnement des divers atomes des molécules ; connaissant la nature de ces environnements, on retrouve la structure des molécules) : on a ainsi découvert que l'acide iduronique de l'héparine prenait une forme inédite (de bateau déformé), qui assure la liaison à l'antithrombine.

En outre, l'interaction spécifique d'une protéine et d'un polysaccharide de la famille des glycosaminoglycanes (l'héparine) est aujourd'hui

clairement établie. Des biologistes, intrigués par cette interaction d'une protéine de l'organisme et d'une molécule extérieure à l'organisme, ont pensé que l'organisme devait contenir des pentasaccharides qui seraient les ligands naturels de la protéine... et ils en ont trouvé à la surface des cellules qui tapissent la face interne des vaisseaux sanguins.

Ainsi les études de synthèse chimique ont bouleversé à la fois le traitement de la thrombose et la compréhension des mécanismes de la coagulation. On ne soupçonnait pas, notamment, que des polysaccharides, auxquels on attribuait un rôle mécanique de soutien, puissent servir de régulateurs physiologiques.

Nul doute que « dame Nature » n'a pas conservé, tout au long de l'évolution des espèces, des molécules si complexes pour ne leur conférer qu'un rôle de second plan dans la biologie de la coagulation ou dans d'autres événements importants de la vie cellulaire.

Maurice PETITOU travaille dans le département de recherche « Cardiovasculaire / Thrombose » du Groupe *Sanofi-Synthélabo*, où il est responsable des projets sur les oligosaccharides antithrombotiques ; il est aussi directeur de recherche associé au CNRS (département de chimie de l'École Normale Supérieure, à Paris). Jean-Marc HERBERT est directeur du département de recherche « Cardiovasculaire / Thrombose » du Groupe *Sanofi-Synthélabo*.

Heparin, sous la direction de D.A. Lane et U. Lindahl, Éditions E. Arnold, Londres, 1989.

C. A. A. van BOECKEL et M. PETITOU, *The unique antithrombin binding domain*

of heparin : a lead to new synthetic antithrombotics, in *Angewandte Chemie* (édition internationale en anglais), vol. 32, pp. 1671-1690, 1993.

J.-M. HERBERT, M. PETITOU, J.-C. LORMEAU, R. CARIU, J. NECCIARI, H. N. MAGNANI, P. ZANDBERG, R. G. M. van AMSTERDAM, C. van BOECKEL et D.G. MEULEMAN, SR 90107A/Org 31540, *a Novel Anti-factor Xa Antithrombotic Agent*, in *Cardiovasc. Drug Rev.*, vol. 76, pp. 590-600, 1996.

M. PETITOU, J.-P. HÉRAULT, A. BERNAT, P.-A. DRIGUEZ, P. DUCHAUSSOY, J.-C. LORMEAU et J.-M. HERBERT, *Synthesis of thrombin inhibiting mimetics without side effects*, in *Nature*, vol. 398, pp. 417-422, 1999.

