

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.

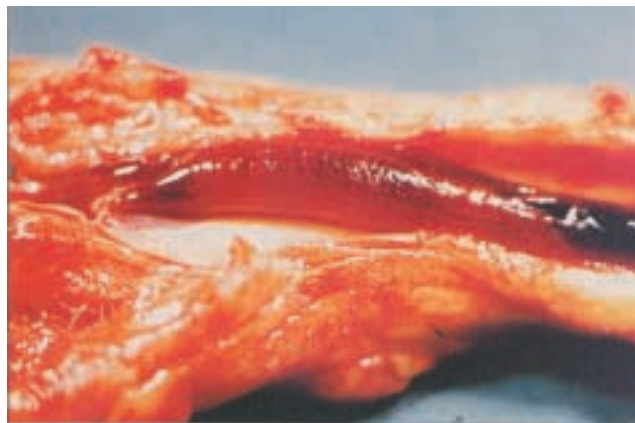
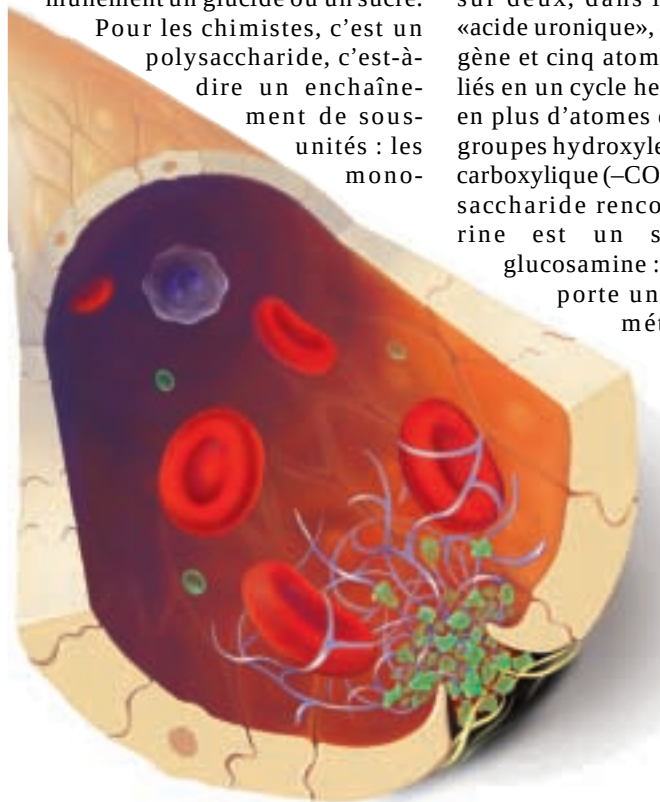
Pour les chimistes, c'est un polysaccharide, c'est-à-dire un enchaînement de sous-unités : les mono-

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).

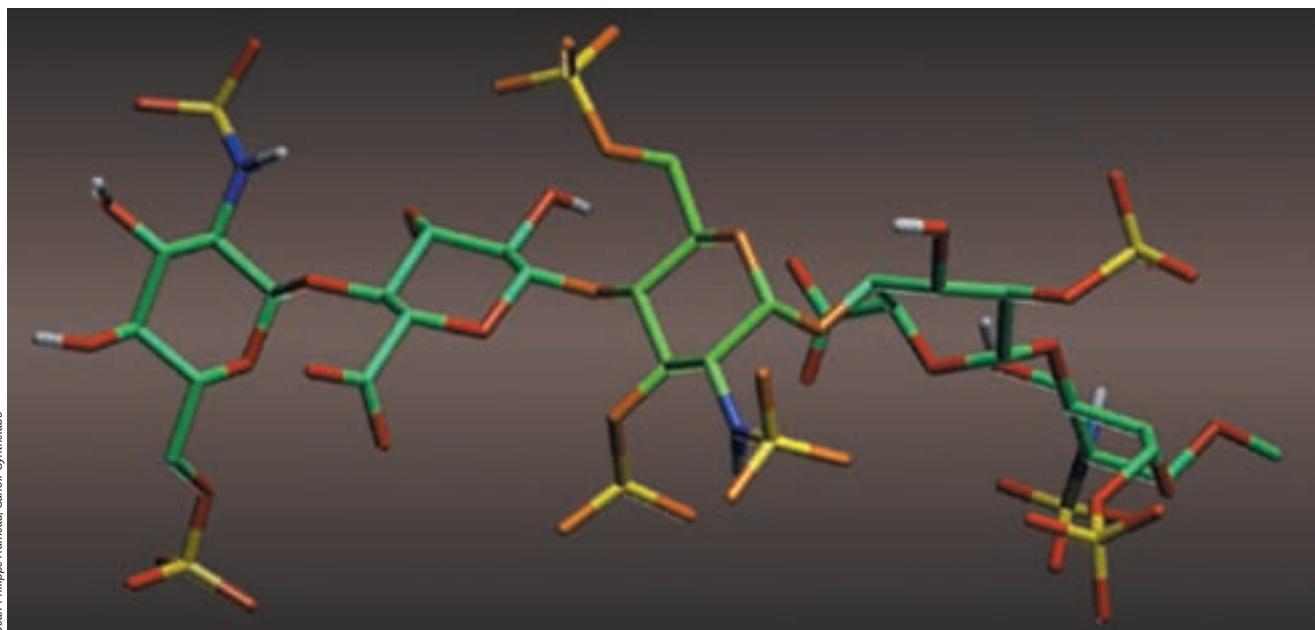
Par exemple, un monosaccharide sur deux, dans l'héparine, est un «acide uronique», où un atome d'oxygène et cinq atomes de carbone sont liés en un cycle hexagonal, qui porte, en plus d'atomes d'hydrogène, deux groupes hydroxyle et un groupe acide carboxylique ($-COOH$). L'autre monosaccharide rencontré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