

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?

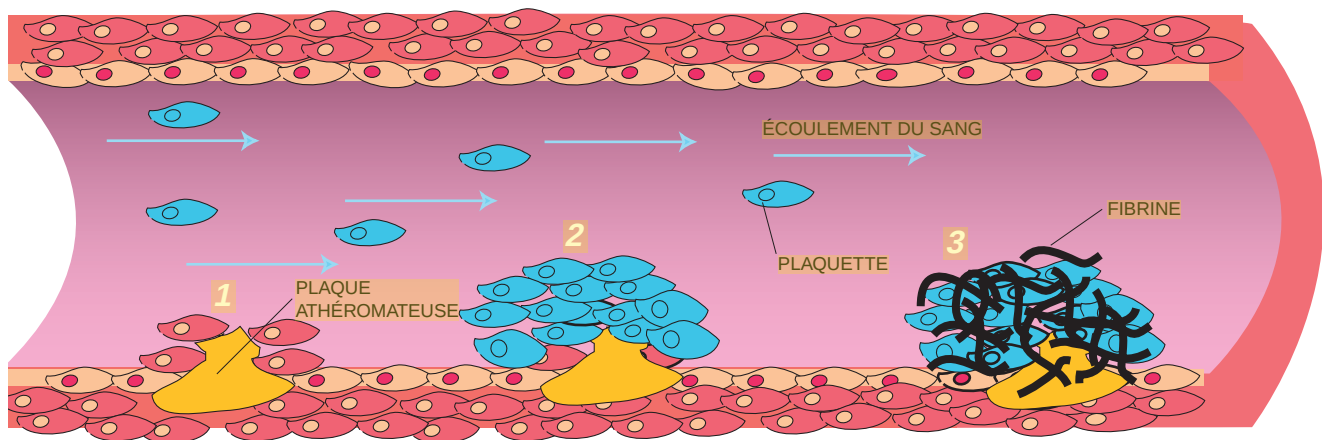
En 1976, Robert Rosenberg et ses collègues de Boston, d'une part, et l'équipe d'Ulf Lindahl, à Uppsala, d'autre part, publièrent indépendamment les résultats d'expériences qui allaient être cruciales pour le perfectionnement de l'héparine : un tiers seulement des molécules composant les préparations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

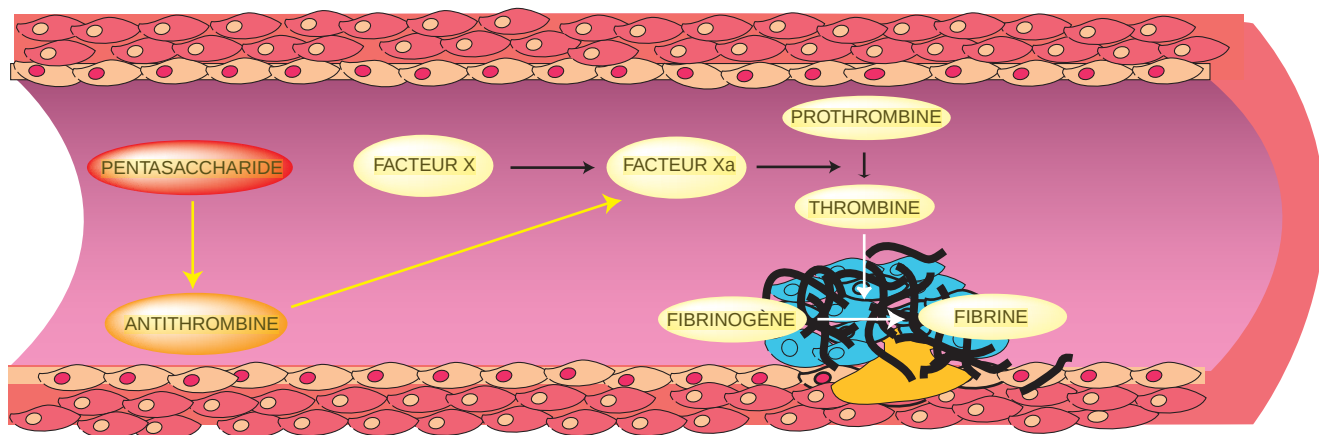
En 1981, en collaboration avec Bénito Casu et ses collègues de Milan, nous avons ainsi déterminé la structure d'un pentasaccharide (une séquence formée par l'enchaînement de cinq monosaccharides, que nous avons nommée DEFGH), qui assure la fixation de l'héparine à l'antithrombine et active cette dernière. 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



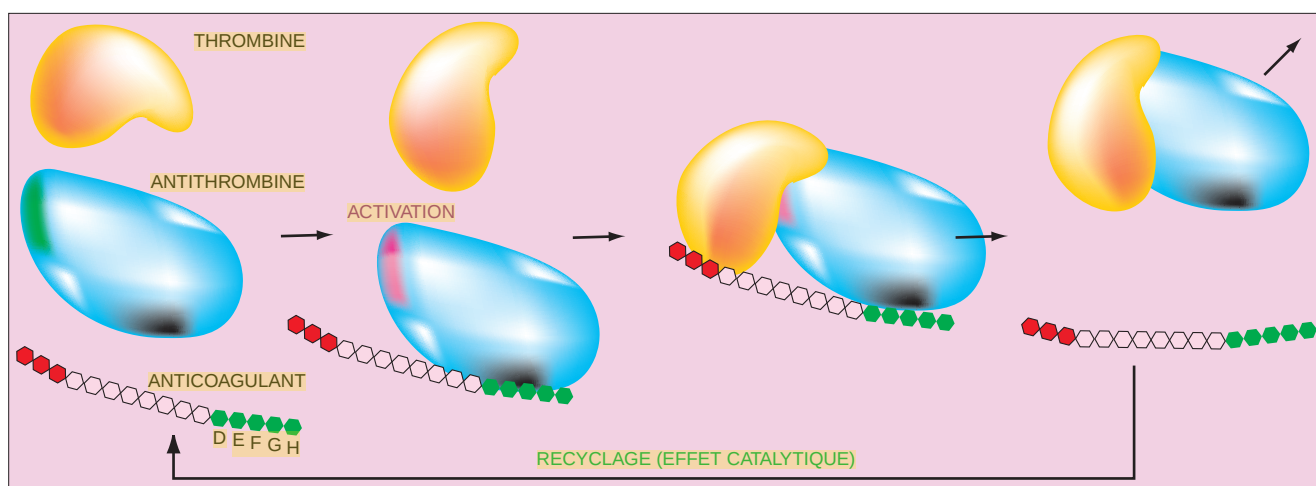
2. FORMATION PROGRESSIVE d'un thrombus artériel. La croissance d'un athérome, par dépôt de graisses, finit par exposer le sous-endothélium (1), ce qui fait adhérer les cellules nommées plaquettes

(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

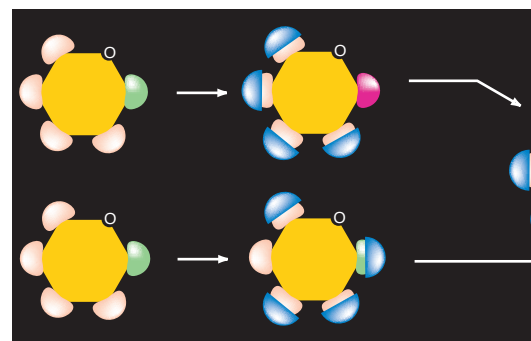
avons constaté que seuls les groupes sulfonate et les groupes carboxylate ($-\text{COO}^-$) assuraient directement la liaison à la protéine, alors que nous nous donnions beaucoup de mal, au cours de la synthèse, pour protéger temporairement les groupes hydroxyle ($-\text{OH}$) des monosaccharides initiaux, 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.

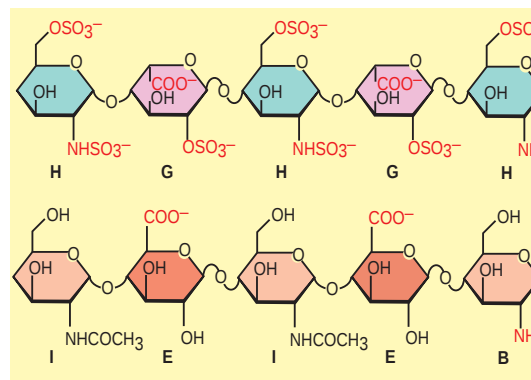


5. LA SYNTHÈSE CHIMIQUE des oligosaccharides utilisés comme antithrombotiques nécessite une série de «protections» et de «dégagements» des groupes chimiques portés par les monosaccharides de base. Ici on a représenté la synthèse d'un tétrasaccharide, c'est-à-dire d'une chaîne de quatre «sucres»

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