

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

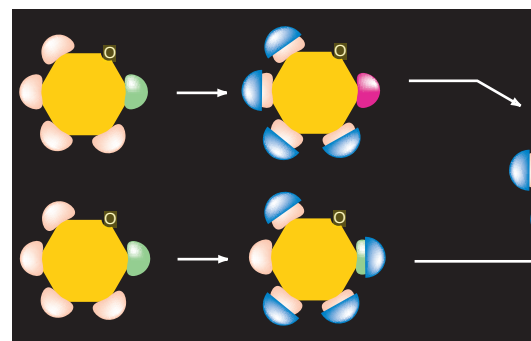
avons constaté que seuls les groupes sulfonate et les groupes carboxylate ($-\text{COO}^-$) assuraient directement la liaison à la protéine, alors que nous nous donnions beaucoup de mal, au cours de la synthèse, pour protéger temporairement les groupes hydroxyle ($-\text{OH}$) des monosaccharides initiaux,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

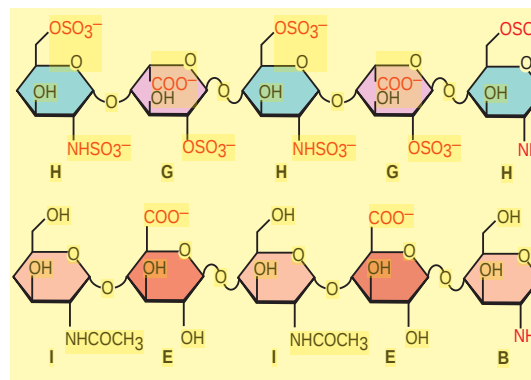


5. LA SYNTHÈSE CHIMIQUE des oligosaccharides utilisés comme antithrombotiques nécessite une série de «protections» et de «dégagements» des groupes chimiques portés par les monosaccharides de base. Ici on a représenté la synthèse d'un tétrasaccharide, c'est-à-dire d'une chaîne de quatre «sucres»

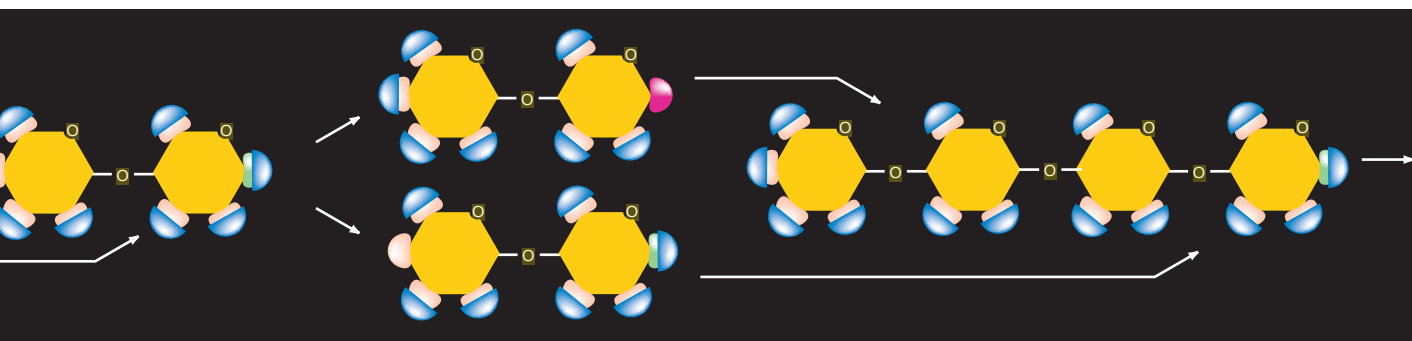
Les inhibiteurs mixtes

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?

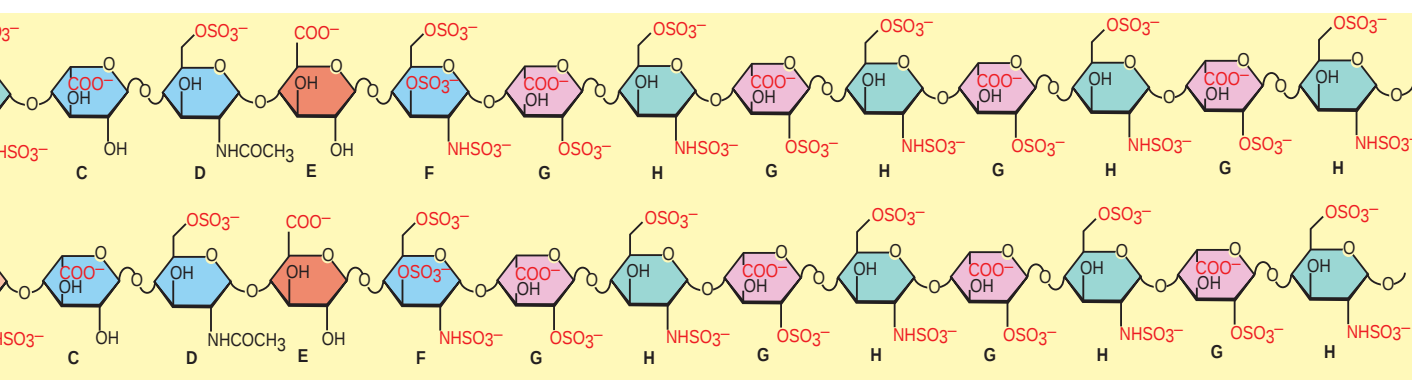
Pour commencer le travail, nous avons pensé qu'un oligosaccharide qui porte le site de liaison à l'antithrombine, puisqu'il est sulfonaté, possède les éléments nécessaires pour attirer la thrombine par des forces électrostatiques. Ainsi une juxtaposition de tels sites devait non seulement catalyser l'inhibition 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.