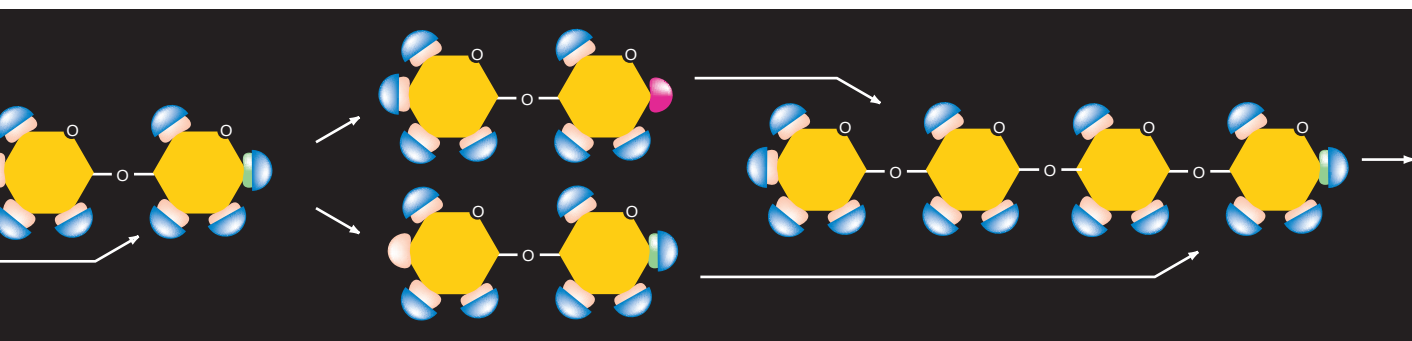




élémentaires. Partant d'une première molécule de base (en haut à gauche), on commence par protéger tous les groupes portés par la molécule en les recouvrant par d'autres groupes qui ne réagiront pas ultérieurement et que l'on enlèvera ensuite selon les besoins. Un groupe hydroxyle (représenté par une 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?

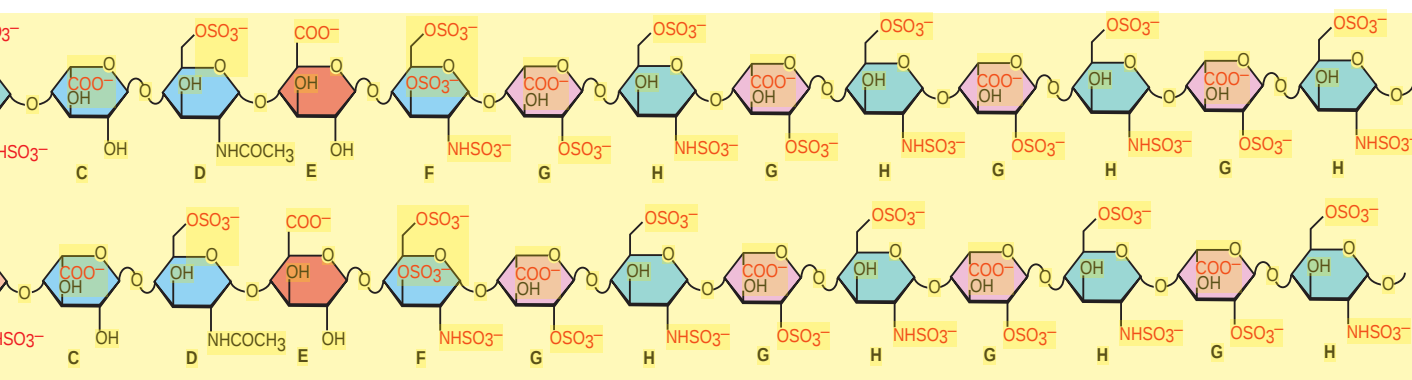
Pour commencer le travail, nous avons pensé qu'un oligosaccharide qui porte le site de liaison à l'antithrombine, puisqu'il est sulfonaté, possède les éléments nécessaires pour attirer la thrombine par des forces électrostatiques. Ainsi une juxtaposition de tels sites devait non seulement catalyser l'inhibition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

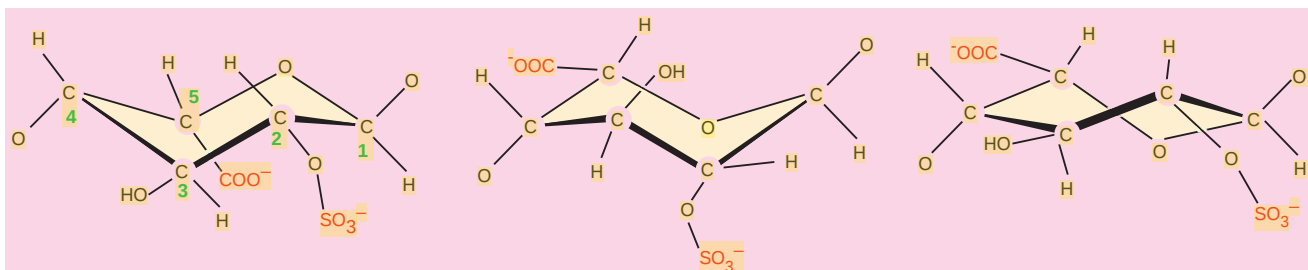
Les molécules que nous avons ensuite construites ont un site pentasaccharidique qui se lie à l'antithrombine (le pentasaccharide DEFGH), prolongé à une extrémité par une série de sous-unités glucose sulfonaté : on reproduit ainsi la répartition de charges électriques qui, dans l'héparine, assure la liaison 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. CARIOU, 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.