

# Chimie de l'héparine

La synthèse livre des outils pour élucider le mécanisme d'action et des principes actifs pour les médicaments de demain

**Maurice Petitou\*** responsable chimie, département cardiovasculaire/thrombose

**Summary :** *Heparin chemistry : Chemical synthesis provides tools to elucidate the mechanism of action, and active principles for drugs of the future*

*Heparin, a complex animal polysaccharide, is the active principle of a major anticoagulant drug used to prevent or cure thrombosis. Heparin has been used in man since 1937, but the critical role of antithrombin (a plasma protein) as heparin cofactor was only demonstrated in 1974. Following this discovery, heparin structural features involved in the activation of antithrombin have been identified. The corresponding oligosaccharide sequences have then been reproduced by total chemical synthesis, thus providing ideal tools to study the mechanism of antithrombin activation. Pharmacologists have established the antithrombotic properties of these synthetic oligosaccharides that today, constitute highly innovative drug candidates.*

**Mots clés :** *Héparine, oligosaccharides, polysaccharides, antithrombine, coagulation.*

**Key-words :** *Heparin, oligosaccharides, polysaccharides, antithrombin, coagulation.*

## L'héparine est un polysaccharide complexe

La structure de l'héparine a lentement émergé d'une foule de travaux aux résultats contradictoires

L'histoire de l'héparine commence de façon amusante en 1916 : alors qu'il cherche à extraire du foie des substances procoagulantes, Jay McLean,

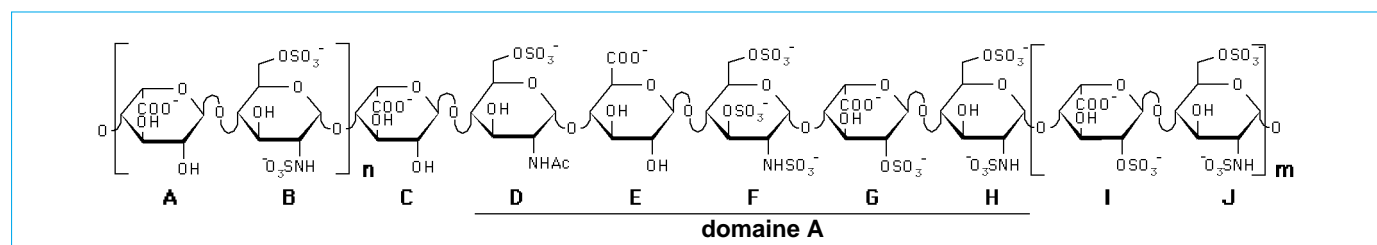
\* Sanofi-Synthelabo, Département Cardio-vasculaire/thrombose, 195, route d'Espagne, 31036 Toulouse Cedex. Tél. : 05.61.16.23.90. Fax : 05.61.16.22.86. E-mail : maurice.petitou@sanofi-synthelabo.fr

étudiant dans le laboratoire du professeur Howell à la Johns Hopkins Medical School, isole ce que l'on considère maintenant comme l'anticoagulant de référence ! La détermination de la structure chimique a suivi à peu près le même chemin : considérée de prime abord comme un lipide, l'héparine a assez rapidement été classée dans la famille des polysaccharides dont elle représente en fait l'un des membres les plus complexes [1]. Il s'agit d'un enchaînement d'unités d'acides uroniques et de glucosamine, partiellement O- et N-sulfonates (figure 1), dont les subtiles particularités ont, pour certaines, été découvertes il y a un peu

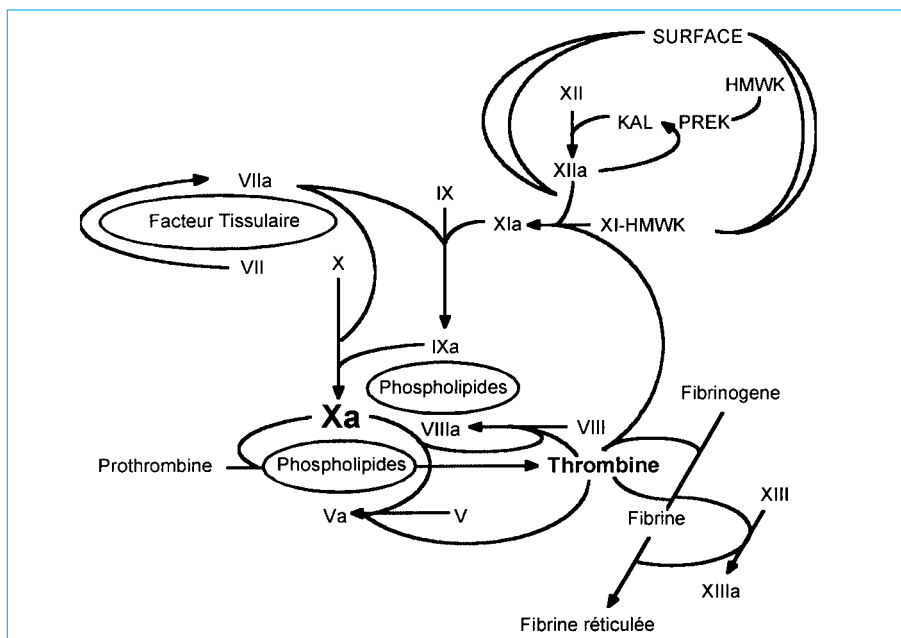
moins de 20 ans, et pour d'autres peut-être, ne le sont pas encore. Quant à la fonction biologique de l'héparine, elle demeure aujourd'hui encore très mystérieuse.

Une séquence d'héparine de structure particulière se lie à l'antithrombine et induit un changement conformationnel de ce régulateur essentiel de la coagulation

Afin de maintenir le sang dans l'état de fluidité nécessaire à la vie tout en étant capable d'éviter les hémorragies, l'organisme humain dispose d'un système enzymatique très sophistiqué : le



**Figure 1** - Une molécule d'héparine est la répétition d'un motif disaccharidique de base comprenant un acide uronique et une glucosamine. La nature de l'acide uronique (D-glucuronique, E, ou L-iduronique, A, C, G, I), la nature de l'unité de glucosamine (N-acétyl, D, N-sulfonato, B, F, H, J, amine libre), ainsi que la position des esters sulfoniques portés par ces monosaccharides, conduisent à envisager de nombreuses structures disaccharidiques de base. Le disaccharide  $\rightarrow 4$ -(acide 2-O-sulfonato-L-iduronique)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-O-sulfonato-2-N-sulfonato- $\alpha$ -D-glucosamine)-(1 $\rightarrow$ ) représente plus de 80 % de la structure (structure régulière). Cependant, des séquences particulières (structure irrégulière), telles que le trisaccharide DEF ci-dessus, jouent un rôle essentiel dans les processus biologiques. Ainsi, ce trisaccharide est-il l'élément clé du site de liaison pentasaccharidique DEFGH reconnu par l'antithrombine (domaine A). Dans certaines molécules d'héparine, la séquence DEFGH contient une unité D N-sulfonaté et non pas N-acétylée.



**Figure 2** - Le système de la coagulation est un ensemble de pro-enzymes (facteurs de coagulation) inactifs. Sous l'influence d'un facteur déclenchant, ces pro-enzymes sont activés en cascade. Par exemple, la libération de facteur tissulaire par des monocytes active le facteur VII en VIIa, lui-même active le X en Xa, qui active le II (prothrombine) en IIa (thrombine). La thrombine transforme le fibrinogène soluble en fibrine insoluble qui participe à la formation du caillot sanguin. La cascade de la coagulation est finement régulée, en particulier par l'antithrombine qui est capable d'inhiber la plupart des facteurs activés. Ce pouvoir inhibiteur est considérablement renforcé par l'héparine.

système de la coagulation (figure 2). La coagulation est activée en de nombreuses circonstances pathologiques (inflammations) ou accidentelles (hémorragies, chirurgie), puis elle est inhibée lorsque son action doit cesser. Une protéine de la famille des inhibiteurs de protéinases à serine : l'antithrombine (également appelée antithrombine III), joue alors un rôle essentiel.

L'activité antithrombotique de l'héparine résulte de sa capacité à activer l'antithrombine et de retarder ainsi la coagulation. On sait depuis la fin des années 70 que l'héparine induit un changement de conformation de la protéine, ce qui renforce considérablement la vitesse à laquelle elle inhibe la thrombine (x 4 200) et le facteur Xa (x 560) [2]. La dissection de la molécule polysaccharidique a conduit à l'identification d'une séquence pentasaccharidique particulière (DEFGH, figure 1), responsable de la liaison à l'antithrombine [3]. Cette séquence, déduite d'études structurales, ne peut pas être obtenue à partir de l'héparine. Heureusement, la synthèse chimique [4-5] des deux variants (*N*-sulfonaté et *N*-acétylé sur l'unité D) observés dans le produit naturel a permis de confirmer que ce pentasaccharide représente bien

le site de liaison à l'antithrombine [6]. Le pentasaccharide DEFGH (figure 3) possède la même affinité (Kd 50 nM) vis-à-vis de l'antithrombine que l'héparine elle-même. Plus récemment, nous avons montré, également à l'aide de composés de synthèse, que le trisaccharide DEF est l'élément clé de la reconnaissance entre les deux molécules [7].

### Rôle important de la synthèse chimique de l'héparine

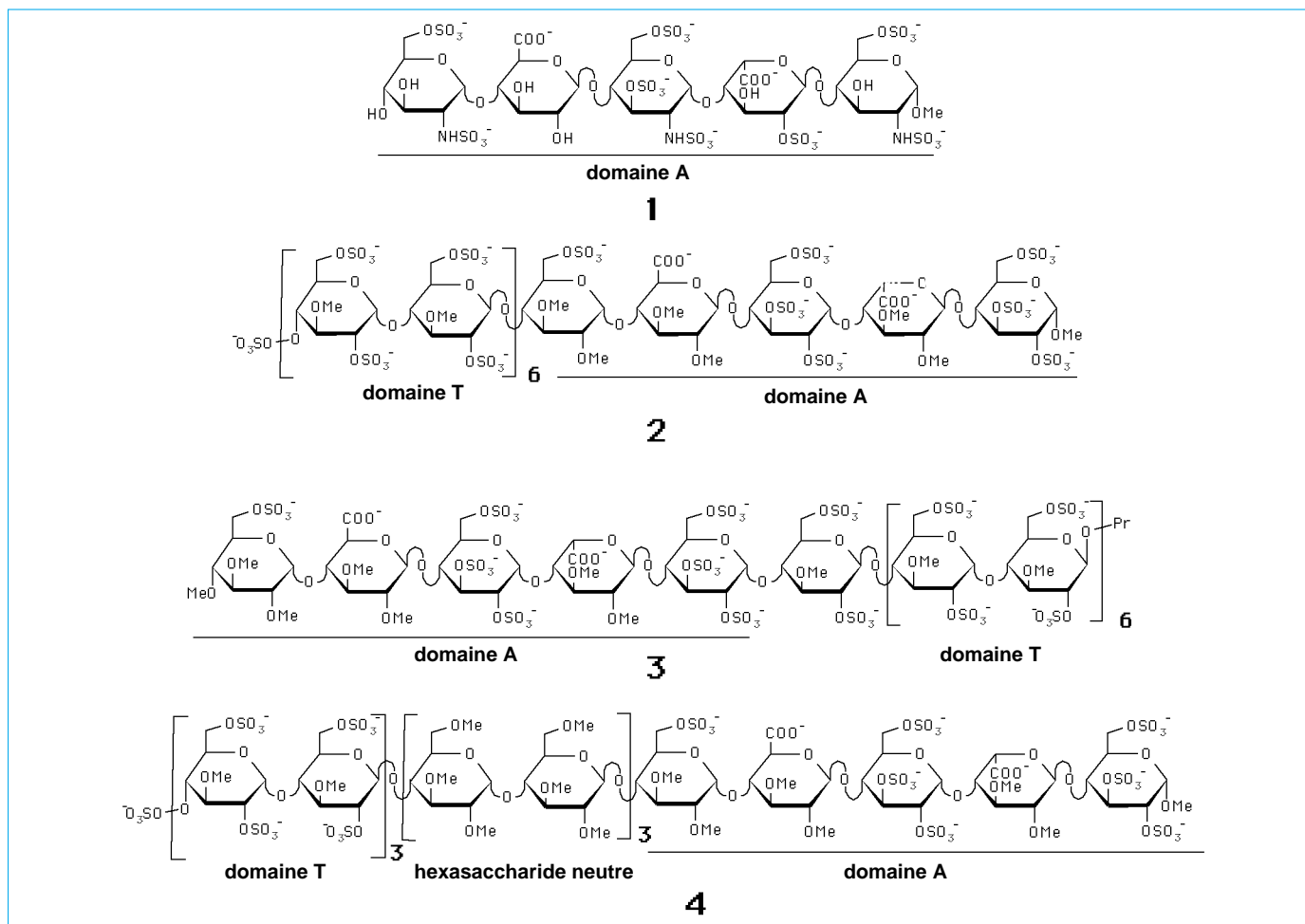
#### La synthèse chimique permet de préciser la structure de la séquence active

La synthèse chimique a donc permis de démontrer clairement que le pentasaccharide DEFGH qui ne représente que 4-5 % en masse de la molécule d'héparine, constitue le site de liaison à l'antithrombine. Elle a également permis de préciser le rôle de tous les éléments structuraux de la séquence DEFGH à l'égard de l'interaction avec l'antithrombine [8]. L'unité de glucosamine F est particulièrement intéressante à cet égard, car elle possède la caracté-

ristique d'être *O*-sulfonaté en position 3, ce qui est le cas pour seulement 1 unité de glucosamine sur environ 75 dans l'héparine. Afin d'étudier le rôle de ce sulfonate particulier, nous avons synthétisé la molécule DEFGH qui en est dépourvue et constaté qu'elle ne possède plus d'affinité pour l'antithrombine. A la suite de cette démonstration, en revenant à des préparations standard d'héparine, dont on sait que seulement un tiers des chaînes sont douées de cette affinité, on a pu corréler la présence de ce sulfonate particulier à l'affinité pour la protéine. Ainsi, alors qu'une molécule d'héparine de masse moléculaire 15 000 comporte environ 60 groupes *O*-sulfonates, l'aptitude à activer l'antithrombine réside dans la présence d'un seul groupe additionnel en position 3 d'une unité de glucosamine. Cette constatation a bouleversé la conception de l'activité anticoagulante de l'héparine, et plus généralement des interactions des glycosaminoglycans avec les protéines : ces interactions sont certes sous l'influence des charges, mais il semble que la répartition de ces dernières dans l'espace, plutôt que leur densité, soit le facteur critique déterminant l'interaction et en particulier sa spécificité. Il est intéressant de rapprocher cette observation des nombreuses publications scientifiques qui font apparaître aujourd'hui que les glycosaminoglycans (héparane sulfate, chondroïtine sulfate, dermatane sulfate, etc.) pourraient jouer un rôle majeur en biologie [9].

#### La synthèse chimique permet d'obtenir des agents pharmacologiques plus sélectifs

L'antithrombine activée par l'héparine est capable d'inhiber plusieurs facteurs de la coagulation selon deux mécanismes légèrement différents. Ainsi, l'inhibition du facteur Xa est observée pour tous les fragments d'héparine capables de se lier à la protéine, alors que l'inhibition des autres facteurs n'est observée que pour les molécules qui, de plus, possèdent une taille supérieure à 15 unités saccharidiques (cette taille limite a pu être déterminée avec précision par la synthèse de molécules de tailles bien définies) [10]. Les préparations d'héparine



**Figure 3** - Quelques mimés d'héparine obtenus par synthèse. Le pentasaccharide **1** représente le site de liaison à l'antithrombine (domaine A), c'est un inhibiteur sélectif du facteur Xa. L'heptadecasaccharide **2** contient en plus un domaine de liaison à la thrombine (domaine T). Comme l'héparine, il inhibe le facteur Xa et la thrombine. L'octadecasaccharide **3** contient un domaine de liaison à l'antithrombine et à la thrombine. Cependant, la disposition relative de ces deux sites (inversée par rapport à **2**) ne permet pas l'inhibition de la thrombine, et **3** inhibe seulement le facteur Xa. L'octadecasaccharide **4** possède des propriétés anticoagulantes supérieures à celles de l'héparine mais, contrairement à celles-ci, il n'est pas neutralisé par le PF4.

actuellement utilisées en clinique (héparine standard, héparine de faible masse moléculaire) sont des mélanges, en proportions diverses, de ces chaînes, et il est pratiquement impossible d'obtenir à partir du polysaccharide naturel des fragments de taille parfaitement homogène.

La synthèse, par contre, permet de préparer à volonté des produits homogènes possédant des propriétés pharmacologiques différentes (*figure 3*), parfaitement définies et reproductibles. Ainsi, les pentasaccharides DEFGH sont des inhibiteurs sélectifs du facteur Xa. Leur obtention a permis de démontrer que l'inhibition sélective de ce facteur de coagulation est suffisante pour observer un effet antithrombotique. Des essais cliniques (phase III) sont en cours pour confirmer ces observations chez l'homme. Il a été montré plus récemment que l'on pouvait obtenir par syn-

thèse totale des composés de taille suffisante pour inhiber à la fois le facteur Xa et la thrombine [11-12]. Ces derniers possèdent un effet antithrombotique puissant qui a été démontré chez l'animal. A la différence de l'héparine, et comme les pentasaccharides ci-dessus, ils n'interagissent pas avec le PF4, une protéine des plaquettes impliquée dans certains effets secondaires indésirables de l'héparine actuellement utilisée en clinique [13].

La synthèse chimique permet en outre de modifier la structure des produits de façon à modifier leur demi-vie. Ceci est un avantage non négligeable, particulièrement lorsque l'on s'adresse à des préparations pharmaceutiques injectables. Ainsi, la synthèse chimique donne accès à de nouveaux principes actifs de médicaments qui se démarquent de l'héparine, même s'ils partagent avec elle la propriété d'activer l'antithrombine.

### La synthèse chimique permet de découvrir le rôle de la conformation de l'acide L-iduronique

La synthèse chimique de la séquence DEFGH, la première synthèse d'un composé comportant un motif acide L-iduronique, est indirectement responsable de la découverte des particularités conformationnelles de ce monosaccharide qui, elles-mêmes, expliqueraient les propriétés biologiques remarquables des trois polysaccharides (héparine, héparane sulfate, dermatane sulfate) qui le contiennent [14]. Ainsi, pour la première fois, une analyse RMN détaillée d'un fragment homogène d'héparine était possible. Cette analyse suggéra la présence d'un conformère inhabituel  ${}^2S_0$  (bateau twisté) en plus des deux conformères chaises  ${}^1C_4$  et  ${}^4C_1$  déjà décrits [15]. Des études de modélisation

moléculaire et des expériences de RMN ont permis de corréler la présence de ce conformère à la capacité d'activer l'antithrombine. L'ensemble de ces travaux indique que la conformation  ${}^2S_0$  joue un rôle important dans cette activation, soit dans la phase initiale de reconnaissance par la protéine, soit au cours du processus de réarrangement conformationnel qui conduit à la forme activée, soit enfin pour stabiliser cette forme activée. Grâce à la synthèse chimique, nous devrions bientôt apporter une réponse précise à ces interrogations.

## Synthèse chimique et synthèse enzymatique

Au cours de ce bref résumé, nous avons vu que la synthèse chimique joue un rôle important dans l'histoire contemporaine de l'héparine. S'agissant de synthèse d'un produit naturel, la question de l'utilisation des techniques du génie biologique vient immédiatement à l'esprit. On peut effectivement envisager d'utiliser la synthèse enzymatique (éventuellement combinée à la synthèse chimique) pour produire des composés apparentés à l'héparine ou aux héparines de faible masse moléculaire.

Cependant, la complexité structurale des molécules cibles, ainsi que le nombre d'enzymes mises en jeu dans la biosynthèse des glycosaminoglycanes, laissent perplexes quant à la possibilité d'obtenir ainsi, dans un futur proche, les espèces bien définies permettant en particulier de satisfaire les contraintes de l'industrie pharmaceutique d'aujourd'hui.

### Remerciements

Les travaux décrits dans cet article ont, pour une part, été effectués dans le cadre d'une collaboration entre Sanofi-Synthélabo (Paris, France) et Organon (Oss, Pays-Bas)

### Références

- [1] Casu B., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1985**, *43*, p. 51-134.
- [2] Olson S.T., Björk I., *Semin. Thromb. Haemost.*, **1994**, *20*, p. 373-409.
- [3] Casu B., Oreste P., Torri G., Zoppetti G., Choay J., Lormeau J.-C., Petitou M., Sinaÿ P., *Biochem. J.*, **1981**, *197*, p. 599-609.
- [4] Sinaÿ P., Jacquinet J.-C., Petitou M., Duchaussoy P., Lederman I., Choay J., Torri G., *Carbohydr. Res.*, **1984**, *132*, C5-C9.
- [5] Duchaussoy P., Lei P.S., Petitou M., Sinaÿ P., Lormeau J.-C., Choay J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1991**, *1*, p. 99-102.
- [6] Choay J., Petitou M., Lormeau J.-C., Sinaÿ P., Casu B., Gatti G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1983**, *116*, p. 492-499.
- [7] Petitou M., Barzu T., Héroult J.-P., Herbert J.-M., *Glycobiology*, **1997**, *7*, p. 323-327.
- [8] Van Boeckel C.A.A., Petitou M., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1993**, *32*, p. 1671-1818.
- [9] Praillet C., Grimaud J.A., Lortat-Jacob H., *Medecine/Science*, **1998**, *14*, p. 412-420 ; Praillet C., Lortat-Jacob H., Grimaud J.A., *ibid*, **1998**, *14*, p. 421-428.
- [10] Petitou M., Duchaussoy P., Driguez P.-A., Jaurand G., Héroult J.-P., Lormeau J.-C., van Boeckel C.A.A., Herbert J.-M., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1998**, *37*, p. 3009-3014.
- [11] Petitou M., Héroult J.-P., Bernat A., Driguez P.-A., Duchaussoy P., Lormeau J.-C., Herbert J.-M., *Nature*, **1999**, *398*, p. 417-422.
- [12] Grootenhuis P.D.J., Westerduin P., Meuleman D., Petitou M., van Boeckel C.A.A., *Nature Struct. Biol.*, **1995**, *2*, p. 736-739.
- [13] Warkentin T.E., Chong B.H., Greinacher A., *Thromb. Haemost.*, **1998**, *79*, p. 1-7.
- [14] Casu B., Petitou M., Provasoli A., Sinaÿ P., *Trends Biochem. Sci.*, **1988**, *13*, p. 221-225.
- [15] Torri G., Casu B., Gatti G., Petitou M., Choay J., Jacquinet J.-C., Sinaÿ P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1985**, *128*, p. 134-140.