

STRUCTURE POLYÉLECTROLYTIQUE ET ACTIVITÉ ANTICOAGULANTE DE FRACTIONS D'HÉPARINE OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS

CHRISTIAN BRAUD, MICHEL VERT

Université de Haute-Normandie, UA CNRS 500, Laboratoire des Substances Macromoléculaires, I.N.S.C.I.R., B.P. 8, F-76130 Mont Saint Aignan (France)

ET PIERRE GRANGER

Université de Haute-Normandie, Institut Universitaire de Technologie, B.P. 47, F-76130 Mont Saint Aignan (France)

(Reçu le 6 novembre 1984; accepté le 16 janvier 1985)

ABSTRACT

Two commercial heparins were fractionated on DEAE-Sephadex gel with aqueous sodium chloride of stepwise, increasing ionic strength as eluent. Carboxylate and sulfate content of each fraction were assessed from potentiometric and conductometric titration curves in salt-free solutions. Comparison between fractions was based on $F_s = 1 + [\text{sulfate}]/[\text{carboxylate}]$, the factor of averaged negative charge per uronic acid–glucosamine disaccharide unit, and on 100.6 MHz ^{13}C -n.m.r. spectra. Chemical composition varied very much from one fraction to the other, the fractionation occurring according to charge density and molecular weight. USP anticoagulant activity increased linearly with F_s not only for the two heparins but also for heparins having various degrees of *N*-desulfation. A master curve, $A_{\text{USP}} = K(F_s)$, common for three series of compounds was found with F_s 2.58 as critical minimum value for nil anticoagulant activity, when effective negative charges of *N*-desulfated heparins were taken into account. This suggests that heparin–antithrombin III interactions that govern anticoagulant activity depend on modulations of electric potential along polymer chains. Correlations with the concept of binding sites are tentatively discussed.

SOMMAIRE

Deux héparines commerciales ont été fractionnées sur colonne DEAE-Sephadex avec des solutions éluantes de concentrations croissantes en chlorure de sodium. Les teneurs de chaque fraction en groupes carboxylate et sulfate sont évaluées à partir des courbes de titrages potentiométrique et conductométrique dans l'eau. Les fractions sont comparées à l'aide du facteur de charge négative moyen par unité dissaccharidique acide uronique–glucosamine, $F_s = 1 + [\text{sulfate}]/[\text{carboxylate}]$, et des spectres r.m.n.- ^{13}C à 100,6 MHz. La composition

chimique varie beaucoup d'une fraction à l'autre, le fractionnement se produisant par densité de charge et masse moléculaire croissantes. L'activité anticoagulante USP croît linéairement avec F_S non seulement pour les deux héparines mais aussi pour des héparines ayant des degrés de *N*-désulfatation croissants. Une droite maîtresse, $A_{\text{USP}} = K(F_S)$, commune à trois séries de composés est obtenue avec une valeur critique minimale, F_S 2,58, quand la charge négative effective des héparines *N*-désulfatées est prise en compte. Ces résultats suggèrent que les interactions héparine-antithrombine III gouvernant l'activité anticoagulante dépendent de la modulation du potentiel électrostatique le long des chaînes. La corrélation avec la notion de site d'interaction est considérée.

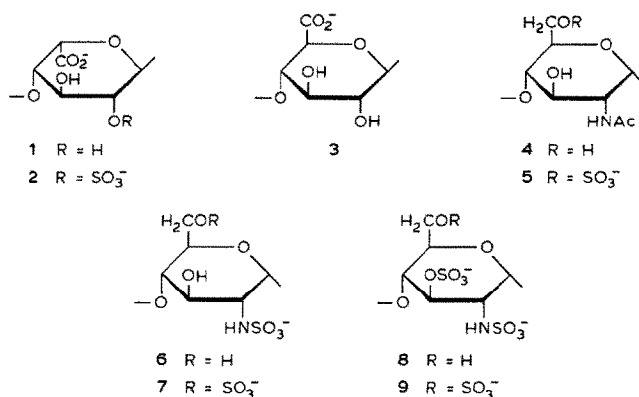
INTRODUCTION

L'héparine est un agent thérapeutique macromoléculaire produit et commercialisé à grande échelle en raison de ses propriétés anticoagulantes. Le terme "héparine" regroupe une famille de macromolécules optiquement actives de la classe des glycosaminoglycannes présentant des activités biologiques différenciées que les chercheurs essaient actuellement de relier à des paramètres structuraux, en particulier à l'existence de sites d'interaction avec l'antithrombine III (AT III), et d'autres protéines sériques^{1,2}. Ces macromolécules possèdent un squelette polysaccharidique substitué par des groupes sulfate et sulfamate (fonctions acide fort) et par des groupes carboxylate (fonction acide faible), ionisés au pH physiologique. Les caractéristiques structurales dépendant en plus de l'origine tissulaire et du procédé de fabrication, les héparines commerciales apparaissent comme des systèmes complexes et hétérogènes³.

La connaissance de la nature des motifs saccharidiques constitutifs de l'héparine a considérablement progressé ces dernières années⁴ en particulier grâce à la résonance magnétique nucléaire-¹H et -¹³C. L'héparine apparaît actuellement comme un copolymère constitué de résidus d'acide uronique et de 2-amino-2-désoxy-D-glucose substitués et liés en alternance par des liaisons glycosidiques (1→4). Neuf structures différentes ont été détectées (1-9). L'unité répétitive disaccharidique (2→7), la plus abondante dans les différentes héparines, associe^{5,6} le résidu d'acide L-iduronique 6-sulfate au résidu de 2-amino-2-désoxy-D-glucose doublement sulfaté sur la fonction amine et en C-6.

Depuis plusieurs années, nous nous intéressons aux propriétés électrolytiques et chiroptiques de l'héparine avec une attention particulière pour l'effet des cations (alcalin et alcalino-terreux) qui compensent les diverses charges négatives^{7,8}. L'étude du dichroïsme circulaire a montré l'existence d'une sélectivité intramoléculaire entre ions bivalents et groupe carboxylate lorsque l'héparine porte à la fois des ions mono- et bivalents (sels mixtes), ce qui est le cas *in vivo*, après équilibre ionique avec les sels présents dans les fluides biologiques⁸.

Dans le but de parfaire nos investigations, nous avons entrepris une étude comparative des propriétés physico-chimiques de fractions d'héparine. Dans ce



mémoire, nous rapportons le fractionnement par chromatographie d'échange d'ions à l'échelle préparative et la détermination des teneurs des différentes fractions en motifs constitutifs. Ce travail ayant révélé, d'une manière inattendue, une relation directe entre l'activité anticoagulante des fractions et la présence de concentrations en charges négatives variables le long des chaînes macromoléculaires, une tentative d'interprétation de l'interaction entre les composés macromoléculaires présentant une activité anticoagulante et l'AT III, protéine plasmatique inhibitrice de la thrombine et directement impliquée dans l'activité anticoagulante de l'héparine, est proposée.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Produits. — *Héparine.* Les échantillons d'héparine porcine fournis par l'Institut Choay (forme sodique, lots H101 et H108) ont été mis en solution dans de l'eau bi-distillée et dialysés dans des tubes Visking retenant les composés de masses moléculaires supérieures à 6–8000. Après dialyse, le contenu des tubes, concentré à 50 mL, a été filtré sur filtres Millipore HA (porosité 0,45 μ m) et lyophilisé pour donner les héparines H101 et H108 étudiées dans ce travail.

Héparines N-désulfatées. Les échantillons NDHEP d'héparine H101 partiellement désulfatée ont été obtenus par prélèvements successifs d'une solution d'héparine H101 (forme acide héparinique) laissée vieillir à température ambiante selon une méthode connue pour donner une N-désulfatation sans O-désulfatation⁹. Chaque prélèvement a été neutralisé à pH 7,5 puis dialysé et lyophilisé.

Méthodes. — *Fractionnement.* L'échantillon d'héparine à fractionner a été chargé en tête de colonnes de chromatographie Pharmacia (diam. 2,6 cm; longueur 100 cm; phase stationnaire, 500 mL de gel DEAE-Sephadex A 25) pour le lot H101 (5 g) et (diam. 5 cm; longueur 100 cm; phase stationnaire, 2 L du même gel) pour le lot H108 (25 g) équipées avec une alimentation par pompe péristaltique assurant un débit linéaire d'éluant (62 cm/h). Le gel utilisé pour charger les colonnes a été préalablement équilibré dans un mélange NaCl 0,5M–tampon Tris 0,02M, pH 7.4.

Le fractionnement proprement dit a été effectué par paliers avec des solutions de tampon Tris 0,02M, pH 7,4, renfermant des concentrations croissantes en NaCl et caractérisées par la suite par la molarité en NaCl. Le suivi du fractionnement a été réalisé par polarimétrie (λ 300 nm) à l'aide d'un spectropolarimètre Fica "Spectropol I" équipé d'une cellule à circulation ayant un trajet optique de 0,05 dm.

Dessalement des fractions. Les diverses fractions d'héparine ont été dessalées par filtration sur gel à l'aide d'une colonne (diam. 10 cm, longueur 100 cm) contenant du gel Sephadex G-25 "coarse" (7,8 L), le débit linéaire étant fixé à 62 cm/h. Après dessalement, les diverses fractions ont été remises à pH 7,5, par addition de soude M, dialysées puis lyophilisées.

Détermination des masses moléculaires. Les masses moléculaires des diverses fractions ont été évaluées par perméation sur gel à l'aide d'un chromatographe haute-pression Waters équipé de colonnes Biorad (TSK 125 et TSK 250), l'éluant étant une solution de NaNO_3 M. Les valeurs sont données au sommet du pic réfractométrique, l'ensemble étant étalonné à l'aide d'échantillons de dextrans de masses moléculaires connues (Pharmacia).

Dosages conductimétriques. L'échantillon à étudier (60 mg) dans l'eau (20 mL) a d'abord été converti sous forme d'acide héparinique par chromatographie d'échange d'ions sur une résine Dowex 50 X-8 (20–50 mesh, H^+), la totalité de l'échantillon étant recueilli et complété par de l'eau bi-distillée dans une fiole jaugée de 100 mL. Le dosage conductimétrique a été effectué à 25° sur 25 mL de la solution mère ainsi obtenue en utilisant une microburette Gilmont S 3200 A pour délivrer la solution titrante (NaOH 0,20 M). La conductivité du milieu a été mesurée à l'aide d'un conductimètre Radiometer CD M3 équipé d'une cellule de mesure Tacussel CM 02/55 G.

Spectres r.m.n.- ^{13}C . Les spectres r.m.n.- ^{13}C des fractions ont été obtenus à 100,6 MHz avec découplage large bande proton sur un spectromètre Brucker A.M.-400 à 70°. Chaque échantillon (200 mg) a été conditionné de manière standard par dissolution dans l'eau lourde (2 mL) enrichie à 99,9%, cette dernière servant en même temps de "lock" interne. Les spectres ont été enregistrés après un nombre d'accumulations de l'ordre de 5000 et pour une résolution digitale de 2,4 Hz. Aucune attente n'a été effectuée entre chaque balayage.

Spectres r.m.n.- ^1H . Les spectres r.m.n.- ^1H ont été obtenus sur le même appareil à 400 MHz avec la même sonde et le même échantillon par simple commutation $^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$. L'enregistrement a été effectué après environ 60 accumulations sans aucun temps d'attente entre chaque décroissance libre.

Activité anticoagulante. Les mesures ont été effectuées selon l'U.S. Pharmacopea par les services d'analyse de l'Institut Choay.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Fractionnement. — De nombreuses méthodes ont été utilisées pour séparer

les héparines commerciales en fractions ayant des structures et des activités biologiques différentes¹⁰. Pour ce travail visant l'étude de l'héparine en tant que polyélectrolyte multifonctionnel optiquement actif, nous avons retenu un fractionnement par chromatographie sur gel échangeur d'anions¹¹. L'obtention de fractions en quantités relativement importante a nécessité des adaptations techniques: (a) Éluion en paliers à l'aide de solutions de chlorure de sodium de molarité croissant par pas de 0,04M; (b) détection par polarimétrie en continu avec mesure du pouvoir rotatoire en sortie de colonne jusqu'à retour au zéro afin d'épuiser chaque fraction et d'éviter tout recouvrement; (c) réajustement à pH 7,5 des solutions récupérées à pH 5,5 (c'est à dire au pH de solutions aqueuses en atmosphère ambiante) après fractionnement et dessalement.

Sans ce réajustement, les fractions sont obtenues sous une forme ionique intermédiaire dans laquelle une partie des groupes carboxylate sont sous forme d'acide carboxylique. Ce détail a été confirmé par r.m.n.-¹H à 400 MHz (Fig. 1). La présence de groupes carboxyliques non-ionisés se traduit par le déplacement des raies correspondant à H-5 des structures **2** et **7** respectivement vers les champs

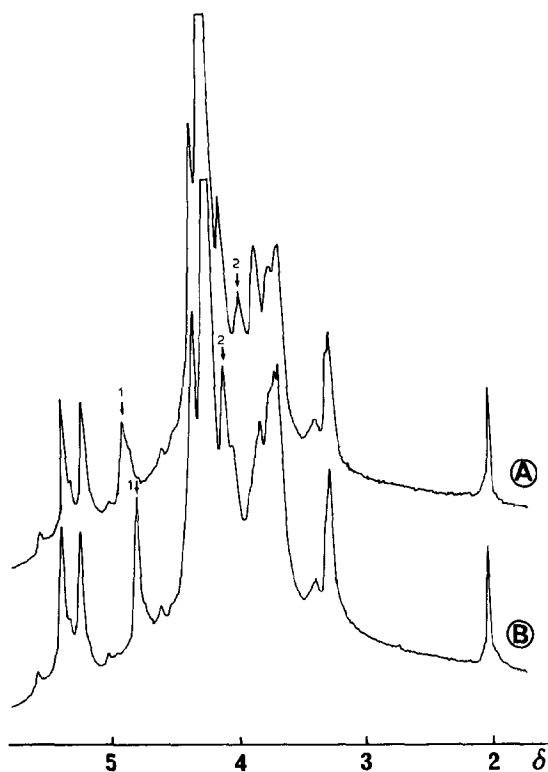


Fig. 1. Spectres r.m.n.-¹H à 400 MHz de la fraction H101_{0,82} en sortie de colonne, pH 5,5 (A) et après neutralisation par l'hydroxyde de sodium pH 7,5 (B). Les flèches numérotées 1 et 2 indiquent respectivement les positions des protons H-5 de **2** et **7** dans les spectres.

faibles et les champs forts, et à leur élargissement, conformément aux observations de Gatti *et al.*⁵ faites lors du titrage des fonctions acide par spectrométrie r.m.n.-¹H.

Deux échantillons d'héparine sodique prélevés sur des lots différents (H101 et H108) ont été fractionnés pour donner les fractions désignées par H101_x et H108_x, x étant la force ionique de la solution saline éluante. Les dosages conductimétriques, effectués après conversion sous forme acide selon la méthode décrite par Casu et Gennaro¹², ont permis de déterminer les teneurs relatives en groupes sulfate et carboxylate sans distinction de composition et de structure. L'héparine pouvant être considérée, en première approximation, comme un copolymère alterné d'acide uronique et de 2-amino-2-désoxy-D-glucose substitué, les teneurs en sulfate (S) et en carboxylate (C) ainsi déterminées et exprimées en pour-cent ont été combinées pour donner un facteur de charge négative moyen, $F_s = 1 + S/C$, au niveau du disaccharide de base ($A \rightarrow \text{GlcN}$), selon une méthode déjà proposée pour refléter la densité de charge¹³. F_s peut varier de 1 [pour un disaccharide de base combinant un résidu d'acide uronique non-sulfaté à un résidu de 2-amino-2-désoxy-D-glucose *N*-acétylé non-sulfaté ($1 \rightarrow 4$ ou $3 \rightarrow 4$)] à 5 [pour un disaccharide de base combinant un résidu d'acide L-iduronique sulfaté à un résidu de 2-amino-2-désoxy-D-glucose trisulfaté ($2 \rightarrow 9$)].

Les données caractéristiques des fractionnements, l'activité anticoagulante et les résultats de l'analyse conductimétrique de chaque fraction sont présentés dans le Tableau I. Ce tableau confirme que la chromatographie d'affinité sur gel DEAE-

TABLEAU I

CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES FRACTIONS D'HÉPARINE OBTENUES POUR LES LOTS H101 ET H108

<i>Échantillons</i>	<i>Quantité (g)</i>	<i>A_{USP} (UI/mg)</i>	<i>M_r</i>	<i>F_s</i>
H101	5,0	170	24000	3,08
H101 _{0,70}	0,060	<9	13000	
H101 _{0,74}	0,230	36		
H101 _{0,78}	0,580	120	19000	2,91
H101 _{0,82}	1,040	157	21000	3,03
H101 _{0,86}	0,800	197	26000	3,16
H101 _{0,90}	1,150	220	27000	3,21
H101 _{0,95}	0,230	197		3,18
H101 _{1,00}	0,110 ^a	196	29000	
H108	25,0	171	25000	3,10
H108 _{0,78}	1,680	38	10000	2,71
H108 _{0,82}	5,650	130	19000	2,94
H108 _{0,86}	7,640	160	25000	3,06
H108 _{0,90}	5,380	199	27000	3,16
H108 _{0,94}	2,200	216	27000	3,18
H108 _{0,98}	0,300 ^b	233	31000	3,26

^aQuantité d'héparine H101 récupérée: 84% ^bQuantité d'héparine H108 récupérée: 91.5%.

Sephadex provoque un fractionnement selon des masses moléculaires et un facteur F_5 croissant. Il apparaît également que les lots H101 et H108 sont différents. Pour H101 on observe des maxima en activité anticoagulante et en sulfatation ($H101_{0,90}$) tandis que des croissances monotones sont trouvées pour les fractions $H108_x$. Ces deux lots diffèrent également par la présence dans H101 de fractions de faible activité anticoagulante éluées à force ionique inférieure à 0,78. Le lot H101 apparaît donc plus hétérogène que H108.

Groupes sulfates des Fractions $H108_x$. — L'identification des structures présentes dans les Fractions $H108_x$ a été tentée en faisant appel à la r.m.n.- ^{13}C à 100,6 MHz. Le lot H108, comme le lot H101 et toutes les fractions, présente un signal à δ 22,60 caractéristique du groupe méthyle du résidu 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose 6-sulfate (5) ou non-sulfate (4) des héparines dites de type A selon Perlin¹⁴. Les intensités des raies ont été comparées en admettant que l'effet Over-

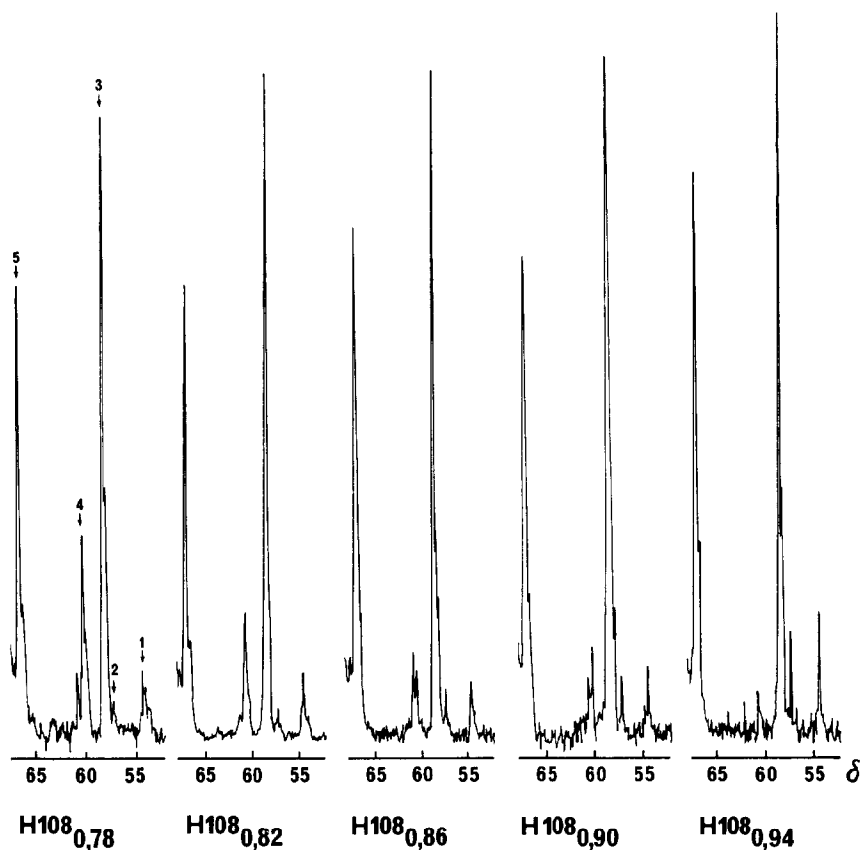


Fig. 2. Spectres r.m.n.- ^{13}C à 100,6 MHz dans la zone spectrale δ 50–70 des fractions d'héparine H108. Les flèches numérotées de 1 à 5 correspondent respectivement aux positions de C-2 de 4 et 5, C-2 de 8 et 9, C-2 de 6 et 7, C-6 de 4 et 6 et C-6 de 5 et 7.

hausser nucléaire est du même ordre de grandeur pour les atomes de carbone situés dans des positions équivalentes.

La Fig. 2 présente les spectres r.m.n.- ^{13}C des Fractions H108_x dans la zone δ 50–70 où résonnent C-2 (**4** et **6**, raie 1 à δ 54,50; **8** et **9**, raie 2 à δ 57,30; **6** et **7**, raie 3 à δ 58,40) et C-6 (**4** et **5**, raie 4 à δ 60,90; **5** et **7**, raie 5 à δ 67,10) des structures du type 2-amino-2-désoxy-D-glucose^{5,15}. La comparaison des raies 1 et 3 dans les cinq fractions montre que le taux de groupes *N*-sulfate est pratiquement équivalent d'une fraction à l'autre en accord avec la littérature^{11,16}. Par contre, la décroissance relative de la raie 4 par rapport à la raie 5 milite en faveur d'une augmentation des groupes *O*-sulfate avec la concentration en sel de l'éluant ce qui est également en accord avec la littérature^{11,16}. D'après ces remarques, les résidus du type 2-amino-2-désoxy-D-glucose de la Fraction $\text{H108}_{0,94}$ peuvent être considérés comme entièrement *O*-sulfatés en position 6, la raie 4 ayant pratiquement disparue. La raie 2 située à δ 57,30 a été attribuée à C-2 du résidu 2-amino-2-désoxy-D-glucose 3-sulfate (**8** et **9**) dont la présence a été signalée¹⁵ dans les fragments hépariniques à haute affinité pour AT III. Il est remarquable que l'intensité relative de cette raie, très faible pour la Fraction $\text{H108}_{0,78}$, augmente avec x pour devenir d'une intensité comparable à la raie 1, pour les Fractions $\text{H108}_{0,90}$ et $\text{H108}_{0,94}$.

La Fig. 3 présente les spectres r.m.n.- ^{13}C des Fractions H108_x dans la zone δ 95–105 où résonnent les atomes C-1 de tous les résidus. Globalement, les spectres s'affinent quand on passe de la Fraction $\text{H108}_{0,78}$ à la Fraction $\text{H108}_{0,94}$. La première fraction comprend 4 raies dont les deux centrales apparaissent complexes. Par contre, la dernière fraction étudiée présente 7 raies fines respectivement à δ 96,17, 96,82, 97,54, 98,11, 99,85, 101,46 et 102,41 et numérotées de 6 à 12.

La raie 6 est attribuée au C-1 de **5**, compte tenu des données de la littérature^{5,17} et de son intensité relativement indépendante de la fraction considérée. La raie 8 est attribuée au C-1 de **7** et les raies 10 et 12 au C-1 de **2** et **3** respectivement. Les raies 7 et 11, absentes pour les fractions obtenues à faible force ionique ainsi que pour l'héparine brute, apparaissent avec l'augmentation de x . Cette double apparition suit celle de la raie 2 de la Fig. 2. La raie 7 est attribuée au C-1 de **8** et **9** tandis que la raie 11 est attribuée au C-1 de **1** (réf. 15). Seule la raie 9, présente dans toutes les fractions, n'a jamais été rapportée. Bien que le massif situé à δ 97–98 pour la Fraction $\text{H108}_{0,74}$ soit complexe, on remarque aisément la disparition d'au moins une raie entre les raies 8 et 9. Cette disparition semble liée à la décroissance de la raie 4 de la Fig. 2 attribuée au C-6 de **4** et **6**. Au niveau de C-1 sur la Fig. 3, il est probable que c'est la contribution du résidu non-sulfaté **4** qui disparaît entre les raies 8 et 9 lorsque x augmente, contribuant ainsi à l'accroissement de F_5 . La raie 9 est donc attribuée, par déduction, au C-1 du résidu **6** (Tableau II).

Les résultats de cette étude r.m.n. confirment et précisent la forte teneur en groupes sulfate des fractions à x élevé, avec, en particulier, la présence très nette de résidus de 2-amino-2-désoxy-D-glucose trisulfatés dont l'importance pour l'interaction avec l'AT III a déjà été soulignée¹⁸, sans qu'un mécanisme précis ait pu être

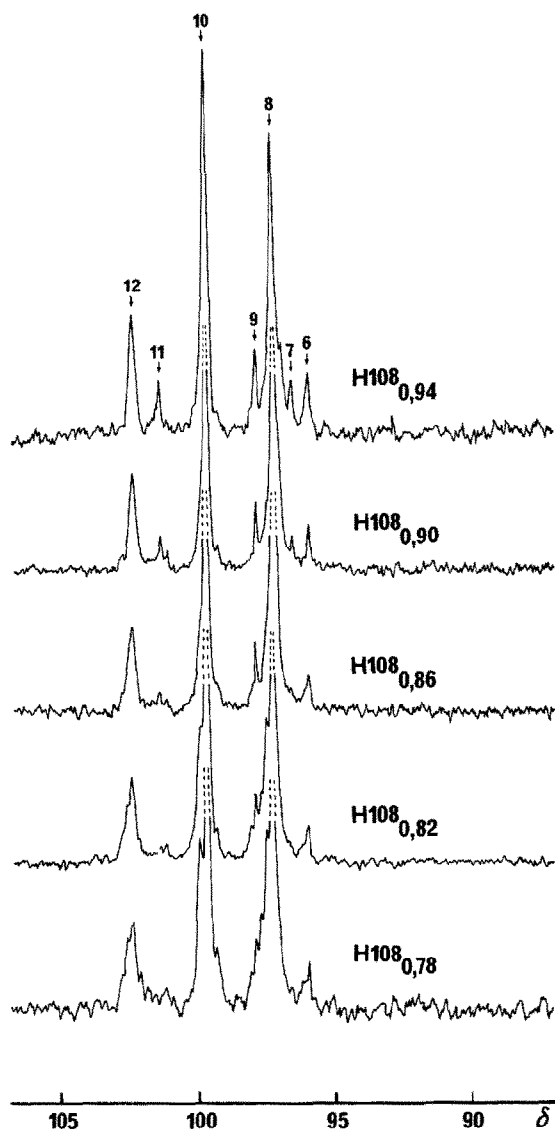


Fig. 3. Spectres r.m.n.- ^{13}C à 100,6 MHz dans la zone spectrale de résonance des carbones anomériques. L'attribution des pics numérotés de 6 à 12 est consignée dans le Tableau II.

dégagé depuis. De plus, il apparaît très nettement des résidus L-iduronique non sulfaté **1** dans les fractions à x élevés. La présence de résidus **1** en quantités relativement importantes a été détectée dans les fragments d'héparine dotés d'activité anticoagulante¹⁵ et il est important de souligner que le spectre r.m.n.- ^{13}C de la Fraction H108_{0,94} à haute activité anticoagulante présente une grande ressemblance avec les spectres de ces fragments. Une telle ressemblance concorde, par ailleurs, avec les résultats les plus récents obtenus par des méthodes biochimiques¹⁹.

TABLEAU II

ATTRIBUTION DES SIGNAUX DES CARBONES ANOMÉRIQUES DES SPECTRES DE R.M.N. ^{13}C AUX NEUF RÉSIDUS SACCHARIDIQUES DÉNOMBRABLES^a

Signal No.	Position (δ)	Attribution au résidu
6	96,17	5
7	96,82	8
7	96,82	9
8	97,54	7
?	97,7-97,9	4(?)
9	98,11	6
10	99,85	2
11	101,46	1
12	102,41	3

^aLes numéros des signaux sont donnés dans la Fig. 3.

Relations entre charges négatives et activité biologique. — L'ensemble des résultats précédents concordent pour faire soupçonner l'existence d'un lien direct entre fractionnement, sulfatation et activité anticoagulante. C'est la raison pour laquelle nous avons essayé de corréler plus quantitativement les données expérimentales par l'intermédiaire du facteur de sulfatation moyen F_s , seule donnée disponible reflétant le caractère électrostatique plus ou moins négatif des polyions hépariniques en l'absence d'informations précises sur la distribution séquentielle des différents résidus.

La Fig. 4 montre qu'il existe une relation linéaire entre l'activité anti-

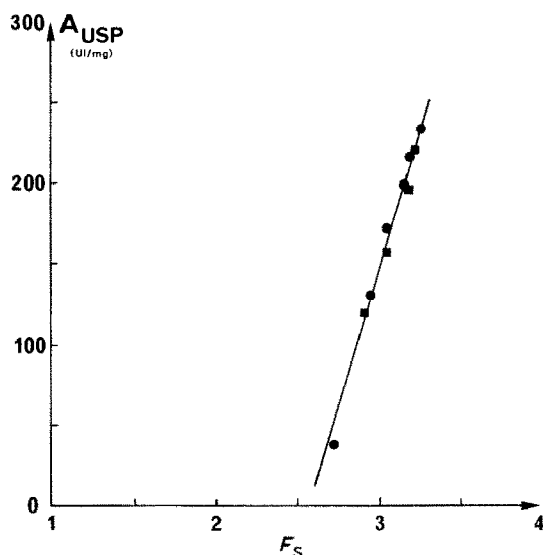


Fig. 4. Variation de l'activité anticoagulante A_{USP} en fonction du facteur de charge négative moyen, F_s , pour les fractions H101_x (■) et H108_x (●).

coagulante A_{USP} et F_s avec une valeur critique F_s 2,58 au dessous de laquelle l'activité anticoagulante est nulle. Cette relation phénoménologique, dont l'expression déduite de la Fig. 4 est $A_{\text{USP}} = 346 F_s - 894$, est commune aux Fractions H101_x et H108_x.

Il est intéressant de noter que pour un échantillon d'héparane sulfate, nous avons trouvé une valeur F_s 2,12, inférieure à F_s , ce qui est en bon accord avec l'absence d'activité anticoagulante de ce glycosaminoglycane. Cependant, le caractère général de la relation linéaire ne peut être apprécié raisonnablement que par référence à des composés dotés d'activité anticoagulante USP du même ordre de grandeur que celles des héparines mais de nature chimique relativement différente. De tels composés ne sont pas disponibles actuellement. Il existe bien des polyanions susceptibles d'interagir avec l'AT III et de catalyser la réaction d'inactivation de la thrombine par l'AT III, mais leurs activités anticoagulantes demeurent très faibles au regard de celle de l'héparine²⁰⁻²².

Une autre solution est offerte par la modification chimique de l'héparine elle-même. Il est, en effet, connu que son activité anticoagulante décroît rapidement lorsqu'elle est *N*-désulfatée¹⁰. Une étude approfondie récente²³ nous a permis de montrer que la *N*-désulfatation entraîne non seulement la perte d'un groupe sulfate avec apparition de résidus de (2-ammonium-2-désoxy-D-glucose)⁺ mais consomme un groupe sulfate supplémentaire pour former un sel interne neutre selon la série d'équilibres donnée dans le Schéma 1.

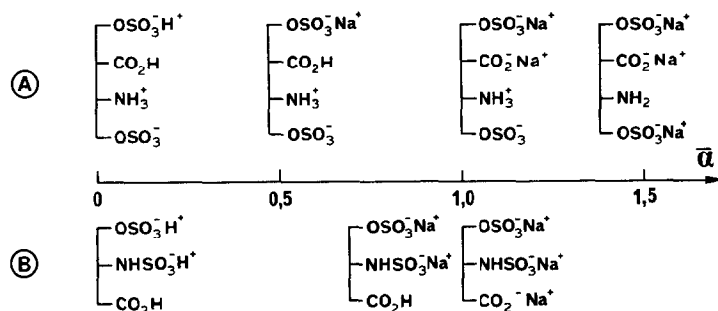


Schéma 1. Divers états d'ionisation de NDHEP (A) et de l'héparine (B) en fonction de leur degré d'ionisation α (dans les deux cas, α 1 correspond à pH 7,5) (réf. 23).

Ainsi, le nombre de groupes sulfate disponibles d'une héparine plus ou moins *N*-désulfatée décroît deux fois plus vite que ne le laisse supposer le degré de *N*-désulfatation. La structure polyampholyte résultante fournit un système original où seuls les groupes *O*-sulfate non engagés dans la structure zwitterionique participent à la densité négative de charges.

Afin de disposer d'un échantillonnage de composés couvrant une large gamme de valeurs F_s , l'échantillon d'héparine H101 a été *N*-désulfaté progressivement par vieillissement de l'acide héparinique correspondant. Une série de polymères NDHEP_x a été obtenue dont les caractéristiques sont regroupées dans le Tableau III.

TABLEAU III

ACTIVITÉ ANTICOAGULANTE (A_{USP}) ET FACTEUR DE CHARGES NÉGATIVES MOYEN DE DIVERS ÉCHANTILLONS D'HÉPARINE PARTIELLEMENT *N*-DÉSULFATÉE^a

Échantillons	t (h)	A_{USP} (UI/mg)	F_S
H101	0	170	3,08
NDHEP ₁	48	164	3,06
NDHEP ₂	120	147	3,05
NDHEP ₃	192	121	2,92
NDHEP ₄	310	113	2,89
NDHEP ₅	455	89	2,76
NDHEP ₆	625	58	2,71
NDHEP ₇	1130	23	2,60
NDHEP ₈	1440	<5	2,28
NDHEP ^b		<5	1,90

^aLes échantillons ont été obtenus par neutralisation d'acide héparinique (H101) au bout d'un temps t (c $2,5 \times 10^{-2}$ équiv./L). ^bCet échantillon a été obtenu par *N*-désulfatation d'héparine²³ H108.

D'une manière remarquable, les valeurs A_{USP} et F_S des composés NDHEP_x se placent sur la droite obtenue pour les fractions d'héparine H101_x et H108_x (Fig. 5). Il faut noter qu'une *N*-désulfatation statistique des molécules actives ne peut rendre compte du fait que l'activité anticoagulante s'annule bien avant la *N*-désulfatation totale dans l'hypothèse de l'existence d'un site actif précis comprenant un ou plusieurs groupes *N*-sulfate. Seul une *N*-désulfatation préférentielle du site pourrait expliquer ce fait, mais une telle désulfatation préférentielle est peu probable. Par contre, la décroissance accélérée de F_S par rapport au degré de *N*-désulfatation avec consommation de groupes sulfate supplémentaires rend compte de la perte

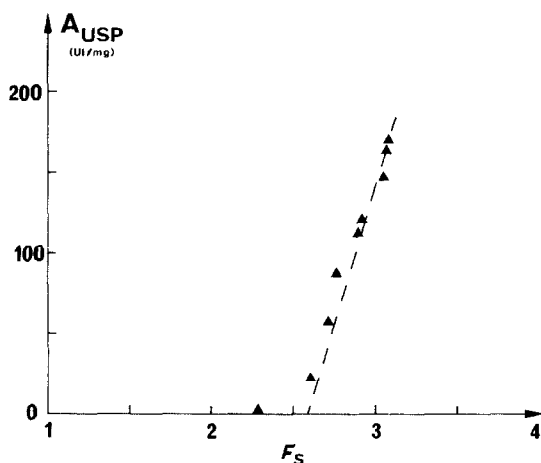


Fig. 5. Variation de l'activité anticoagulante A_{USP} en fonctions de F_S pour les héparines partiellement *N*-désulfatées (NDHEP_x). La droite (—.—) représente la variation linéaire observée sur la Fig. 4.

rapide de l'activité anticoagulante et de son annulation dès que F_5 devient inférieur à F_{5c} .

La convergence des données obtenues pour trois séries de produits différents ($H101_x$, $H108_x$ et $NDHEP_x$) permet de penser qu'il y a bien une relation prédominante entre la densité de charges négatives des polyanions et l'activité anticoagulante telle qu'elle est estimée par le test USP. Cette conclusion peut sembler contradictoire avec l'existence, sur les molécules hépariniques anticoagulantes, d'un site d'interaction spécifique de l'AT III, comme les résultats les plus récents sur les fragments et sur les modèles le laissent supposer²⁴. Il faut, toutefois noter que les notions de prédominance d'un effet de charge et de site d'interaction ne sont pas entièrement incompatibles. En effet, les spectres r.m.n. de la Fig. 3 sont fortement en faveur de la présence le long des chaînes de zones à forte densité de charge, notamment celles contenant le ou les quelques résidus de 2-amino-2-désoxy-D-glucose trisulfatés (**9**), et de zones à plus faible densité de charge, notamment celles contenant des résidus **1** et **3** non-sulfatés. Des indications plus précises sur la distribution séquentielle sont quasi-inexistantes.

Néanmoins, d'après nos résultats, le site d'interaction de l'héparine avec AT III, dont la nature électrostatique a déjà été soupçonnée²⁵, semblerait plutôt lié à la présence d'une ou plusieurs zones à très forte densité de charge négative créant des pics de potentiel élevés le long des macromolécules qu'à des structures primaire et secondaire définies dont la séparation sur échangeur d'ions selon un processus linéaire ne paraît pas explicable simplement.

L'antithrombine III, connue pour interagir sélectivement avec les fractions d'héparine de haute activité est aussi connue comme une protéine à caractère anionique dominant au pH physiologique²⁶ ce qui pourrait paraître rédhibitoire pour des interactions électrostatiques avec des polyanions. Toutefois, l'examen attentif de l'enchaînement des amino-acides constituant cette protéine montre des particularités du type densité de charge modulée qui pourrait se révéler complémentaires de celles de l'héparine. On peut citer l'existence d'une zone à fort caractère cationique (His-120-----Arg-145) au niveau d'un des ponts disulfure (Cys-8→Cys-128). On peut souligner aussi l'existence de deux résidus lysine (Lys-28 et Lys-29) entourés de nombreux groupes anioniques²⁷. En effet, il est bien connu que la basicité d'une fonction amine tertiaire est renforcée lorsque cette fonction est placée dans un environnement macromoléculaire à potentiel négatif²⁸. Une des zones positives de l'AT III pourraient donc être la serrure cationique récepteur d'une clef anionique portée par les molécules hépariniques actives, et constituée par une zone suffisamment négative et limitée dans l'espace pour permettre une interaction avec une zone positive de l'autre partenaire malgré l'existence de charges environnantes dont certaines sont probablement atténuées par engagement dans des liaisons zwitterioniques sans qu'on n'en connaisse ni le nombre ni la nature précise. En d'autres termes, l'interaction du type polyanion-polycation entre héparine et AT III serait commandée par les répartitions locales des charges sur la protéine et sur les molécules hépariniques dans un milieu où la force ionique,

connue pour affecter fortement les complexes polyanion-polycation, est constante. Dans ces conditions, la modulation des potentiels électrostatiques le long des chaînes macromoléculaires assurerait également la discrimination des polyanions vis à vis d'une protéine donnée, ou des protéines vis à vis d'une macromolécule héparinique donnée. Un tel mécanisme expliquerait la reconnaissance des partenaires privilégiés au sein d'un mélange par effet coopératif d'interactions électrostatiques unitaires de faible énergie dans un milieu salin parfaitement défini. L'AT III ne pourrait alors s'associer qu'avec des macromolécules présentant localement des zones à densité de charge élevée se traduisant indirectement par un facteur de charge moyen élevé ($F_s > 2,58$).

Cette hypothèse de travail prend en compte qualitativement les données obtenues pour les fractions. Elle sous-entend de plus que le fractionnement sur gel Sephadex-AT III de l'héparine en héparine de haute affinité (HA) et héparine de basse affinité (LA) pour AT III serait principalement dû à des phénomènes électrostatiques analogues à ceux mis en jeu dans le fractionnement sur gel DEAE-Sephadex, aux densités de charges effectives près et, par conséquent, à l'échelle des forces ioniques éluantes près.

Il a déjà été rapporté que les fractions d'héparine HA éluées sur colonne Sephadex-AT III à forces ioniques élevées ont des teneurs en groupes anioniques supérieures à celles des fractions LA^{16,29}. La littérature est malheureusement peu précise quant à la composition résiduelle ce qui ne permet pas de situer ces fractions par rapport à F_s .

Sans prétendre expliquer l'ensemble des phénomènes d'affinité entre l'héparine et l'AT III, la discussion précédente associe l'idée d'interactions électrostatiques du type polyanion-polycation à celle de sites interactifs spécifiques par l'intermédiaire de la modulation de densité de charges. La participation de la zone à fort caractère cationique comprise entre les résidus His-120 et Arg-145 de l'AT III peut justifier l'analogie électrostatique entre AT III et DEAE-Sephadex mais ne permet pas d'attribuer un rôle particulier aux divers motifs présents sur les molécules hépariniques. Par ailleurs, la participation des deux motifs lysine vicinaux, placés dans un environnement fortement anionique (Glu-27, Glu-32, Asp-33, Glu-34), présentent le triple avantage de singulariser un site cationique voisin du résidu Try-49 connu³⁰ pour être perturbé lors de l'interaction héparine-AT III, d'être compatible avec le fait que deux résidus Lys de l'AT III sont très certainement privilégiés lors de l'association avec l'héparine³¹ et de singulariser les deux groupes sulfate vicinaux (*N*- et 3-*O*-) du résidu motif trisulfaté **9** dont les charges rapprochées pourraient former une double interaction ionique. Il faut noter que dans le site d'interaction avec AT III actuellement retenu, le résidu saccharidique le plus chargé (**9**) parmi les neuf résidus possibles jouxte le résidu le moins chargé²⁴ (**3**). Dans l'état actuel des connaissances, il n'est pas possible d'aller plus loin dans la discussion. Néanmoins, il faut souligner qu'une association héparine-AT III fondée sur des interactions du type polyanion-polycation entre charges définies, n'exclut pas l'intervention de forces électrostatiques ou non engageant d'autres

groupes, après que les partenaires se soient reconnus, justifiant ainsi l'importance des proches voisins et de la modulation électrostatique. Par ailleurs, elle suggère que la force ionique, dont dépend fortement la stabilité des complexes polyanion-polycation, doit être un facteur très important dans l'interaction héparine-AT III, la combinaison entre thrombine et le couple héparine-AT III conduisant en fin de compte à un ensemble instable à la force ionique physiologique, et, par conséquent, à la libération du polyanion héparinique catalyseur. Enfin, un tel mécanisme peut être étendu à d'autres protéines sériques dont l'interaction avec des polyanions dépendra de leur structure polyampholyte propre.

Il faut noter que l'obtention de pics de potentiel électrostatique aussi élevés que celui créé par le résidu 9 est difficile le long d'une chaîne macromoléculaire si l'on considère des squelettes autres que polysaccharidiques. Cette remarque pourrait expliquer pourquoi les chimistes n'ont obtenu, jusqu'à présent, que des polymères synthétiques à faible activité anticoagulante²⁰⁻²².

Enfin, il paraît nécessaire de rappeler que l'affinité des dérivés hépariniques pour les ions calcium dont nous avons déjà souligné la possible liaison avec la densité de charge⁸ pourrait bien être modulé également par la distribution des sites négatifs c'est-à-dire indirectement par F_5 .

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les Drs J. Choay, J. C. Lormeau et M. Petitou de l'Institut Choay pour les discussions scientifiques fructueuses auxquelles ils ont bien voulu participer ainsi que l'Institut Choay pour son soutien financier. Les spectres r.m.n. à haut champ ont été obtenus au Laboratoire d'applications Brucker à Wissembourg. Nous remercions le Dr Brevard qui nous a offert cette possibilité.

RÉFÉRENCES

- 1 I. BJÖRK ET U. LINDAHL, *Mol. Cell. Biochem.*, 48 (1982) 161-182.
- 2 B. CASU, E. A. JOHNSON, M. MANTOVANI, B. MULLOY, P. ORESTE, R. PESCADOR, G. PRINO, G. TORRI ET G. ZOPPETTI, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 33 (1983) 135-142.
- 3 L. B. JAQUES, *Pharmacol. Rev.*, 31 (1980) 99-167.
- 4 B. CASU, *Carbohydr. Polym.*, 2 (1982) 247-253.
- 5 G. GATTI, B. CASU, G. K. HAMER ET A. S. PERLIN, *Macromolecules*, 12 (1979) 1001-1007.
- 6 H. E. CONRAD, P. N. SHAKLEE ET M. J. BIENKOWSKI, *Abstr. Pap. Meet. Am. Chem. Soc.*, 185th, (1983) CARB-20.
- 7 C. VILLIERS, C. BRAUD ET M. VERT, *Carbohydr. Res.*, 83 (1980) 335-349.
- 8 C. BRAUD, C. VILLIERS ET M. VERT, *Carbohydr. Res.*, 86 (1980) 165-175.
- 9 J. R. HELBERT ET M. A. MARINI, *Biochemistry*, 2 (1963) 1101-1106.
- 10 J.-P. DUCLOS, *L'Héparine-Fabrication, Structure, Propriétés, Analyses*, Masson, Paris, 1984.
- 11 M. W. PIEPKORN, G. SCHMER ET D. LAGUNOFF, *Thromb. Res.*, 13 (1978) 1077-1087.
- 12 B. CASU ET U. GENNARO, *Carbohydr. Res.*, 39 (1975) 168-176.
- 13 R. E. HURST, J. M. MENTER, S. S. WEST, J. M. SETTINE ET E. H. COYNE, *Biochemistry*, 18 (1979) 4283-4287.
- 14 A. S. PERLIN, *Fed. Proc., Am. Soc. Exp. Biol.*, 36 (1977) 106-109.
- 15 B. CASU, P. ORESTE, G. TORRI, G. ZOPPETTI, J. CHOAY, J.-C. LORMEAU, M. PETITOU ET P. SINAY, *Biochem. J.*, 197 (1981) 599-609.

- 16 E. SACHE, M. MAILLARD, H. BERTRAND, M. MAMAN, M. KUNZ, J. CHOAY, J. FAREED ET H. MESSMORE, *Thromb. Res.*, 25 (1982) 443–458.
- 17 L.-A. FRANSSON, T. N. HUCKERBY ET I. A. NIEDUSZYNSKI, *Biochem. J.*, 175 (1978) 299–309.
- 18 U. LINDAHL, G. BACKSTROM, L. THUNBERG ET I. G. LEDER, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77 (1980) 6551–6555.
- 19 R. D. ROSENBERG, G. ARMAND ET L. LAM, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75 (1978) 3065–3069.
- 20 M. MAUZAC, Thèse de Doctorat-ès-Sciences, Université de Paris, 1984.
- 21 L. C. SEDEREL, L. VAN DER DOES, T. BEUGELIN, J. VAN DUIJL ET A. BANTIFS, dans *Plastics in Medicine and Surgery*, Twente University of Technology, Enschede, Netherlands, 1979, pp. 351–358.
- 22 H. P. GREGOR, dans H. P. GREGOR (Ed.), *Biomedical Applications of Polymers*, Plenum Press, New York, 1975, pp. 51–56.
- 23 C. BRAUD ET M. VERT, *Macromolecules*, sous presse.
- 24 J. CHOAY, M. PETITOU, J.-C. LORMEAU, P. SINAY, B. CASU ET G. GATTI, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 116 (1983) 492–499.
- 25 B. NORDENMAN ET I. BJORK, *Biochim. Biophys. Acta*, 672 (1981) 227–238.
- 26 R. D. ROSENBERG ET P. S. DAMUS, *J. Biol. Chem.*, 248 (1973) 6490–6505.
- 27 T. E. PETERSEN, G. DUDEK-WOJCIECHOWSKA, L. SOTTRUP-JENSEN ET S. MAGNUSSEN, dans D. COLLEN, B. WIMAN ET M. VERSTRAETE (Eds.), *The Physiological Inhibitors of Coagulation and Fibrinolysis*, Elsevier, Amsterdam, 1979, pp. 43–54.
- 28 A. KATCHALSKY, N. SHAVIT ET H. EISENBERG, *J. Polym. Sci.*, 13 (1954) 69–84.
- 29 R. E. HURST, MAN-CHIU POON ET M. J. GRIFFITH, *J. Clin. Invest.*, 72 (1983) 1042–1045.
- 30 M. N. BLACKBURN, R. L. SMITH, J. CARSON ET C. C. SIBLEY, *J. Biol. Chem.*, 259 (1984) 939–941.
- 31 J. M. PECON ET M. N. BLACKBURN, *J. Biol. Chem.*, 259 (1984) 935–938.