Maastricht University

Le domaine Choay

Citation for published version (APA):

Hemker, H. C., Al Dieri, R., Wagenvoord, R., & Beguin, S. (2003). Le domaine Choay: La structure responsable de l'activité anticoagulante des héparines. *Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine*, *187*(1), 59-67. https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)34080-4

Document status and date:
Published: 14/01/2003

DOI:
10.1016/S0001-4079(19)34080-4

Document Version:
Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

• A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
• The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
• The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

• Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
• You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
• You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the “Taverne” license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 18 Apr. 2024

Bull. Acad. Natle Méd., 2003, *187*, n° 1, 59-67, séance du 14 janvier 2003

Le domaine Choay – la structure responsable de l'activité anticoagulante des héparines

The Choay domain – the structure responsible for the anticoagulant action of heparins

H. Coenraad HEMKER , Raed Al DIERI,
Rob WAGENVOORD, Suzette BÉGUIN

RÉSUMÉ

Nous démontrons qu'une seule et unique structure est nécessaire et suffisante pour conférer son pouvoir anticoagulant à toute héparine d'origine naturelle et, en conséquence, son action antithrombotique. Cette structure, identique à la molécule synthétisée par Maurice Petitou, augmente l'interaction thrombine – antithrombine plasmatique. Elle est constituée d'un pentasaccharide spécifique (domaine A ou : DA) auquel sont fixés douze unités saccharidiques (domaine T ou DT). Nous avons baptisé cette structure [DA+DT] « domaine Choay » (domaine C ou DC) en mémoire de Jean Choay, un des prestigieux chimistes de l'héparine.

MOTS-CLÉS : HÉPARINE. POLYOSIDES. THROMBINE. ANTITHROMBINE.

SUMMARY

We describe the common structural basis for the anticoagulant action of the many different heparins available to the clinician. From different types of heparin we prepared fractions of virtually single molecular weight. We determined the molar concentration of material (HAM) containing the antithrombin (AT) binding pentasaccharide (A-domain), the specific catalytic activity in thrombin- and factor Xa inactivation and the capacity to inhibit thrombin generation (TG). We also calculated the molar concentration of A-domain with 12 sugar units at its non-reducing end, i.e. the structure that carries anti-thrombin activity (Choay- or C-domain). The anti-thrombin activity and the effects on TG are determined by the concentration of C-domain and independent of the source material or Mr. High Mr

* Synapse bv, Cardiovascular Research Institute Maastricht, Medical Faculty, Universiteit, Maastricht, B.P 616-6200 MD Maastricht, Pays-Bas.

Tirés-à-part : Professeur H.C. HEMKER, à l'adresse ci-dessus.
Article reçu le 15 novembre 2002, accepté le 2 décembre 2002.

fractions (> 15.000) are less active, probably through interaction with non-AT plasma proteins. Anti-factor Xa activity is not indicative of anticoagulant potency but is a sensitive indicator of Mr and therefore predicts favourable pharmacokinetic properties : long half-life in the circulation and high bioavailability.

KEY-WORDS (Index Médicus) : HEPARIN. POLYSACCHARIDES. THROMBIN. ANTITHROMBINS.

INTRODUCTION

Dans sa quête de traitements anticoagulants efficaces, le clinicien est confronté à un grand nombre d'héparines diverses, proposées par l'industrie pharmaceutique [1]. Toutes sont des mélanges hétérogènes d'oligo— et polysaccharides [2]. Alors que les héparines classiques, non-fractionnées (HNF), sont comparables entre elles, les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) se distinguent par leur mode de préparation et en conséquence par leur structure chimique ainsi que par la distribution de leurs masses moléculaires (Mr). Il s'ensuit qu'elles diffèrent, non seulement par leurs propriétés pharmacodynamiques (leur capacité à inhiber la coagulation du sang), mais aussi par leurs propriétés pharmacocinétiques (demi-vie dans la circulation, biodisponibilité). La relation entre action pharmacologique et composition chimique est si compliquée que chaque HBPM est considérée, par les autorités législatives, comme un médicament différent [3]. Cependant le principe biochimique responsable de leur propriété d'accroître l'activité catalytique de l'antithrombine plasmatique, (AT) demeure le même.

A la recherche d'un dénominateur commun à l'action pharmacologique des héparines nous avons trouvé qu'il existe une seule et unique structure responsable du pouvoir anticoagulant de toute héparine d'origine naturelle et, en conséquence, de son action antithrombotique. Cette structure s'est avérée n'être autre que celle reproduite par Maurice Petitou [4], comportant des oligosaccharides de synthèse, assemblés de telle sorte qu'ils augmentent l'interaction thrombine – antithrombine plasmatiques. Cette structure est constituée d'un pentasaccharide spécifique (domaine A ou : DA) auquel sont fixées douze unités saccharidiques (domaine T ou DT). Le domaine T confère au domaine A en plus de son activité anti — facteur X activé (FXa) son activité antithrombine. Ainsi toute héparine possédant cette structure [DA + DT] d'au moins 17 monosaccharides, soit une masse moléculaire de ~ 5 400 daltons sera dotée d'un pouvoir anti-thrombine. Nous avons baptisé cette structure [DA+DT] « domaine Choay » (domaine C ou DC) en mémoire du prestigieux chimiste des héparines : Jean Choay [5].

A la recherche de la structure active des héparines nous avons fractionné l'HNF et quatre espèces d'HBPM en fragments de masse moléculaire bien déterminée. Pour chacune de ces fractions nous avons mesuré l'activité spécifique catalytique de l'inactivation de la thrombine et du facteur Xa ainsi que leur capacité à inhiber la génération de thrombine en milieu plasmatique.

Notre approche se distingue par le grand nombre de fractions étudiées, dont plusieurs présentent des masses moléculaires identiques bien que provenant de matériaux de base d'origine variée (HNF ou une ou plusieurs HBPM). De plus, dans un souci de rigueur (cinétique), nous nous sommes abstenus de comparer, selon l'usage en vigueur, leurs activités par rapport à un standard mais par leurs activités exprimées en nombre de molécules d'enzyme (thrombine ou facteur Xa) inactivées par molécule d'héparine par seconde [6].

MATÉRIELS ET MÉTHODES [1]

Les domaines A et C synthétiques nous ont été obligeamment fournis par Maurice Petitou (Sanofi-Synthélabo Recherche, Toulouse). Les héparines naturelles (tinzaparin, reviparin, nadroparin et enoxaparin), ont été fractionnées par filtration sur gel et les masses moléculaires, déterminées par HPSEC (high performance size exclusion chromatography). Les profils d'élution obtenus se sont avérés être aussi étroits que ceux des fractions de référence ne comportant qu'une seule masse moléculaire.

La teneur en matériel de haute affinité pour l'antithrombine, c'est-à-dire le nombre de domaines A (pentasaccharide), a été titrée par une technique de fluorescence basée sur l'augmentation de la fluorescence naturelle de l'antithrombine par l'addition progressive, jusqu'à saturation, des héparines à tester [8]. L'antithrombine de référence a été préalablement titrée par l'élévation de sa fluorescence initiale induite par une concentration connue de pentasaccharide.

En raison de la non spécificité des sucres contenus dans le domaine T, chimiquement indistincts des autres sucres composant la chaîne d'héparine, la teneur en domaine C n'a pu être obtenue que par calculs. Ces calculs sont basés sur l'hypothèse que la position du domaine A, au sein de chaque molécule de matériel de haute affinité pour l'antithrombine, est déterminée par le hasard. Ainsi comme on peut le voir dans la Figure 1, dans laquelle le domaine T (12 mono — saccharides) est arbitrairement représenté dans la partie gauche de la molécule, dans une population de molécules d'héparine naturelle de longueur de chaîne N ($Mr \sim N \times 320$) le domaine A (5 saccharides) peut se trouver à N-4 positions possibles, les 4 positions à gauche de la chaîne étant exclues. De même le domaine C (12 saccharides) peut se trouver à N-12 positions différentes. Ainsi de toutes les molécules de longueur N qui contiennent le domaine A, seule une fraction de (N-12)/(N-5) peut abriter le domaine C. Ainsi dans une fraction de masse déterminée peut on calculer la concentration de domaines C à partir de la concentration des domaines A.

En pratique ceci se traduit par une teneur en domaine C qui s'élève fortement dans la région de masse moléculaire située entre 5 000 et 10 000 daltons. La masse

1. Afin de ne pas alourdir le texte nous ne donnerons que l'essentiel de la préparation et caractérisation des héparines et nous demandons au lecteur de se reporter à la référence [7] pour plus de détails.

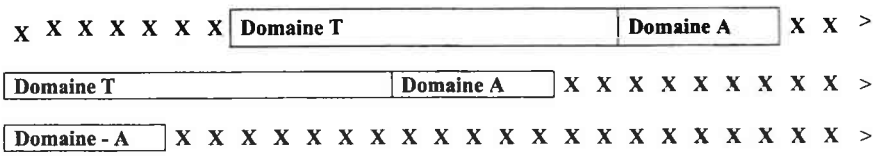

FIG. 1 — Représentation schématique des positions relatives des domaines actifs dans l'héparine.

Chaque rangée représente l'extrémité non-réductrice d'une chaîne d'héparine. X = un monosaccharide. DA (5 positions) et DT (12 positions) ont été représentés en encadrés. Rangée 1 : DT+DA situé au milieu de la chaîne : rangée 2 : position ultérieure possible des domaines T+A (=C) ; rangée 3 : position ultérieure possible du domaine A.

moléculaire d'un monosaccharide étant de 320 daltons une molécule de Mr 5 400 contient 17 monosaccharides. Il y a donc 12 positions possibles pour le DA, cependant il n'existe qu'une seule configuration [-DT (12 unités) — DA.] possible. Par conséquent, la concentration de DC est 1/12 du DA. Si l'héparine s'allonge d'un monosaccharide cette fraction sera de 2/13, etc.

Pour mesurer l'effet de l'héparine sur le mécanisme de la coagulation, les temps de coagulation sont de peu d'utilité. Le temps de Quick est insensible à toute héparine. Le temps de céphaline activée, largement utilisé en clinique, lors d'une large étude clinique, n'a révélé que dans 38 % des cas l'effet d'une injection d'héparine (9 000 unités) administrée à des volontaires sains (résultats non-publiés). La maxime selon laquelle le traitement par les HBPM ne nécessite pas de contrôle, occulte le fait qu'un tel contrôle est pour le moment impossible, faute de test valable. Le seul test capable de mesurer l'effet anticoagulant des héparines, ainsi que celui de tout autre médicament antithrombotique, est le test de génération de thrombine. Au sein de notre laboratoire nous en avons développé une version automatisée, basée sur l'enregistrement continu de l'augmentation de la densité optique induite par la conversion par la thrombine d'un substrat chromogénique ajouté au plasma coagulant [9] [2].

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Toutes les héparines, possédant les domaines A ou C, y compris celles sans effet sur les temps de coagulation, réduisent la génération de thrombine (Fig. 2). Comparé au pouvoir inhibiteur des DA et DC synthétiques celui de l'héparine non fractionnée se rapproche de celui du DC. Néanmoins les HBPM présentent une relation dose-effet quantitativement différente de celle du DC, tandis que l'activité spécifique inhibitrice liée au DA, est plus faible et sa relation effet-dose qualitativement différente, ce qui suggère un mécanisme d'action essentiellement différent. Lors d'études antérieures, notre groupe a démontré que pour toutes les héparines naturelles,

2. Voir : www.thrombin.com.

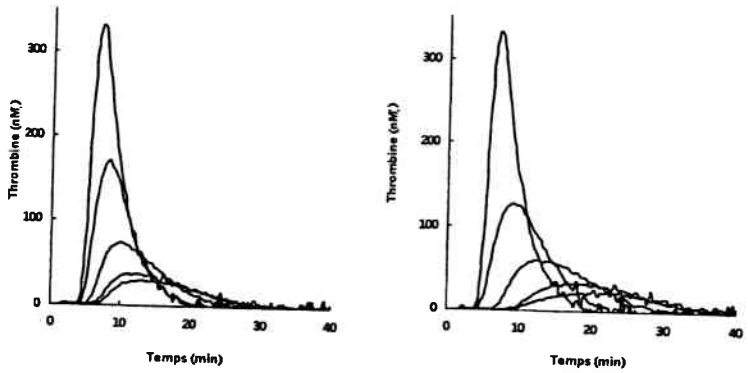

FIG. 2 — L'influence de l'héparine sur la génération de thrombine en plasma.

A gauche : Héparine non fractionnée (standard international).
Concentrations par ordre de hauteur de pic : 0, 0,02 ; 0,04, 0,06, 0,08 U/ml
A droite. Héparine de bas poids moléculaire (standard international)
Concentrations par ordre de hauteur de pic : 0, 0,03 ; 0,05, 0,08, 0,09 U/ml

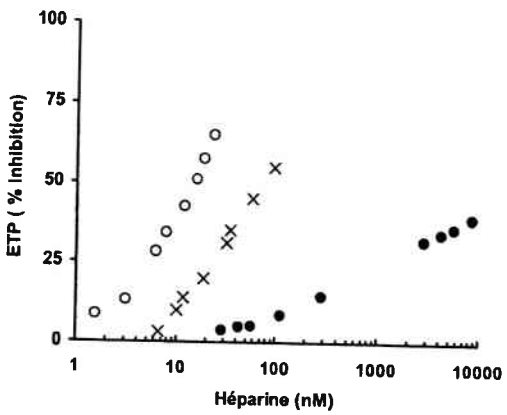

FIG. 3 — Relations dose-effet de l'héparine sur la génération de thrombine en plasma.

De gauche à droite : Domaine C synthétique ; Héparine de bas poids moléculaire commerciale ; Pentasaccharide synthétique.

fractionnées ou non (HBPM incluses), l'inhibition de la thrombine l'emporte en efficacité sur celle du facteur Xa. On peut également obtenir un effet pharmacologique adéquat en inhibant le facteur Xa par des pentasaccharides de synthèse [10]. Cependant cet effet est obtenu avec des doses d'unités anti-Xa qui sont dans l'ensemble plus élevées que celles obtenues avec les héparines naturelles. On en déduit que l'effet anti-Xa des héparines naturelles, fractionnées ou non, ne joue pas un rôle important.

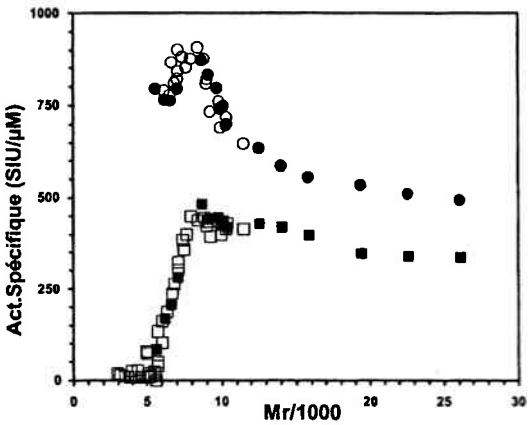

FIG. 4. — L'activité spécifique antithrombine de l'héparine en fonction de son poids moléculaire.

Carrés : Valeurs expérimentales, Noirs : fractions de l'héparine classique. Blancs : fractions de bas poids moléculaire.

Cercles : Valeurs calculées en fonction de molarité du domaine A : Noirs : fractions de l'héparine classique, Blancs ; fractions de bas poids moléculaire.

Entre 5 000 et 10 000 daltons, l'activité spécifique anti-thrombine d'une héparine, exprimée par concentration molaire d'héparine contenant le DA, varie fortement avec la masse moléculaire (Mr). Cette variation disparaît quand on exprime l'activité spécifique par mole d'héparine contenant le DC (Fig. 4).

On peut en déduire que le domaine Choay est la structure qui détermine l'activité antithrombine et que le restant de la molécule ne contribue en rien à cette activité. En fait, les molécules de haut poids moléculaire, par leur liaison électrostatique à des protéines plasmatiques, perdent de leur activité spécifique (résultats non présentés). Il apparaît donc que la présence d'un domaine Choay est la condition nécessaire et suffisante pour qu'une héparine de source naturelle acquière une activité antithrombine. La Figure 5 étaye cette conclusion : une grande variété de molécules, avec des Mr entre 5 000 et 10 000 et provenant de sources différentes se comporte essentiellement de manière identique en tant qu'inhibiteur de la génération de thrombine quand on exprime leur concentration en termes de domaine Choay.

De l'activité antithrombine à l'activité antithrombotique, il n'y a qu'un pas.

En effet tous les médicaments antithrombotiques inhibent la génération de la thrombine.

Tout en agissant selon des mécanismes fondamentalement différents les antagonistes de la vitamine K (anticoagulation orale) et l'héparine sont l'un et l'autre tout aussi efficaces. Certaines substances bien que conçues initialement comme des antagonistes plaquettaires diminuent aussi la génération de la thrombine en plasma

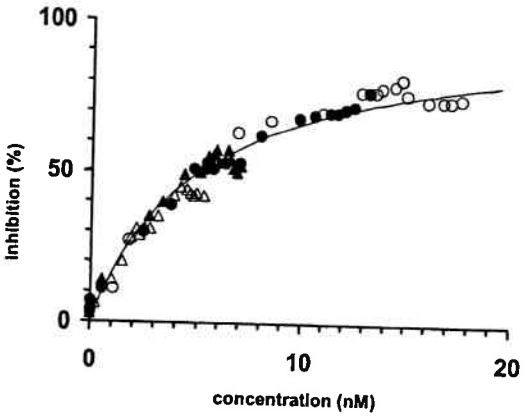

FIG. 5 — Inhibition de la génération de thrombine en plasma en fonction de concentration du domaine C. Chaque point représente l'inhibition obtenue avec une fraction de poids moléculaire unique.

riche en plaquettes [11] ! On peut donc admettre qu'une héparine doit sa capacité antithrombotique à sa faculté de diminuer la quantité de thrombine formée en plasma coagulant [voir aussi 12]. On démontre ici que, pour les héparines naturelles, leur pouvoir anticoagulant est davantage lié à leur capacité à inactiver la thrombine (aIIa) naissante plutôt qu'à leur capacité à inhiber sa formation, par l'inhibition de la conversion de la prothrombine (aXa). Seul le pentasaccharide synthétique doit son activité antithrombotique exclusivement à son pouvoir anti-Xa.

On en conclut qu'exprimer les doses d'héparine naturelle à administrer au patient, en « unités anti-Xa » ou en mg est moins rationnel que de les exprimer en « unités anti-thrombine ». Ainsi cela faciliterait la comparaison des héparines (HNF et HBPM) entre elles.

Il apparaît donc clairement que, pour la pratique clinique, le mécanisme d'action d'un anticoagulant importe peu. Il est beaucoup plus important qu'une anticoagulation stable soit obtenue. Plus le poids moléculaire d'une héparine est bas (entre Mr 5 000 et 25 000) plus grandes sont sa demi-vie dans la circulation et sa biodisponibilité et en conséquence plus stable est l'anticoagulation obtenue. Notons que l'activité relative aXa (comparée à une héparine standard) s'accroît quand le poids moléculaire baisse. Ainsi l'activité aXa, bien que sans importance pour le mécanisme d'action, révèle t-elle les héparines ayant des propriétés pharmacologiques favorables.

L'importance cruciale de l'inhibition de la génération de la thrombine pour la thérapeutique de la thrombose et la réponse constante du test de génération de thrombine à l'action des héparines de quelque nature que ce soit et indépendamment de leur mode d'action nous ont incités à développer un test de génération de thrombine. Ce test complètement automatisé (Thrombogramme) pouvant être

exécuté en grand nombre (de l'ordre de 100 par heure) en routine hospitalière pourrait constituer un outil important pour le diagnostique de la thrombose et pour la surveillance de son traitement.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Hirsh J. — Overview of low molecular weight heparins and heparinoids : basic and clinical aspects. *Aust N Z J Med.*, 1992, *22*, (5), 487-95.

[2] Petitou M. — De l'héparine aux oligosaccharides antithrombotiques de synthèse. *Bull. Acad. Natle Méd.*, 2003, *187*, n° 1.

[3] Fareed J., Jeske W., Hoppensteadt D., Clarizio R., Walenga JM. — Are the available low-molecular-weight heparin preparations the same ? *Semin Thromb Hemost*, 1996, *22* (Suppl 1), 77-91.

[4] Petitou M., Herault J.P., Bernat A. et *al.* — Synthesis of thrombin-inhibiting heparin mimetics without side effects. *Nature*, 1999, *398* (6726), 417-22.

[5] Choay J., Petitou M., Lormeau J.C., Sinay P., Casu B., Gatti G. — Structure-activity relationship in heparin : a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983, *116*, (2), 492-9.

[6] Hemker H.C., Béguin S. — Standard and method independent units for heparin anticoagulant activities. *Thromb Haemost*, 1993, *70* (5), 724-8.

[7] Al Dieri R., Wagenvoord R., Van Dedem G.W.K., Béguin S., Hemker H.C. — The Inhibition of Blood Coagulation by Heparins of Different Molecular Weight is Caused by a Common Functional Motif – the C-Domain. *J. Thromb Haemost*, 2003, *1* (5).

[8] Einarsson R., Andersson L.O. — Binding of heparin to human antithrombin III as studied by measurements of tryptophan fluorescence. *Biochim Biophys Acta*, 1977, *490* (1), 104-11.

[9] Hemker H.C., Wielders S., Kessels H., Béguin S. — Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost*, 1993, *70* (4), 617-24.

[10] Béguin S., Choay J., Hemker H.C. — The action of a synthetic pentasaccharide on thrombin generation in whole plasma. *Thromb Haemost.*, 1989, *61* (3), 397-401.

[11] Reverter J.C., Beguin S., Kessels H., Kumar R., Hemker H.C., Coller B.S. — Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and " clinical restenosis ". *J Clin Invest*, 1996, *98*, 863-74.

[12] Béguin S., Lindhout T., Hemker H.C. — The mode of action of heparin in plasma. *Thromb Haemost.*, 1988, *60* (3), 457-62.

DISCUSSION

M. Gabriel BLANCHER

Dispose-t-on actuellement d'un test facilement utilisable permettant de déceler les individus et les populations à risque en matière de thromboses artérielles et veineuses ?

Depuis peu nous disposons du Thrombogram. C'est un test de génération de thrombine qui peut être obtenu avec un débit de ~100 échantillons plasmatiques par heure ce qui

permet donc son utilisation en routine clinique. Les données obtenues dans des conditions diverses (hémophilies, utilisation de contraceptifs oraux, traitements antithrombotiques etc.) indiquent que le Thrombogram est capable de déceler toute forme d'hypo— et d'hyper— coagulabilité, congénitale ou acquise, et donc les tendances à la thrombose comme les tendances au saignement. Il permet aussi de surveiller les effets des médicaments administrés au patient dans un but préventif ou thérapeutique.