

L'héparine hier et aujourd'hui

Premier médicament anticoagulant prescrit, l'héparine possède cependant d'assez nombreux inconvénients, notamment parce que son action s'exerce sur plusieurs étapes de la coagulation. Des tentatives de purification de cette substance hétérogène ont permis d'aboutir à des fragments d'héparine de bas poids moléculaire dont les propriétés sont examinées dans cet article.

Pascale Molho

Interne des hôpitaux de Paris

Gérard Tobelem

Professeur d'hématologie, département d'angiohématologie et Inserm U 150.

Parler d'héparine au singulier n'est plus possible. L'héparine naturelle, telle qu'elle a été découverte en 1916 par MacLean et utilisée pour la première fois chez l'homme comme anticoagulant en 1936, est une substance extrêmement hétérogène. Des progrès ont d'abord été faits dans l'utilisation clinique de cette molécule. Dès les années soixante, l'introduction des faibles doses d'héparine dans la prophylaxie des thromboses veineuses profondes a permis de limiter les incidents hémorragiques [1]. Les recherches concernant la structure et les mécanismes d'action de cette molécule complexe ont été à l'origine de tentatives de purification [2]. C'est ainsi que les héparines de bas poids moléculaire (BPM) sont nées. Elles suscitent actuellement de grands espoirs thérapeutiques. Alors que les relations structure-activité sont aujourd'hui pratiquement établies, et le site de fixation de l'antithrombine III sur l'héparine identifié, de nouvelles voies de recherche ne cessent d'apparaître.

L'héparine est un médicament largement utilisé, et représente la première source de dépenses pharmaceutiques à l'assistance publique

(15 328 000 F en 1982). L'apparition sur le marché des héparines de BPM risque encore d'en élargir l'utilisation.

Structure générale et origine

Les héparines font partie du groupe des mucopolysaccharides ou glycosaminoglycane (héparine, héparane sulfate, chondroïtines sulfates, kératane sulfate). Ces mucopolysaccharides sont présents dans de nombreux tissus, et les héparines sont principalement extraites à partir d'intestin de porc ou de poumon de bœuf. L'étude de leur structure est rendue particulièrement difficile par leur hétérogénéité. Les différentes héparines contiennent toutes un mélange de chaînes polysaccharidiques de longueur variable, même lorsqu'elles ont été préalablement fractionnées. Ces chaînes polysaccharidiques sont constituées d'un enchaînement répétitif de glucosamine, d'acide glucuronique et d'acide iduronique (fig. 1). Les sucres portent des groupes sulfates et acétyles, qui confèrent aux héparines leur charge négative (ce sont des polyélectrolytes anioniques). Les groupes sulfates sont importants pour l'activité biologique [3].

RÉFÉRENCES

1. Kakkar VV, Spindler J, Flute PT, Corrigan T, Fossard DP, Crellin RQ. Efficacy of low doses of heparin in prevention of deep vein thrombosis after major surgery. *Lancet* 1972; ii : 101-6.
2. Choay J, Lormeau JC, Petitou M, et al. Anti Xa active heparin oligosaccharides. *Thromb Res* 1980; 18 : 573-8.
3. Jacques LB. Heparins Anionic Polyelectrolyte drugs. *Pharmacol Rev* 1980; 31 : 99-152.

ADRESSE

G.Tobelem : Hôpital Lariboisière, 2, rue Ambroise-Paré, 75010 Paris.

RÉFÉRENCES

4. Aiach M, Michaud A, Balian JL, Lefevre M, Woler M, Fourtillan J. A new low molecular weight heparin derivative. In vitro and in vivo studies. *Thromb Res* 1983; 31 : 611-21.
5. Vairel EG, Bouty-Boye H, Toulemonde F, Doutremepuich C. Rôle de l'activité fibrinolytique indirecte des héparines et des composés voisins dans la prophylaxie des thromboses. *Ann Pharm Fr* 1983; 41 : 339-53.
6. Vairel EG, Bouty-Boye H, Toulemonde F, Doutremepuich C, Marsh NA, Gaffney PJ. Heparin and a low molecular weight fraction enhance thrombolysis and by this pathway exercises a protective effect against thrombosis. *Thromb Res* 1983; 30 : 219-24.
7. Choay J, Petitou M, Lormeau JC, Sinay P, Casu B, Gatti G. Structure-activity relationship in heparin: a synthetic polysaccharide with high affinity for AT III and eliciting antifactor Xa activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 116 : 492-9.
8. McBlain WA, Shyamala G. Heparin-mediated inactivation and transformation of mammary cytoplasmic glucocorticoid receptor. *J. Steroid Biochem* 1984; 20 : 1211-20.
9. Holmer E, Mattisson C, Nilsson S. Anticoagulant and antithrombotic effects of heparin and low molecular weight heparin fragments in rabbits. *Thromb Res* 1982; 25 : 475-85.
10. Holmer E, Kurachi K, Söderström G. The molecular weight dependence of the rate enhancing effect of heparin on the inhibition of thrombin, Factor Xa, Factor IXa, Factor XIa, Factor XIIa and kallikrein by antithrombin. *Biochem J* 1981; 193 : 395-400.
11. Danielson A, Bjork I. Binding to antithrombin of heparin fractions with different molecular weights. *Biochem J* 1981; 193 : 427-33.
12. Barrowcliffe TW, Merton RE, Havercroft SJ, Thunberg L, Lindahl U, Thomas DP. Low affinity heparin potentiates the action of high affinity heparin oligosaccharides. *Thromb Res* 1984; 34 : 125-33.
13. Merton RE, Thomas DP, Havercroft SJ, Barrowcliffe TW, Lindahl U. High and low affinity heparin compared with unfractionated heparin as antithrombotic drugs. *Thromb Haemost* 1984; 51 : 254-6.
14. Hiebert LM, Jaques LB. The observation of heparin on the endothelium after injection. *Thromb Res* 1976; 8 : 195-204.
15. Barzu T, Molho P, Tobelem G, Petitou M, Caen J. Binding of heparin and low molecular weight heparin fragments to human vascular endothelial cells in culture. *Nouv Rev Fr Hematol* 1984; 26 : 243-7.

immunologiques sont connus. L'activité anticoagulante de l'héparine est complexe. D'emblée, il faut souligner qu'activités anticoagulante et antithrombotique ne sont pas synonymes [9]. L'activité anticoagulante est principalement AT III dépendante. L'héparine se complexe en l'activant avec l'AT III, principal inhibiteur physiologique de la coagulation.

L'AT III est une protéine de PM 60 000, d'origine hépatique, dont la concentration plasmatique est de 0,2 g/l. En l'absence d'héparine, l'AT III inhibe lentement la thrombine (facteur IIa), et le facteur Xa principalement, mais aussi les facteurs IXa, XIa, XIIa et la plasmine (fig. 2). En présence d'héparine, la réaction est nettement accélérée (fig. 3), et au lieu d'être maximale en 10 secondes, elle l'est en 1 seconde.

Par activité anticoagulante, on entend, en fait, l'activité antithrombinique (anti IIa) de l'héparine. L'héparine standard, non fractionnée possède une activité anti thrombinique égale à son activité anti Xa (rapport anti Xa/anti IIa = 1), contrairement aux héparines de BPM qui possèdent une activité anti thrombinique faible et une forte activité anti Xa (rapport anti Xa/anti IIa = 5 à 10). Holmer explique simplement cette dissociation entre activité IIa et activité anti Xa en fonction du poids moléculaire et de la longueur des chaînes [10]. Pour inhiber le facteur IIa, l'héparine aurait besoin à la fois de se fixer à l'AT III et au facteur IIa, alors que pour inhiber le facteur Xa, seule la fixation de l'héparine à l'AT III serait nécessaire (fig. 4). Les courtes chaînes polysaccharidiques des héparines de BPM ne pourraient donc inhiber que le facteur Xa. L'inhibition des facteurs IXa et XIa est de type IIa, alors que l'inhibition du facteur XIIa et de la kallikréine serait de type Xa. L'activité anticoagulante de l'héparine varie donc en fonction du PM indépendamment de l'affinité pour l'AT III [11]. En effet, dans l'héparine (standard ou de BPM), on peut séparer par chromatographie d'affinité sur colonne d'AT III une fraction de haute affinité pour l'AT III

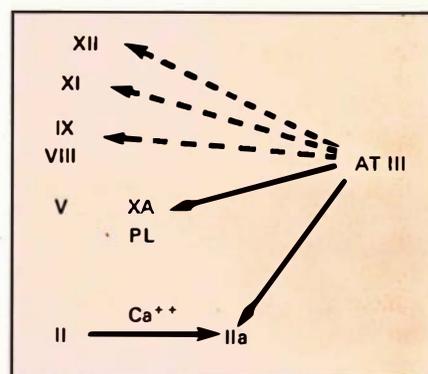


Figure 2. Cibles de l'AT III sur la cascade de la coagulation. L'AT III a un poids moléculaire de 65 000, sa concentration plasmatique est de 24 mg/100 ml. C'est le principal inhibiteur physiologique de la coagulation qui inhibe par formation d'un complexe, principalement les facteurs IIa et Xa et accessoirement les facteurs XII, XI, et IX. Le rôle de cet inhibiteur est souligné par la gravité des déficits constitutionnels en AT III, responsables de thromboses graves.

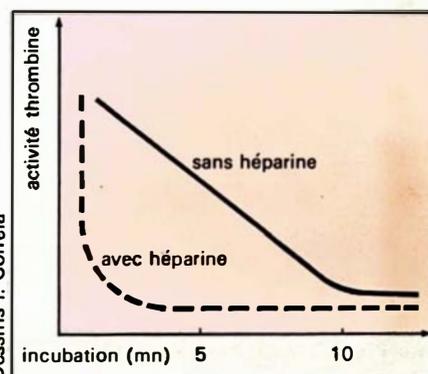


Figure 3. Activité anticoagulante de l'antithrombine III en présence d'héparine. L'héparine accélère la réaction d'inhibition du facteur IIa par la thrombine.

(environ un tiers de l'héparine) et une fraction de basse affinité (deux tiers de l'héparine). Ces deux fractions sont en fait nécessaires à l'activité anticoagulante et antithrombotique des héparines. Les fractions de basse affinité pour l'AT III ont même un effet potentiateur vis-à-vis des fractions de haute affinité [12, 13]. Le mécanisme anticoagulant AT III dépendant ne semble donc pas être le seul. Une activité anti Xa indépendante de l'AT III a été démontrée.

Des mécanismes d'action cellulaires contribuent à l'activité antithrombotique de l'héparine. Parmi ces effets cellulaires, l'interaction de l'héparine avec les cellules endothéliales vasculaires semble jouer un rôle important. Des études in vivo [14] ont montré que l'héparine se fixait et était incorporée dans les cellules endothéliales vasculaires après injection IV. In vitro, sur des cultures de cellules endothéliales de veine ombilicale, il a été démontré que l'héparine standard se fixait aux cellules endothéliales de façon spécifique et saturable [15, 16]. Nous avons pu démontrer [15] que les héparines de BPM se fixent aussi aux cellules endothéliales, mais avec une affinité plus faible que l'héparine standard. Une partie de l'héparine fixée est incorporée (internalisation) dans les cellules. Ce phénomène peut avoir des implications à la fois sur la pharmacocinétique des héparines et sur les fonctions anti thrombogéniques des cellules endothéliales. D'autres interactions cellulaires sont connues avec les hépatocytes chez le rat, les macrophages (internalisation de l'héparine, d'où participation à la clairance de l'héparine), les cellules sanguines et les plaquettes.

La préparation d'oligosaccharides à forte affinité pour l'AT III, si elle est intéressante, ne doit donc pas être le seul axe de recherche en matière de prophylaxie de la thrombose. Trois acteurs sont en fait importants : la paroi vasculaire (cellules endothéliales et sous endothélium), l'AT III, et les cellules sanguines (plaquettes surtout). Les interactions de l'héparine avec ces trois composants doivent être prises en compte dans la préparation des nouvelles héparines.

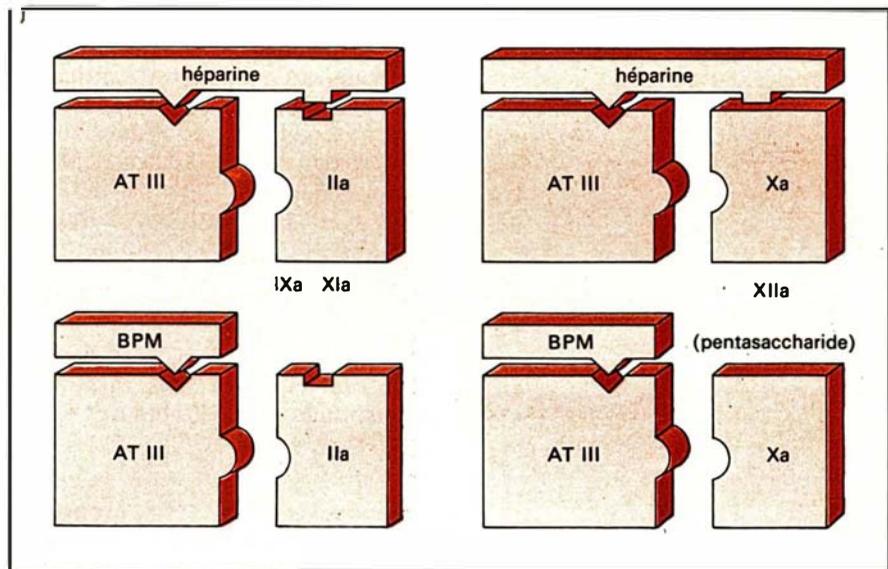


Figure 4. Théorie de Holmer. Pour inhiber le facteur IIa, l'héparine aurait besoin de se fixer à l'AT III d'une part et au facteur IIa d'autre part. Pour inhiber le facteur Xa, seule la fixation à l'AT III serait suffisante. Dans ces conditions les héparines de bas poids moléculaires (BPM) n'ont pas d'activité anti IIa mais conservent une activité anti Xa. La structure minimale de l'héparine nécessaire à sa fixation à l'AT III est un pentasaccharide.

La pharmacocinétique des héparines dépend de la dose administrée et de la voie d'administration. La cinétique de l'héparine standard injectée par voie veineuse a été étudiée par Dawes et Pepper [17] à l'aide d'une héparine marquée à l'iode-125.

■ Pharmacocinétique ■

Pour des doses faibles (1 à 100 U en une injection), 80 à 90 % de la radioactivité disparaît en 40 minutes. Pour des doses supérieures (1 000 U), 80 à 90 % de la radioactivité disparaît en 80 minutes. Dans ces deux cas, une deuxième pente apparaît, traduisant une recirculation du produit marqué. Pour des doses très fortes (5 000 U), on observe une seule pente.

Ces courbes traduisent un mécanisme de séquestration vasculaire de l'héparine, qui est saturé à dose forte. Le produit qui recircule secondairement a le même poids moléculaire que l'héparine de départ, mais il a perdu toute activité

biologique. Cette perte de l'activité biologique est due à la désulfatation de l'héparine (N-désulphamidase hépatique connue). L'héparine standard injectée par voie sous cutanée a une demi-vie plus longue, et trois injections sous cutanées par 24 heures sont nécessaires pour maintenir une activité anticoagulante et antithrombotique stable. La demi-vie plus longue des héparines de BPM représente un avantage certain en thérapeutique. Cette demi-vie a été évaluée comme étant de l'ordre de 6 heures, après administration sous-cutanée chez des volontaires sains, avec une décroissance lente (activité anti XA de 0,2 U/ml à 18 heures). Une seule injection sous cutanée par 24 heures assure donc théoriquement une activité antithrombotique suffisante [4]. De plus, on a démontré récemment que les héparines de BPM ne traversent pas la barrière placentaire.

On constate aujourd'hui que l'activité antithrombotique des héparines n'est pas strictement corrélée à leur

RÉFÉRENCES

16. Glimelius B, Bush CH, Höök M. Binding of heparin on the surface of cultured human endothelial cells. *Thromb Res* 1978; 12 : 773-82.
17. Dawes J, Pepper DS. Catabolism of low-dose heparin in man. *Thromb Res* 1979; 14 : 845-60.
18. Kakkar VV, Djazaeri B, Fox J, Flechter M, Scully MF, Westwick J. Low molecular weight heparin and prevention of post operative deep vein thrombosis. *Br Med J* 1982; 284 : 375-9.
19. Molho P, Dunn F, Barzu T *et al.* Enhancement of fibrinolysis by a low molecular weight heparin in patients with thrombo-embolism and defective response to venous occlusion. *Progress in fibrinolysis* 1985; VII (in press).
20. Cade JF, Buchanan MR, Boneu B *et al.* A comparison of the antithrombotic and hemorrhagic effects of low molecular weight heparin fractions: the influence of the method of preparation. *Thromb Res* 1984; 35 : 613-25.
21. Tobelem G, Michel H, de La Baume H, Brechot C, Degos L, Schaison G. Purpura thrombotique lors d'une héparinothérapie. *Nouv Presse Med* 1979; 8 : 3649-52.
22. Stead RB, Shaffer AI, Rosenberg RD, Handin RI, Josa M, Khuri SF. Heterogeneity of heparin lots associated with thrombocytopenia and thromboembolism. *Am J Med* 1984; 77 : 185-8.
23. Kelton JJ, Sheridan D, Brain H, Powers PJ, Turpie AG, Carter CJ. Clinical usefulness of testing for a heparin dependent platelet aggregating factor in patients with suspected heparin associated thrombocytopenia. *J Lab Clin Med* 1984; 103 : 606-12.
24. Dunn F, Soria J, Soria C, Thomaidis A, Tobelem G, Caen JP. Fibrinogen binding on human platelets. Influence of different heparins and of pentosan polysulfate. *Thromb Res* 1983; 29 : 141-8.
25. Dourempeuich CH, Toulemonde F, Kuttler MC *et al.* Administration orale d'héparine et de fractions d'héparine de bas poids moléculaire chez le lapin. *Thérapie* 1984; 39 : 147-52.
26. Rosenberg RD, Fritze LMS, Castellot JJ, Karnovsky MJ. Heparin like molecules as regulators of atherogenesis. *Nouv. Rev Fr Hematol* 1984; 26 : 255-60.

activité anticoagulante [9, 13]. Les héparines de BPM, pratiquement dépourvues d'activité anticoagulante, mais ayant une activité anti X a élevée, ont une activité antithrombotique équivalente à celle de l'héparine standard. Cette activité antithrombotique a été démontrée chez l'animal [6, 10], et chez l'homme dans la prophylaxie des thromboses veineuses postopératoires [18]. L'utilisation des héparines de BPM dans le traitement des thromboses constituées chez l'homme en est encore à ses débuts.

Activité antithrombotique

Parmi les mécanismes pouvant rendre compte de l'activité antithrombotique anticoagulante indépendante, l'interaction des héparines avec la paroi vasculaire semble être au premier plan. L'héparine standard se fixe et elle est en partie incorporée par les cellules endothéliales vasculaires. Pour les héparines de BPM, une fixation spécifique a également été démontrée. Parmi les conséquences de cette fixation sur les fonctions antithrombogéniques de l'endothélium, trois paraissent véritablement essentielles : l'effet sur la synthèse et/ou la libération de l'activateur tissulaire du plasminogène (ou t-PA); l'effet sur la synthèse et/ou la libération des métabolites de la prostacycline (6 ceto PG F 1); les interactions avec la thrombine fixée à l'endothélium. L'effet sur la libération de t-PA serait intéressant, car des études in vivo ont montré que l'héparine et les héparines de BPM possédaient un effet profibrinolytique [5, 6]. Cet effet profibrinolytique serait particulièrement intéressant chez les malades ayant des maladies thromboemboliques récidivantes, associées à un défaut de réponse à la vénostase (défaut de libération de t-PA par l'endothélium vasculaire lors d'un test de stase veineuse). Dans une étude préliminaire, nous avons pu évaluer cet effet [19]. Ainsi, bien qu'utilisés depuis longtemps, les mécanismes d'action de l'héparine ne sont-ils pas encore tout à fait bien élucidés.

Les deux complications majeures de l'héparinothérapie sont les accidents hémorragiques et les thrombopénies avec ou sans thrombose.

Complications

Les complications hémorragiques sont bien connues dans le cas de l'utilisation de l'héparine standard à dose conventionnelle et semblent être en rapport avec l'activité anticoagulante (activité anti-facteur II a). Ces complications sont réduites ou absentes pour l'héparine standard utilisée à faible dose (selon le schéma de Kakkar) qui conserve seulement un effet antifacteur X a [1]. De même pour les héparines de BPM qui ont un rapport activité anti X a/anti II a élevé, les complications hémorragiques semblent réduites. Certains auteurs [20] rapportent les complications hémorragiques non seulement à l'effet anticoagulant, mais aussi à un effet inhibiteur sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène. L'héparine standard inhiberait plus l'agrégation plaquettaire induite par le collagène que les héparines de BPM.

Les thrombopénies à l'héparine semblent voir leur fréquence augmenter, mais sont en réalité plus fréquemment retrouvées en raison de la pratique systématique de numérations plaquettaires en cours de traitement. Leur fréquence varie selon les séries, de 0,1 à 20% des traitements hépariniques [21]. Il semble en fait que la fréquence varie selon les lots d'héparine [22], et qu'il existe deux formes de thrombopénie.

Une forme sévère, rare, survenant entre le septième et le quatorzième jour du traitement, accompagnée de phénomènes hémorragiques et surtout thrombotiques majeurs (thromboses veineuses et artérielles). Le mécanisme en serait immunoallergique. Un anticorps dirigé contre le complexe héparine-plaquettes entraînerait une agrégation plaquettaire intravasculaire (à l'origine des thromboses) et, parfois, une coagulation intravasculaire disséminée. Une autre hypothèse serait que l'anticorps anti-héparine soit toxique pour l'endothélium vasculaire (réactivité croisée avec les héparanes sul-

fates de la membrane des cellules endothéliales vasculaires), entraînant l'apparition d'une activité procoagulante (de type thromboplastine tissulaire) et donc de thromboses artérielles et veineuses. La mise en évidence de ce facteur agrégant en présence d'héparine, de sérum du malade, et de plaquettes d'un sujet témoin est utile au diagnostic, mais n'est pas constante. Ce test peut être négatif dans des formes sévères de thrombopénie, et à l'inverse être positif chez des sujets non thrombopéniques traités par héparine, voire même des sujets témoins. La sensibilité et la spécificité de ce test sont donc encore à améliorer [23]. La mortalité de ces formes de thrombopénie est importante, de l'ordre de 20 à 30 %, surtout lorsque l'héparine n'est pas rapidement arrêtée.

L'autre forme est modérée, plus fréquente, et plus précoce (entre le deuxième et le cinquième jour du traitement héparinique). Elle ne s'accompagne pas de manifestations hémorragiques ni thrombotiques, et n'impose habituellement pas l'arrêt de l'héparinothérapie. Le mécanisme de cette forme de thrombopénie modérée n'est pas très bien connu. En présence d'héparine standard, une augmentation de la liaison du fibrinogène aux plaquettes, normalement induite par l'ADP, a été démontrée [24]. Cette liaison accrue de fibrinogène aux plaquettes pourrait entraîner la formation de microagrégats plaquet-taires dans la circulation, et donc une thrombopénie modérée par consommation.

Dans ces deux types de thrombopénie, l'intérêt de l'utilisation d'héparine de BPM est actuellement en cours d'étude. Dans certains cas de thrombopénie sévère, le remplacement de l'héparine standard par une héparine de BPM a permis la remontée des plaquettes. Cependant, dans certains cas, des tests d'agrégation positifs ont été trouvés avec des héparines de BPM, suggérant une réactivité croisée entre héparine standard et héparine de BPM. Une certaine prudence s'impose donc avant d'affirmer que les héparines de BPM éviteront les thrombopénies à l'héparine.

Dans le cas des thrombopénies

modérées à l'héparine, il a été montré que les héparines de BPM, contrairement à l'héparine standard, n'entraînaient pas d'augmentation de la fixation du fibrinogène aux plaquettes en présence d'ADP [24].

Voies de recherche

La recherche fondamentale concernant les mécanismes d'action des héparines a pour but l'amélioration de leur utilisation clinique. L'un des premiers domaines d'application concerne la voie d'administration. Pour la prophylaxie des thromboses, le produit idéal devrait pouvoir être administré par voie orale. Des dérivés d'héparine sont actuellement testés par voie orale chez l'animal [25].

La préparation de fractions purifiées d'héparine tel le pentasaccharide (séquence minimale gardant l'affinité pour l'AT III et l'activité anti X a) permettrait d'éliminer certains effets secondaires de l'héparine non fractionnée. Cependant, ces oligosaccharides auront perdu d'autres propriétés intéressantes de l'héparine de départ.

La connaissance précise des interactions héparine-endothélium permet d'envisager la synthèse d'analogues d'héparine à haute affinité pour l'endothélium et à faible activité anticoagulante. Ainsi, en faisant varier le poids moléculaire, le degré de sulfatation, l'affinité pour l'AT III, les plaquettes, l'endothélium, de nombreux dérivés et analogues d'héparine peuvent être obtenus. Ces produits ne seront plus des héparines au sens strict du terme.

D'autres utilisations possibles de l'héparine ne sont encore que des hypothèses de recherche. Les effets de l'héparine sur la prolifération des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales sont en cours d'étude. L'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses par l'héparine laisse entrevoir une application possible à la prévention de l'athérosclérose [26]. Les interactions héparine-facteurs de croissance auraient ici un rôle important. On est donc loin, en 1985, de la molécule naturelle découverte par MacLean en 1916 ■

Summary

Heparin is undergoing a transformation. As the first anticoagulant ever prescribed, it had certain drawbacks which led to attempts to purify this heterogeneous substance, resulting in fractions and fragments of heparin of low molecular weight (LMW: BPM in French). The mechanisms by which heparin acts are complex. The anticoagulant (antithrombinic) action is primarily antithrombin III-dependent, but the antithrombotic action does not depend entirely on the anticoagulant action. LMW heparins with a weak anticoagulant action have an antithrombotic potency equal to that of standard heparin. The interactions of the heparins with the vascular endothelium seem to contribute to their antithrombotic action.

Heparin hemorrhages and thrombocytopenia represent the major complications of heparin therapy. The use of LMW heparins could limit these complications. These LMW heparins are not yet used in standard therapy. Their longer half-life in comparison with standard heparin is one of their advantages. The research on heparins is not yet finished. The preparation of derivatives which have a more selective action on certain coagulant factors and on the vascular endothelium, and which can be given by mouth, is only one of the aspects of current research. The effects of heparins on the proliferation of smooth muscle cells and endothelial cells could lead to applications in the prevention of certain vascular diseases, such as atherosclerosis.

TIRÉS A PART

G. Tobelem : Hôpital Lariboisière, 2, rue Ambroise-Paré, 75010 Paris.