

Autour de l'héparine

L'héparine est un polysaccharide sulfaté qui possède des propriétés antithrombiques et anticoagulantes. Cette molécule fait partie de la famille des glycosaminoglycanes.

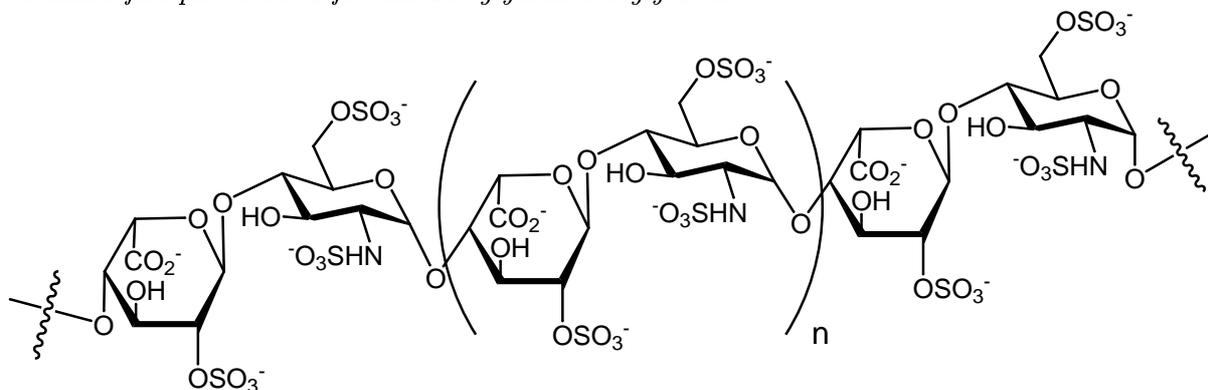


Figure 1 : structure de l'héparine

Depuis plusieurs années, les traitements anticoagulants sont utilisés dans de nombreuses affections cardiovasculaires. Les limites du traitement conventionnel par l'héparine extraite de la muqueuse intestinale de porc (et purifiée bien entendu...) ont motivé la recherche sur les héparines de faible masse moléculaire.

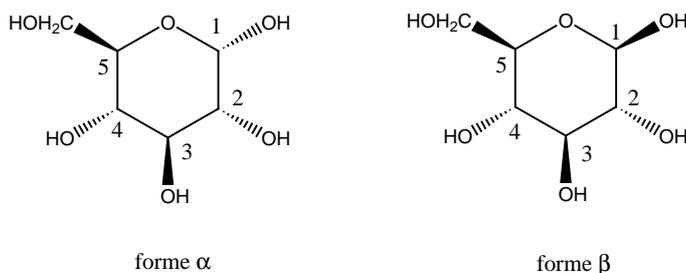
Nous allons nous intéresser dans ce sujet à l'étude de l'héparine, et à la synthèse d'analogue d'héparine de faible masse moléculaire. Nous étudierons successivement les fragments qui constituent l'héparine, les phénomènes de reconnaissance enzyme-substrat, d'inhibition et de catalyse.

De nombreuses questions sont totalement indépendantes. Les différentes parties peuvent être traitées dans n'importe quel ordre, une fois admis certains résultats des questions précédentes.

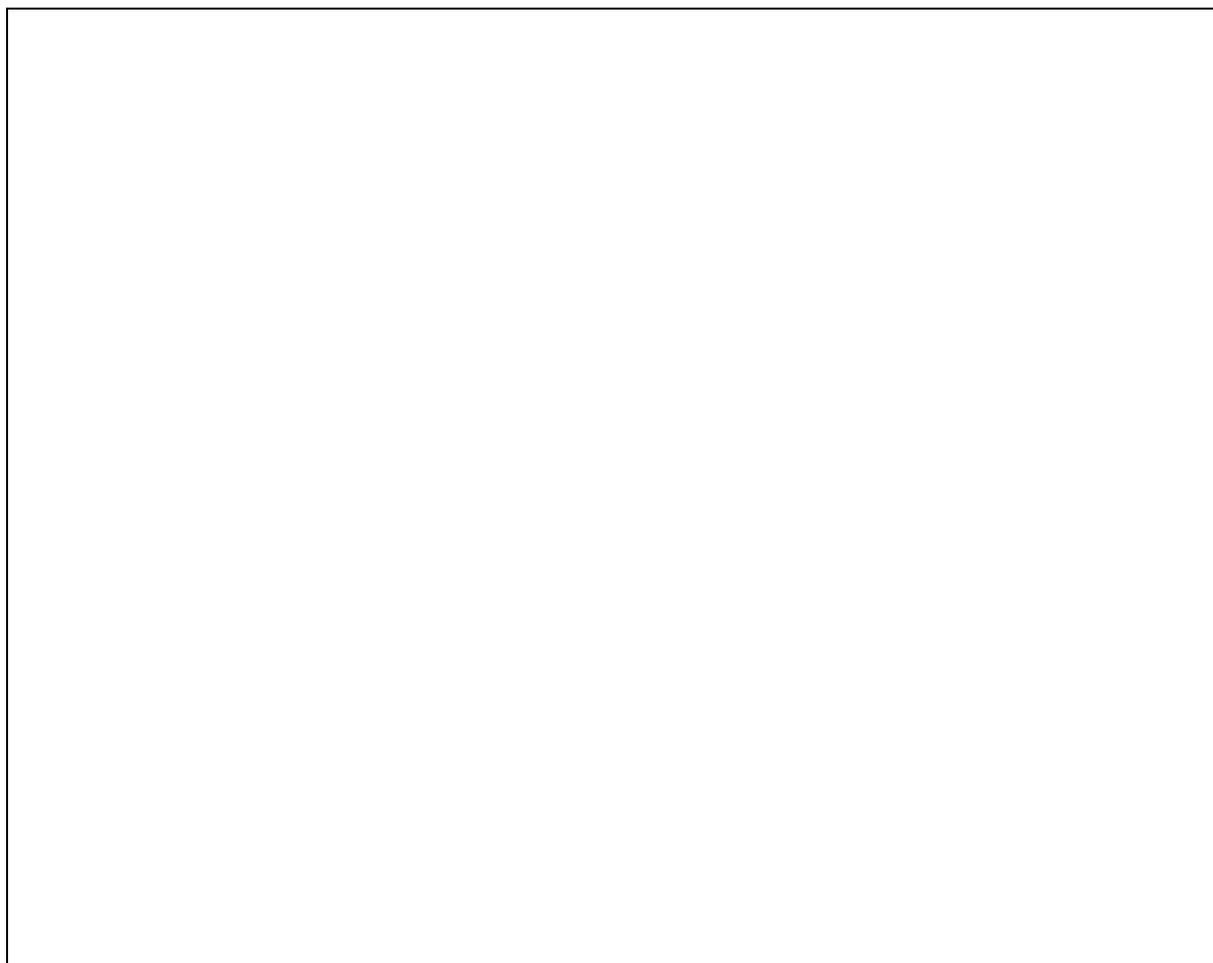
1 Reconnaissance de l'héparine par l'antithrombine III

1.1 Préliminaires

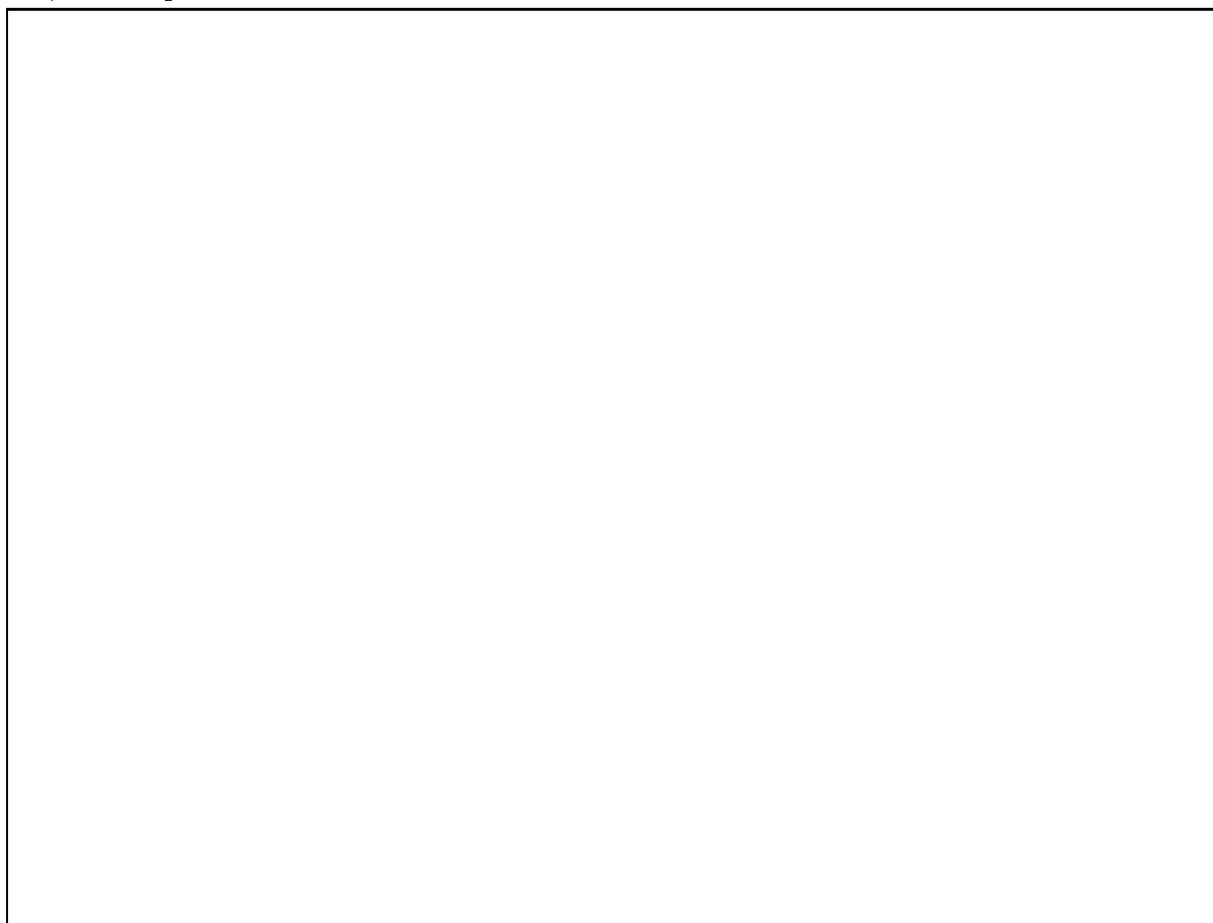
Nous allons dans un premier temps étudier le glucose qui est l'élément constitutif de l'héparine. Le D-glucose peut exister sous deux formes (anomères), la forme α et la forme β :



- Indiquer en les justifiant les configurations absolues des carbones asymétriques 1 et 3 de la forme α .



2. En étudiant les différents conformères possibles pour les deux formes, déduire quelle forme α ou β est la plus stable ?



3. On dissout de l' α -D-glucose dans de l'eau **acidifiée**. Après un certain temps s'établit un équilibre entre les formes α et β . Le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]$ de ce mélange est $[\alpha] = 52,5^\circ \text{ mL g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

(a) Quelles espèces sont optiquement actives ?

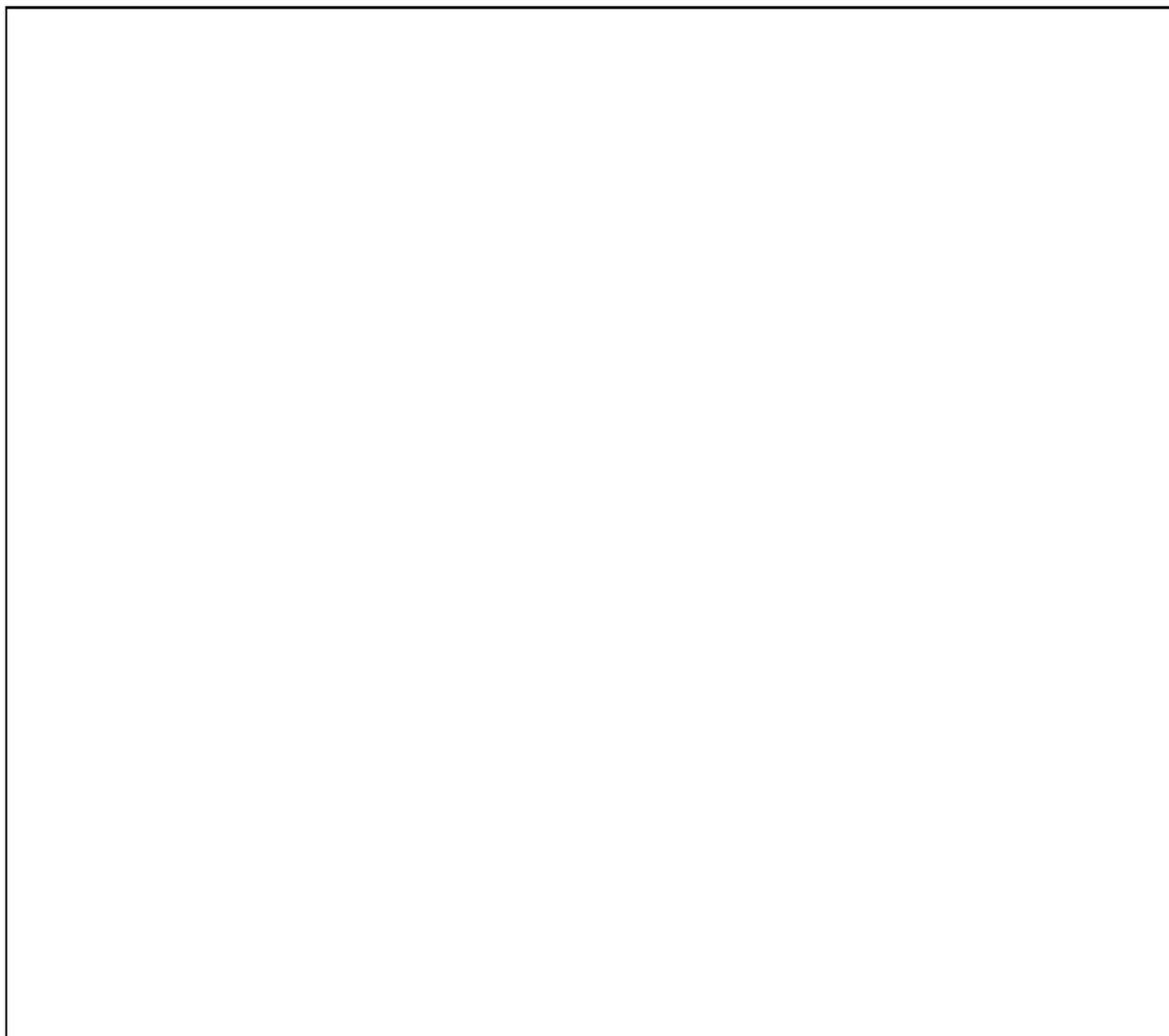
(b) Comment a-t'on mesuré $[\alpha]_\alpha$? De quoi dépend-il ?

(c) Pourquoi n'a-t'on pas $[\alpha]_\alpha = -[\alpha]_\beta$?

(d) Calculer les valeurs des proportions à l'équilibre des formes α et β .

Données : $[\alpha]_\beta = 18,7^\circ \text{ mL.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et $[\alpha]_\alpha = 112^\circ \text{ mL.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

- (e) Proposer un mécanisme permettant d'expliquer la formation de la forme β à partir de la forme α . (on observera que les deux molécules sont des héli-acétals)



1.2 Étude conformationnelle

Le polysaccharide possède, en plus de cette zone régulière (figure 1), des régions irrégulières (figure 2) provenant de l'action incomplète d'enzymes lors de la biosynthèse. Ces régions qui se découpent en 5 unités D, E, F, G et H sont responsables des activités biologiques comme l'activité anticoagulante.

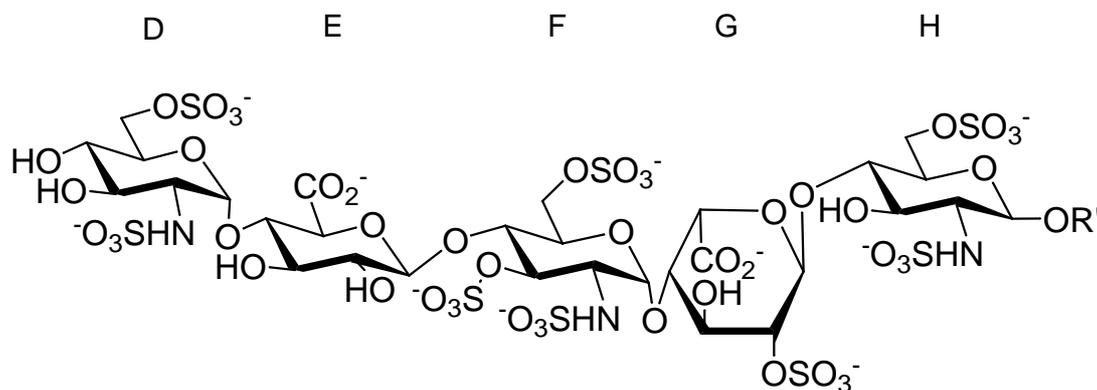
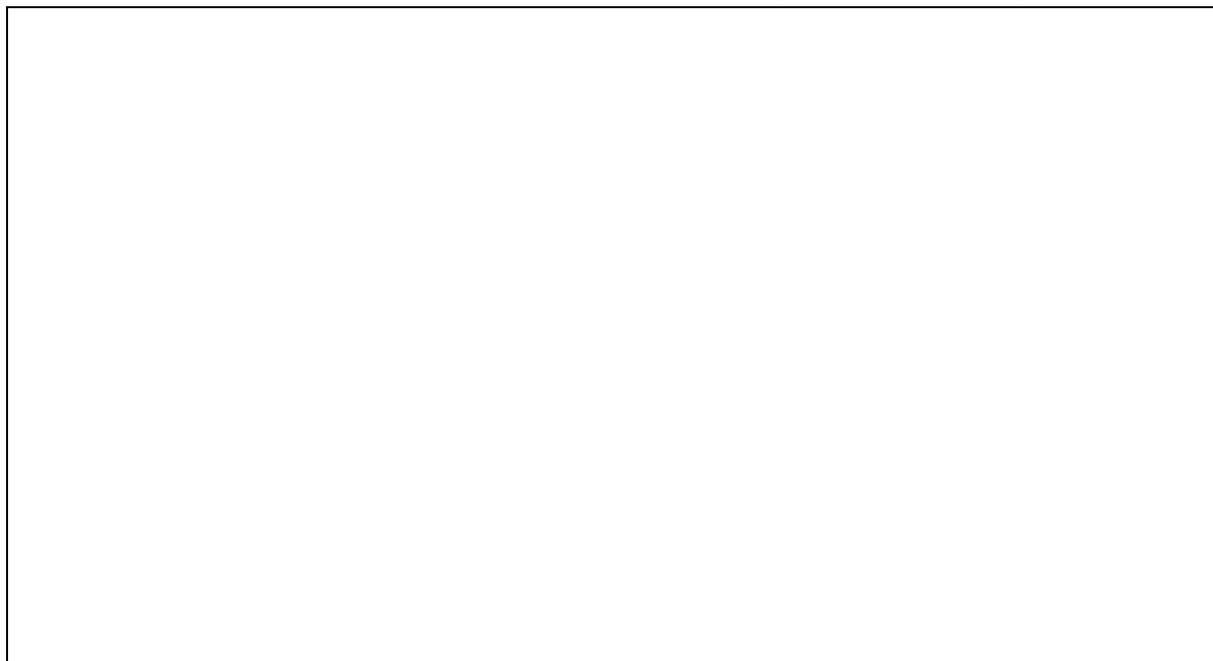


figure 2 : zone irrégulière de l'héparine

1.2.1 Étude énergétique

1. Représenter les deux conformères classiques du cyclohexane. Les placer dans un diagramme d'énergie en fonction de la coordonnée réactionnelle, en justifiant votre réponse.



2. En fait, on peut montrer qu'il existe d'autres conformations. Ces conformations sont les suivantes :



enveloppe



bateau croisé

Comment le diagramme précédent doit-il être modifié pour introduire ces deux nouvelles formes ? Justifier votre réponse.



1.2.2 Étude à l'aide de la Résonance Magnétique Nucléaire

La structure cristalline du complexe héparine-antithrombine III, a permis de montrer que pour que l'interaction entre l'héparine et l'antithrombine ait lieu, l'unité G (figure 2) devait être dans une conformation spéciale.

Les différentes conformations possibles de l'unité G de l'héparine (représentées sur la figure 3) peuvent être identifiées à l'aide de la résonance magnétique nucléaire (RMN) via la mesure des constantes de couplage ${}^3J_{\text{HH}}$.

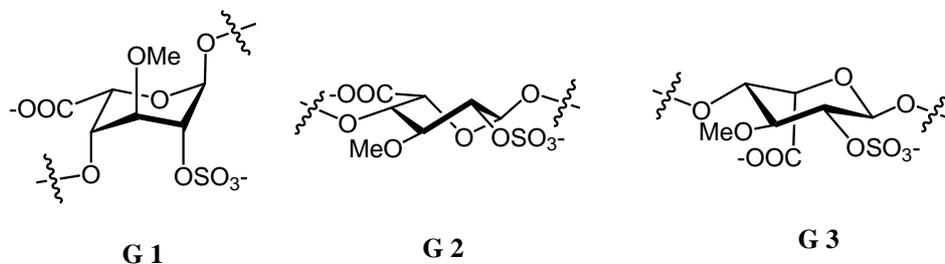
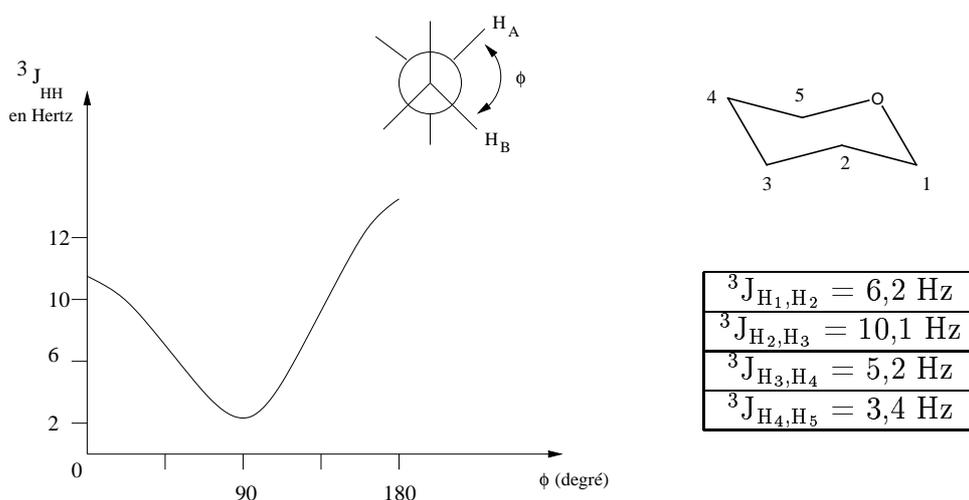


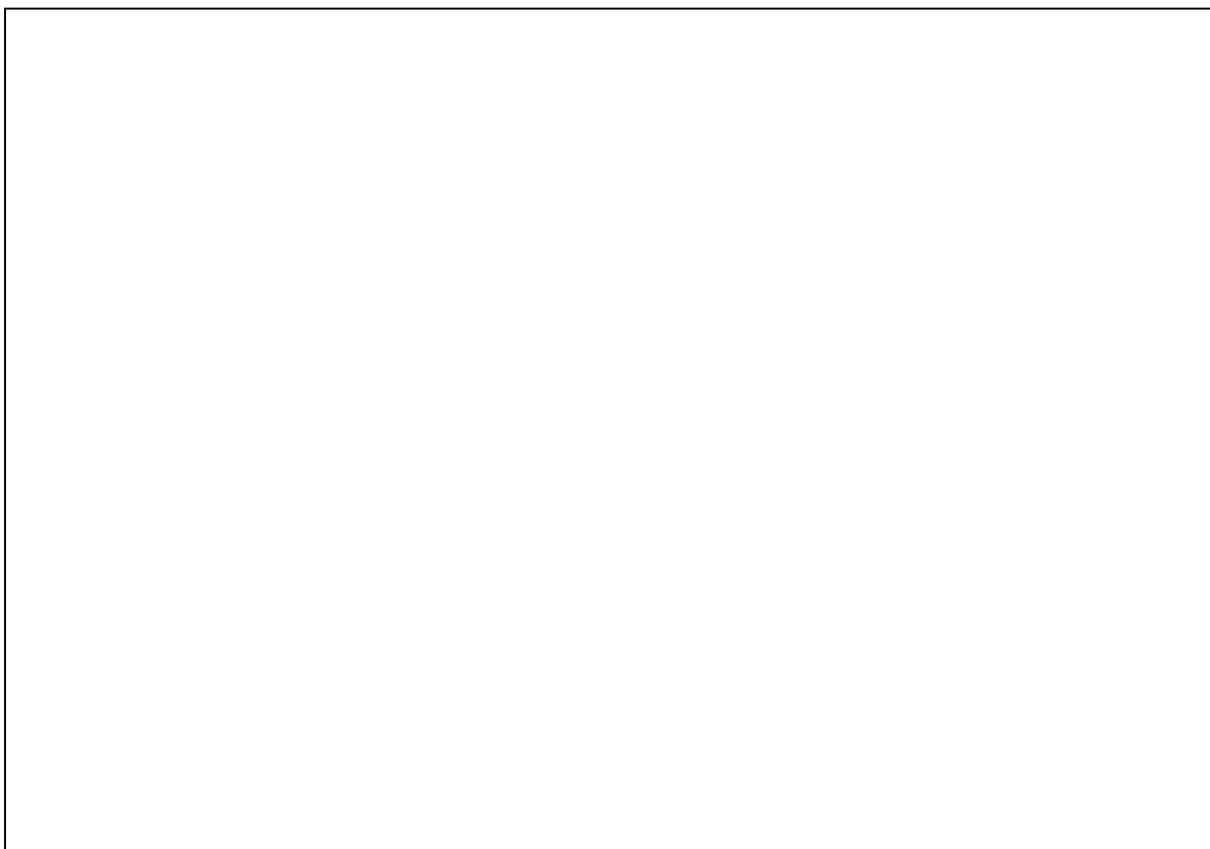
figure 3 : conformations possibles de l'unité G



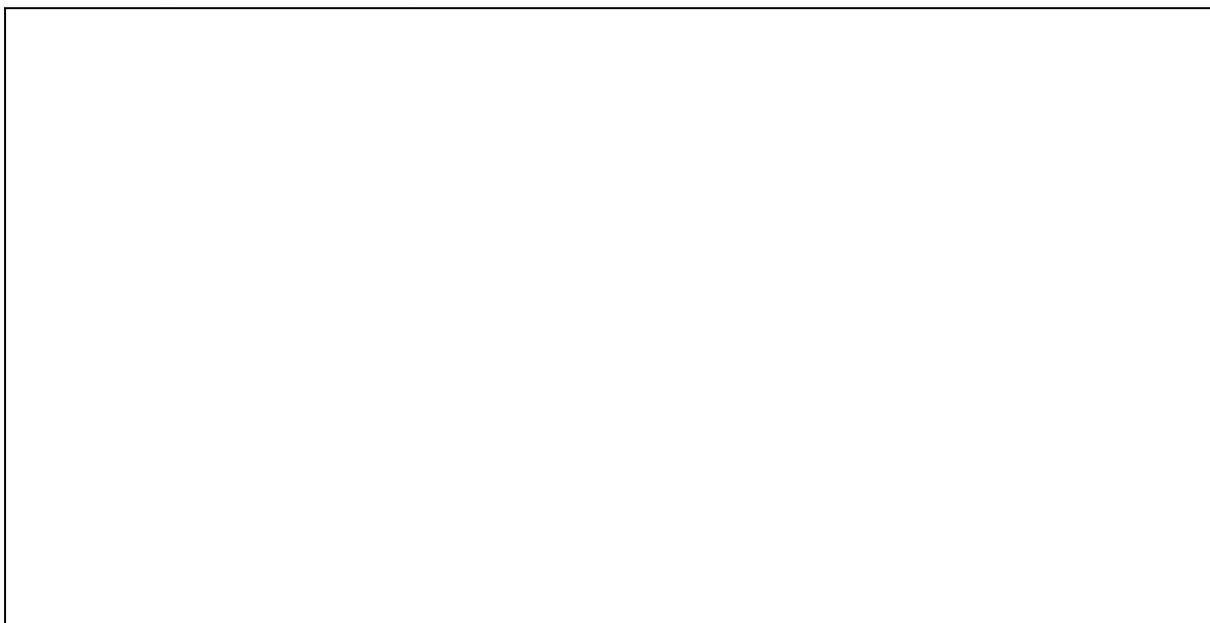
On précise que H_i correspond au proton lié au carbone i , que les constantes de couplage (tableau précédent) sont obtenues de manière expérimentale, tandis que la construction de la courbe repose sur un modèle théorique simplifié.

1. Expliquer à quoi correspond ${}^3J_{\text{HH}}$.

2. Confronter les résultats de la RMN avec les différentes conformations possibles. Identifier la conformation correspondante.



3. Le résultat précédent était-il prévisible ?



4. Pourquoi utilise-t-on la RMN pour étudier les différentes conformations présentes dans l'héparine alors que l'on a accès à la structure cristallographique ?



2 Applications

Nous avons vu quelle était la conformation des saccharides qui permettait la fixation de l'héparine sur l'antithrombine III. Nous allons maintenant nous intéresser aux applications de l'étude précédente.

2.1 Synthèse d'un analogue de l'héparine

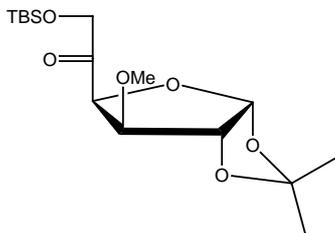
Afin de montrer que l'une des unités de l'héparine change de conformation pour faciliter sa fixation à l'antithrombine III, on réalise la synthèse d'un analogue de l'héparine dans lequel on a bloqué l'unité G dans la conformation précédemment déterminée.

La synthèse est réalisée à partir du composé **A** suivant :



Le groupe TBS représente le groupe $-\text{Si}(\text{Me})_2\text{tBu}$. C'est un groupe protecteur des alcools dont la déprotection a lieu notamment en milieu **acide aqueux**.

Le composé **A** est mis en présence de propanone et d'acide paratoluène sulfonique dans le toluène, à une température de 25 °C. On obtient après purification le composé **B** de formule :



- (a) Donner le mécanisme de formation de **B**.

- (b) Souvent, pour réaliser la transformation $\mathbf{A} \rightarrow \mathbf{B}$, on utilise un montage de DEAN-STARK. Quels en sont le principe et l'intérêt ?

- (c) Dans la pratique, on utilise du 2,2-diméthoxypropane à la place de l'acétone. Expliquer pourquoi ?



Le composé **B** est alors traité par le bromure d'éthénylmagnésium ($\text{H}_2\text{C}=\text{CHMgBr}$) dans le THF à $0\text{ }^\circ\text{C}$. Après hydrolyse contrôlée, on obtient un mélange de deux composés **C**₁ et **C**₂ de formule brute $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{Si}$, **C**₁ étant majoritaire.

2. (a) Donner la structure de ces deux composés. Justifier la formation d'un mélange de deux produits.



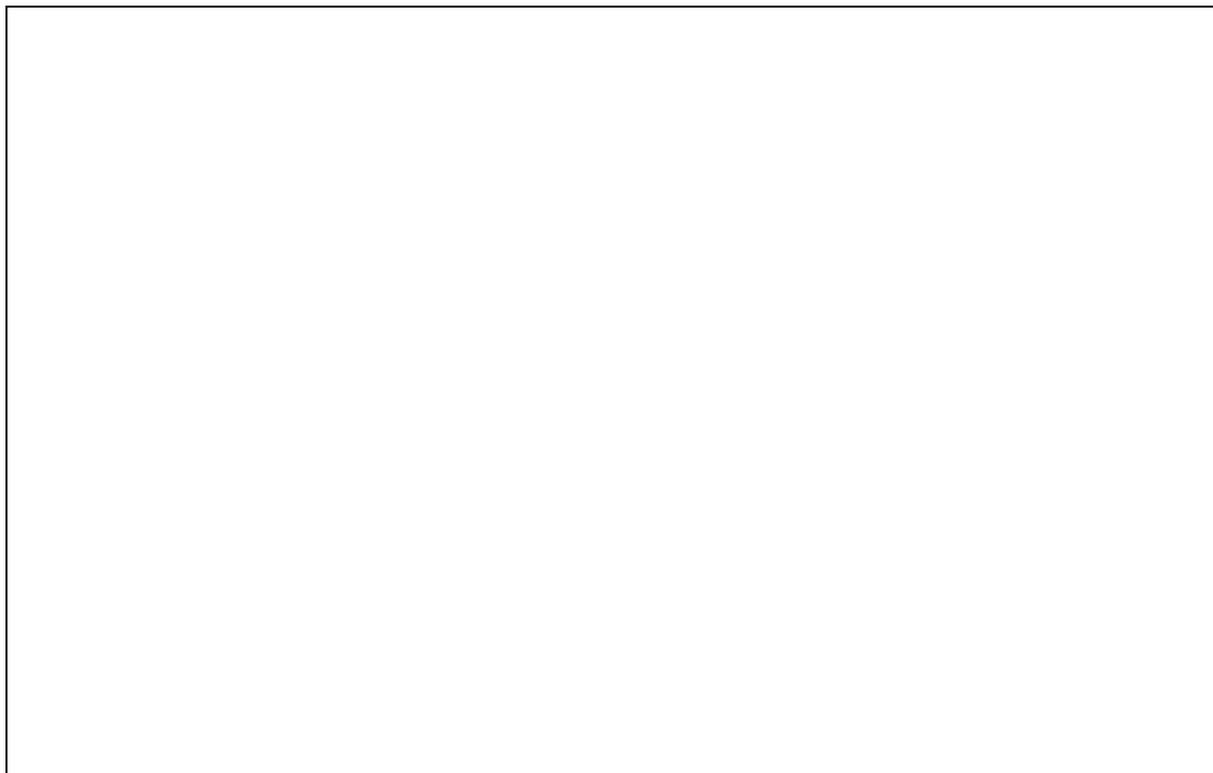
- (b) Quel relation stéréochimique lie les composés **C**₁ et **C**₂?



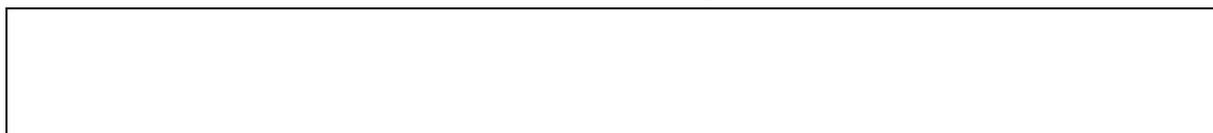
- (c) Expliquer l'intérêt de l'étape **A** → **B**.



- (d) Préciser les conditions de préparation d'un organomagnésien (montage, solvant utilisé...).



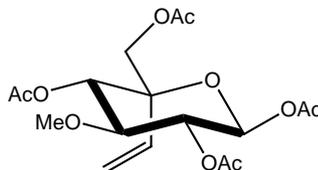
(e) Quelles nouvelles bandes apparaissent en infra-rouge ?



Le composé **C**₁ est dissous dans 100 mL de dioxane. La solution obtenue est diluée avec de l'eau. On additionne une résine échangeuse d'ions, sous forme acide (solide) et la suspension est maintenue sous agitation magnétique à 85 °C pendant 16 heures. Le mélange est filtré et le solvant évaporé. On isole le composé **D** de formule brute C₉H₁₆O₆ (cycle à 6 atomes).

Remarque : lors de la synthèse de **D**, on forme intermédiairement un composé **D**₁ (cycle à 5 atomes) qui par un mécanisme analogue à celui de la question 1.1.4 (e) permet de former le composé **D**.

On dissout le composé obtenu dans de la pyridine anhydre, à laquelle est ajoutée de l'anhydride éthanoïque. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 20 heures. Après traitement et purification on obtient le produit **E** suivant (le groupe acétate -OAc correspond au groupe -OCOCH₃) :



3. (a) Donner la structure de **D**₁ et de **D** en précisant le mécanisme de leur formations.

(b) Quel est l'intérêt de la filtration ?

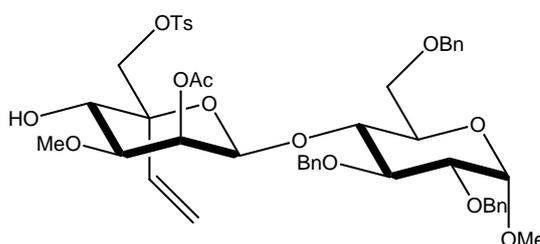
(c) À partir de la formule de **E**, identifier **C**₁ et préciser la configuration absolue du carbone asymétrique formé à la question 2.1.2.



- (d) Préciser le mécanisme de formation de **E** (on ne détaillera qu'une des réactions). Quel est le rôle de la pyridine ?



E subit ensuite une succession de transformations pour donner le composé **F** suivant :

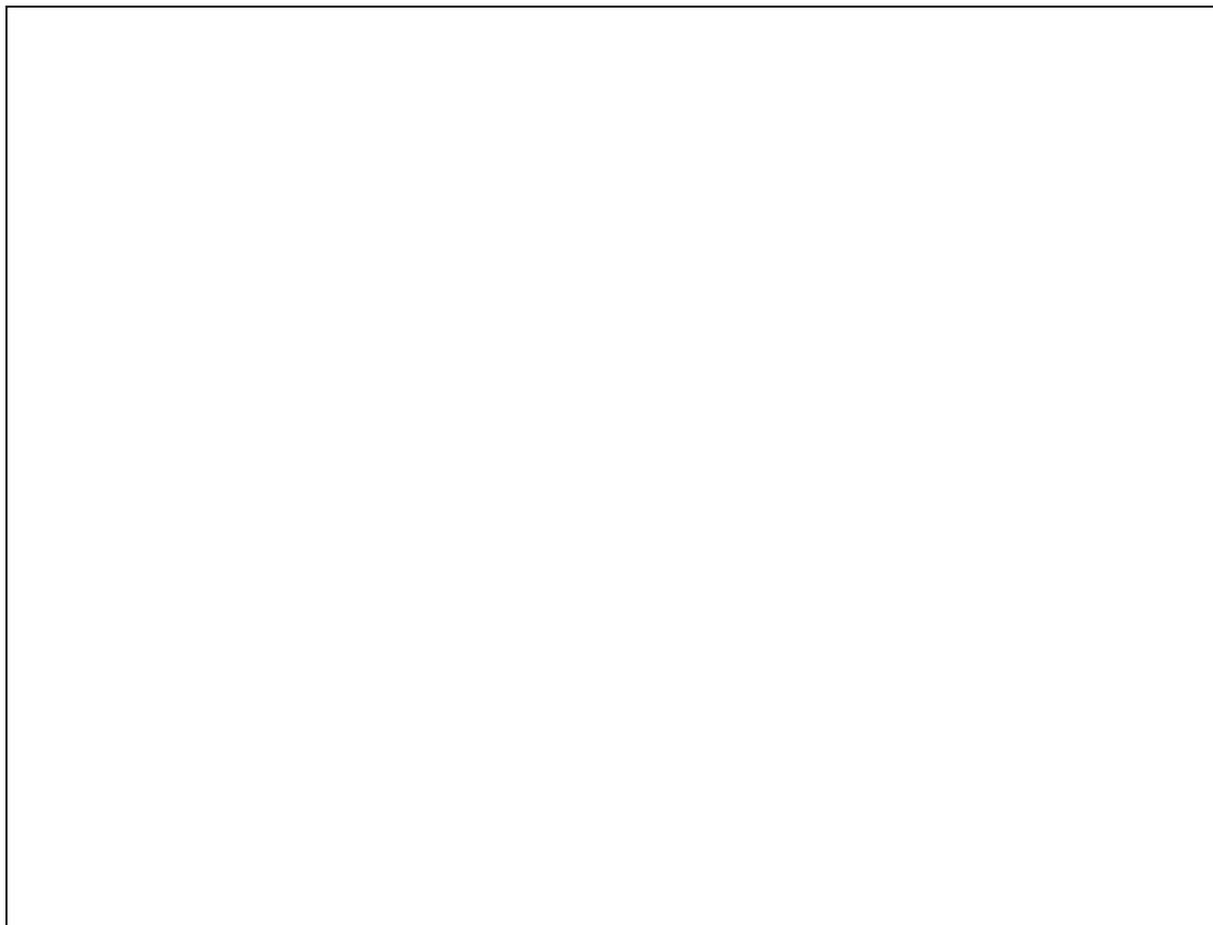


Le groupe benzyle -Bn correspond au groupe $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$, c'est un groupe protecteur des alcools dont la déprotection a lieu en présence de dihydrogène et d'un catalyseur métallique tel que le palladium (il n'intervient pas dans la synthèse). Le groupe tosyloxy -Ts correspond quant à lui au groupe $-\text{O}_2\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$.

F est mis en présence d'hydroxyde de sodium dans l'éthanol. Le mélange est chauffé à 80°C pendant 3 heures. On obtient après traitement et purification le composé **G**.

Spectre IR de **G** : disparition d'une bande à 1700 cm^{-1} .

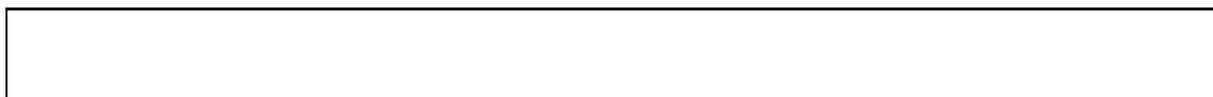
4. (a) Donner la structure de **G** et le mécanisme de sa formation.



(b) Comment s'appelle le groupe caractéristique formé dans **G** ?



(c) Indiquer à quel groupe caractéristique est dû le pic à 1700 cm^{-1} .



(d) Expliquer l'intérêt du groupe tosyle(-Ts) ?



G est traité par l'ozone à -78°C pour donner après traitement oxydant et purification **H**.
Spectre IR de **H** : bande très large entre 3500 cm^{-1} et 2500 cm^{-1} .

5. (a) Quelle est la structure de **H**.

(b) Donner la structure de Lewis de l'ozone.

(c) Quel groupe caractéristique a réagi par traitement avec l'ozone? Quel test permettrait de le prouver?

(d) Quel groupe caractéristique est responsable de la bande large d'absorption entre 2500 cm^{-1} et 3500 cm^{-1} ?

On ajoute ensuite **H** à une solution qui contient BnBr, KHCO₃ et Bu₄NI dans le *N,N*-diméthylformamide, solvant polaire non protogène. On isole le composé **I**.

6. (a) Représenter le composé **I**.



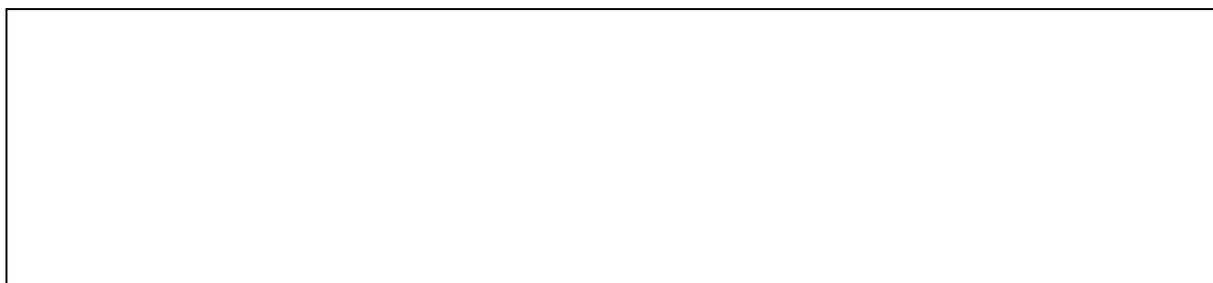
- (b) Quel est le rôle de KHCO₃ ? le rôle de Bu₄NI ?



- (c) Préciser le mécanisme de formation de **I**.



- (d) Expliquer la chimiosélectivité de cette réaction.



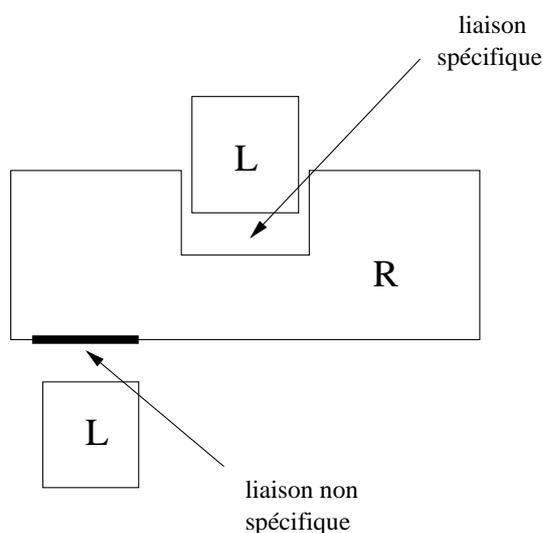
Le composé final **I** sera finalement mis en jeu dans une successions d'étapes pour permettre la formation d'un analogue structural de l'héparine pour lequel la conformation de l'unité G est fixée.

2.2 Étude de la fixation de l'héparine sur l'antithrombine III

Nous souhaitons étudier l'affinité de l'héparine pour l'antithrombine III. Pour cela nous nous proposons de calculer la constante d'affinité de l'héparine (noté L comme Ligand) sur le récepteur de l'antithrombine III (noté R comme Récepteur).

La méthode générale pour réaliser ce calcul est la suivante :

- On mélange l'héparine (portant un substituant radioactif comme le tritium ^3H) et l'antithrombine III. Après équilibre, il faut séparer l'héparine libre (qui sera appelée radioligand¹) du complexe héparine-antithrombine III (noté RL). Ceci est réalisé, soit par centrifugation, soit par filtration. Le filtre qui retient RL est rincé et placé pour comptage dans une fiole.
- Le problème est que dans ce type d'expérience, la liaison mesurée correspond à la liaison spécifique (ie le ligand se fixe sur son récepteur) mais aussi à des liaisons non spécifiques (ie le ligand se fixe sur des récepteurs autres pour lesquels il ne présente que très peu d'affinité, et présents en quantité **illimitée**).



Donc, si dans des tubes d'incubation, on a le radioligand fixé sur son récepteur, du radioligand fixé sur des récepteurs non spécifiques et le radioligand libre, la filtration sur filtre va permettre l'élimination du ligand libre et, durant les deux lavages rapides du filtre, ce sont les liaisons les moins fortes énergétiquement qui vont se dissocier en premier et on observera majoritairement la liaison spécifique.

Pour déterminer le rapport liaison spécifique RL / liaison non spécifique qui reste, malgré les problèmes liés à la technique décrite ci dessus, on opère comme suit :

- On place dans deux tubes une même quantité de récepteurs. Dans le premier tube, on ajoute une quantité donnée de radioligands et dans le second on ajoute la même quantité de radioligands mais on ajoute en plus du ligand non radioactif (de concentration 1000 fois supérieure à celle du ligand radioactif).
1. Comment à partir de ces expériences peut-on en déduire la quantité de liaisons RL spécifiques ? (on supposera qu'après les différents lavages on a, pour les deux expériences la même quantité de ligands qui reste fixée sur les sites non spécifiques)

¹un radioligand est une molécule radioactive capable de se fixer à un site (ex : récepteur, enzyme). On mesure la radioactivité de ces ligands par comptage (désintégrations par minute).

2. On définit pour le site spécifique l'équilibre $RL \rightleftharpoons R + L$ de constante K_d (inverse de la constante d'affinité).

- (a) Traduire la condition d'équilibre par une relation, entre les concentrations en récepteur total $[R]_t$, en $[L]$ et $[RL]$ et la constante d'équilibre de l'équation de réaction précédente. (pour les solutés, on assimilera l'activité a_i du soluté (i) au rapport de sa concentration molaire à la concentration de référence $C^\circ=1 \text{ mol/L}$)

- (b) En déduire une représentation graphique qui permet de déterminer la constante de dissociation K_d ainsi que $[R]_t$.

- (c) *Application* : Calculer dans le cas de l'héparine $K_d C^\circ$ en dpm (désintégrations par minute).



nombre total de dpm associé à la quantité de L libre	nombre total de dpm associé à la liaison RL spécifique
2195	373
5230	802
13960	1600
25187	2200
56736	3000
83450	3200
114860	3600

Données : L'activité spécifique de l'héparine tritiée est 65 Ci/mmol avec 1 Ci = $2,2 \cdot 10^{12}$ dpm.

2.3 Étude des caractéristiques (IC_{50} , K_I) du déplacement de l'héparine à l'aide d'analogues structuraux

L'affinité de ligands non radioactifs pour le récepteur de l'héparine, peut être appréciée en quantifiant leur pouvoir de déplacement de l'héparine radioactive (figure 4).

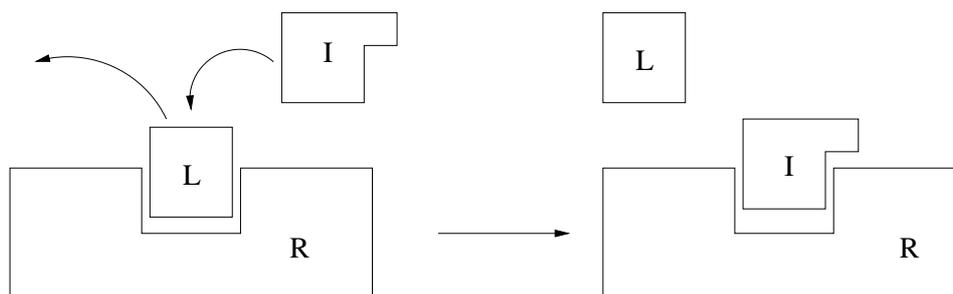
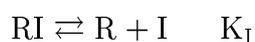
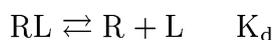


figure 4

Les ligands que nous allons étudier ici sont des analogues structuraux de l'héparine (noté I). Nous allons donc prendre en considération les deux réactions suivantes :



On définit IC_{50} comme étant la concentration de I pour laquelle la valeur de la liaison spécifique [RL] est réduite de moitié par rapport à la valeur de la liaison spécifique [RL] en l'absence de ligand I.

1. Exprimer la concentration en récepteur en fonction des constantes d'équilibres, des concentrations en ligand, en analogue et de la concentration totale en récepteur.

2. En déduire la relation qui lie K_I à IC_{50} .

3. Relier qualitativement l'affinité et l' IC_{50} .

4. À partir de la figure 5, calculer la valeur de l' IC_{50} pour chaque I, conclure.

5. En déduire la valeur de K_I (on prendra $K_d C^o = 7,5 \cdot 10^{-10}$ mol/L).

6. Quel problème peut poser cet analogue ignoré, jusqu'ici ?

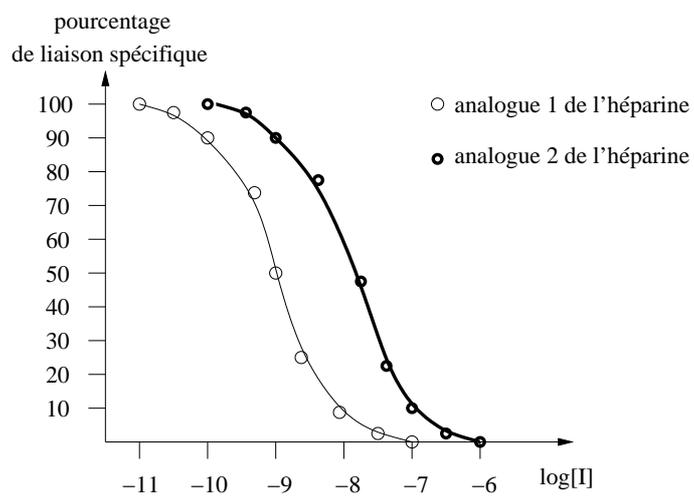


figure 5 : pourcentage de liaison spécifique pour $[L]=0,7 \cdot 10^{-9}$ mol/L

3 Étude de l'inhibition des enzymes

3.1 Généralités

Les enzymes sont des substances protéiques qui agissent comme catalyseur dans la régulation de la vitesse de nombreuses réactions impliquées dans le métabolisme des organismes vivants. L'anti-thrombine III complexée par l'héparine inhibe l'enzyme responsable de la coagulation sanguine.

Dans le cas général, les réactions enzymatiques sont modélisées de la manière suivante :



dans laquelle E correspond à l'enzyme, S au substrat et P aux produits de la réaction.

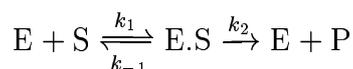
1. Donner les principales caractéristiques d'un catalyseur.

2. Représenter sur un même schéma, le profil réactionnel de la réaction non catalysée et le profil de celle dont on a donné l'équation générale.

3.2 Étude cinétique

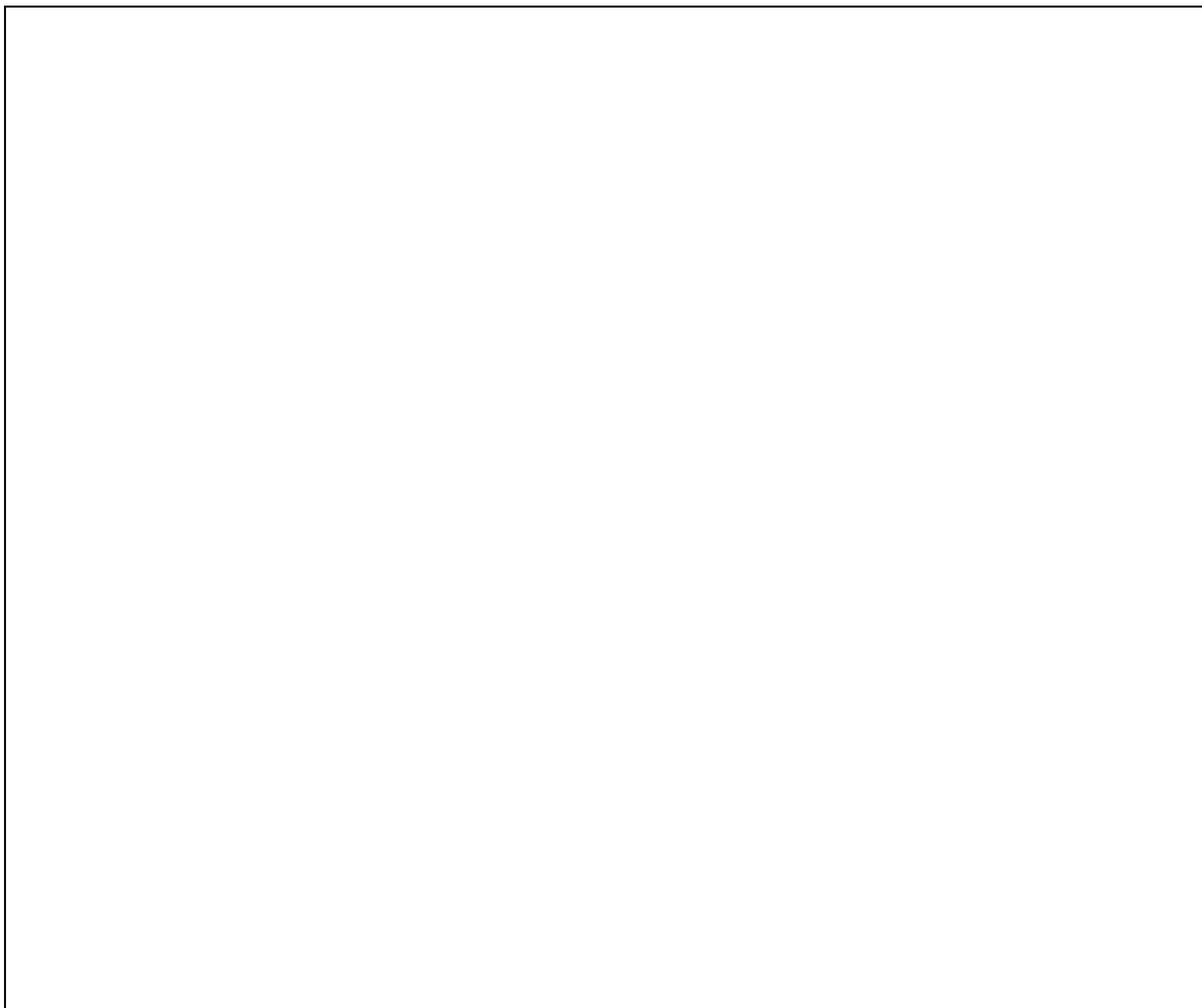
On va ici s'intéresser aux différents types d'inhibitions qui existent.

– Cas classique

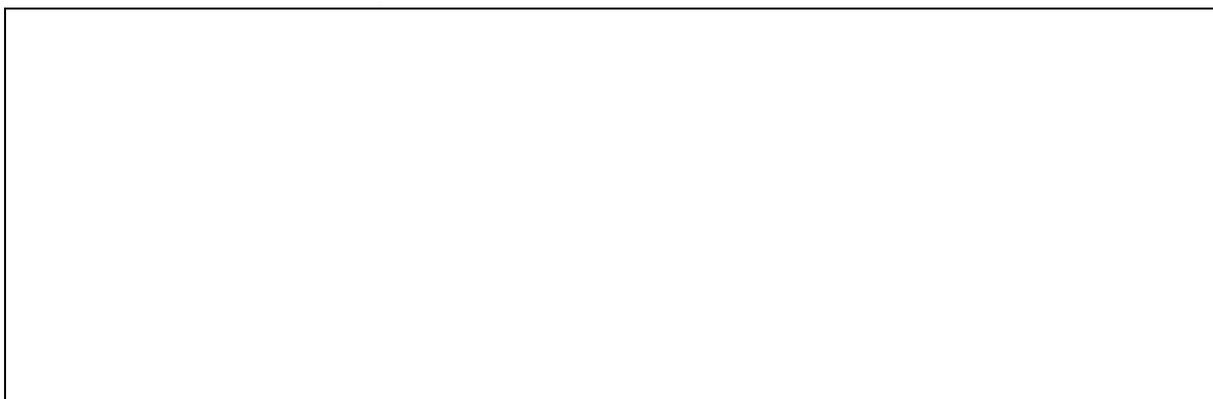


1. En appliquant le principe de l'état stationnaire au complexe ES, exprimer la vitesse v de formation de P en fonction de la concentration en S et de la concentration initiale en E.

On pourra poser $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$



2. Montrer que, lorsque la concentration initiale en substrat est très élevée ($[S] \gg K_M$), la vitesse de formation de P tend vers une valeur limite notée v_M que l'on exprimera en fonction de la concentration totale en enzyme.



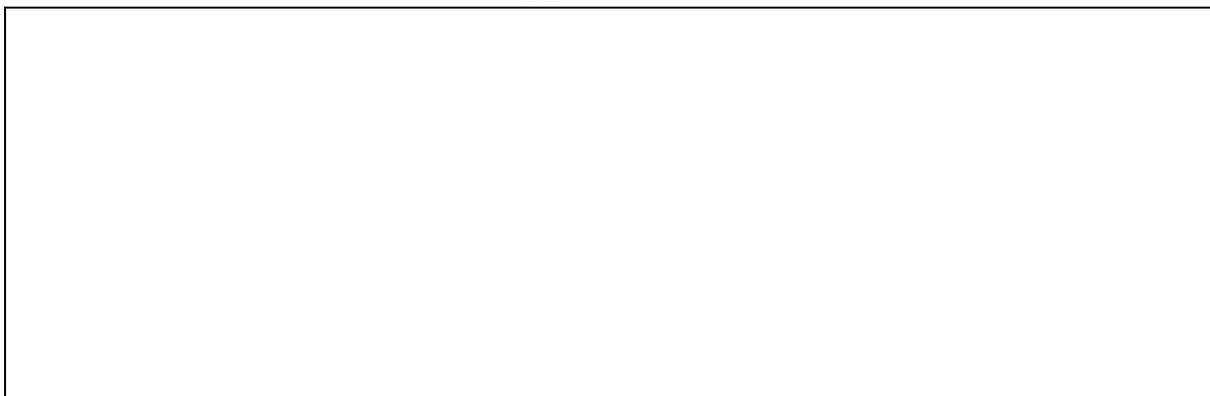
3. Donner alors l'expression de la vitesse v de formation de P en fonction de K_M et de v_M .



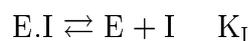
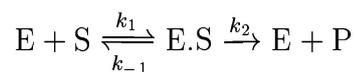
4. Donner la signification physique de K_M et de v_M ?



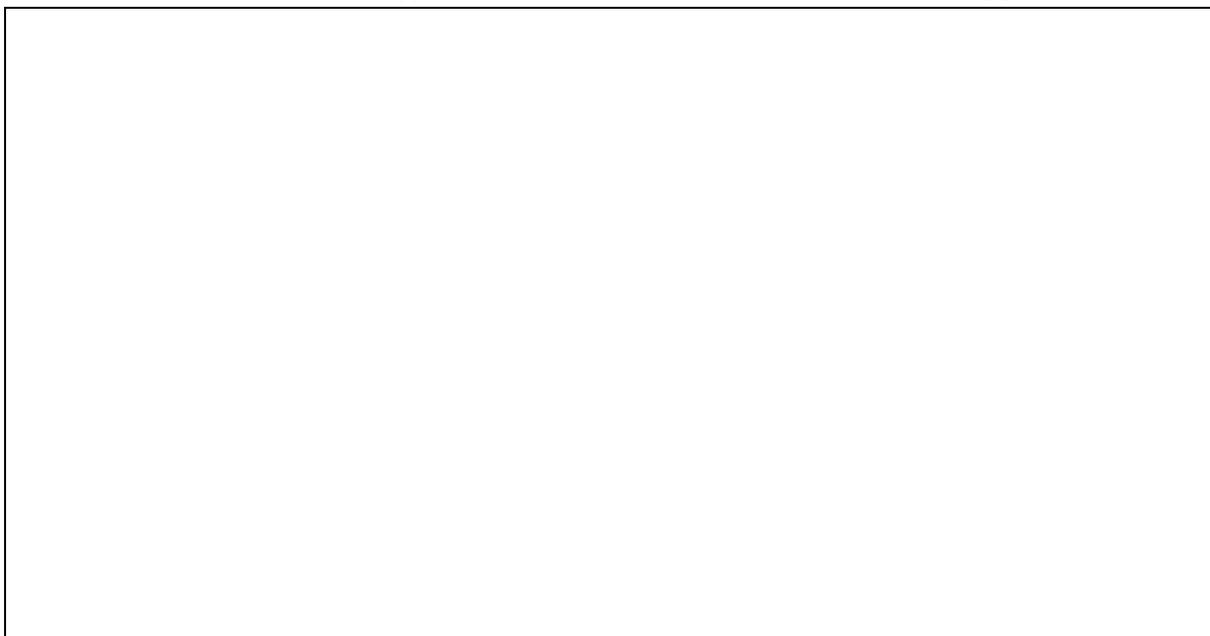
5. Représenter l'allure de la courbe $v=f([S])$.



– Cas d'un inhibiteur compétitif ² :



6. Exprimer la vitesse v de formation de P, on donnera à v une expression analogue à celle trouvée au 3.2.3 en introduisant K_{Mapp} , que l'on exprimera en fonction de K_M , $[I]$ et K_I .

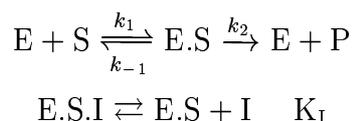


7. Donner finalement l'allure de la courbe $v=f([S])$ et la comparer à la précédente.

²Un inhibiteur compétitif se fixe sur l'enzyme dans le même site actif que le substrat.

8. En déduire une méthode graphique permettant de déterminer précisément K_M et v_M .

– Cas d'un inhibiteur incompétitif ³ :



9. En utilisant les questions précédentes, donner l'expression de la vitesse v de formation de P. Donner les nouvelles expressions de K_{Mapp} et de v_{Mapp} en fonction de K_M , $[I]$ et K_I afin d'obtenir une expression de la vitesse v analogue à celle obtenue pour la réaction sans inhibiteur.

10. Proposer une méthode permettant de déduire K_M , K_I et v_M à partir de K_{Mapp} et/ou de v_{Mapp} .

³un inhibiteur incompétitif se fixe sur l'enzyme dans un site différent du substrat, mais il entraîne une modification structurale de l'enzyme et donc inhibe la fixation du substrat.



3.3 Applications : inhibition du facteur Xa

Lorsque le complexe héparine-antithrombine III est formé, il inhibe le facteur Xa (responsable de l'anticoagulation).

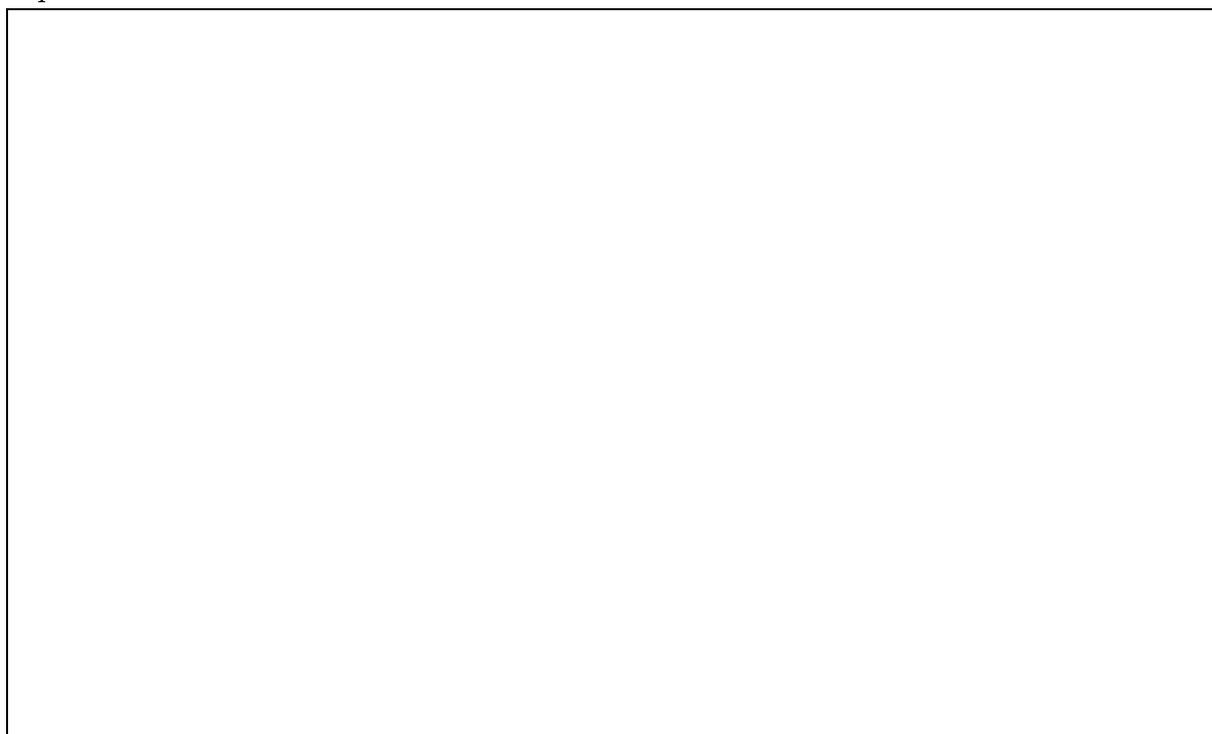
La méthode pour étudier l'inhibition du facteur Xa est la spectroscopie UV : on détecte la formation de produits qui absorbent en UV.

1. Rappeler la loi de Beer-Lambert et son domaine de validité.



Le complexe héparine-antithrombine III inhibiteur du facteur Xa sera noté I et le substrat du facteur Xa sera noté L (cf notation précédente).

2. À partir des résultats obtenus précédemment et de la figure **6**, en déduire quel est le type d'inhibiteur dans le cas qui nous intéresse. Calculer la constante d'inhibition K_I du complexe héparine-antithrombine III.



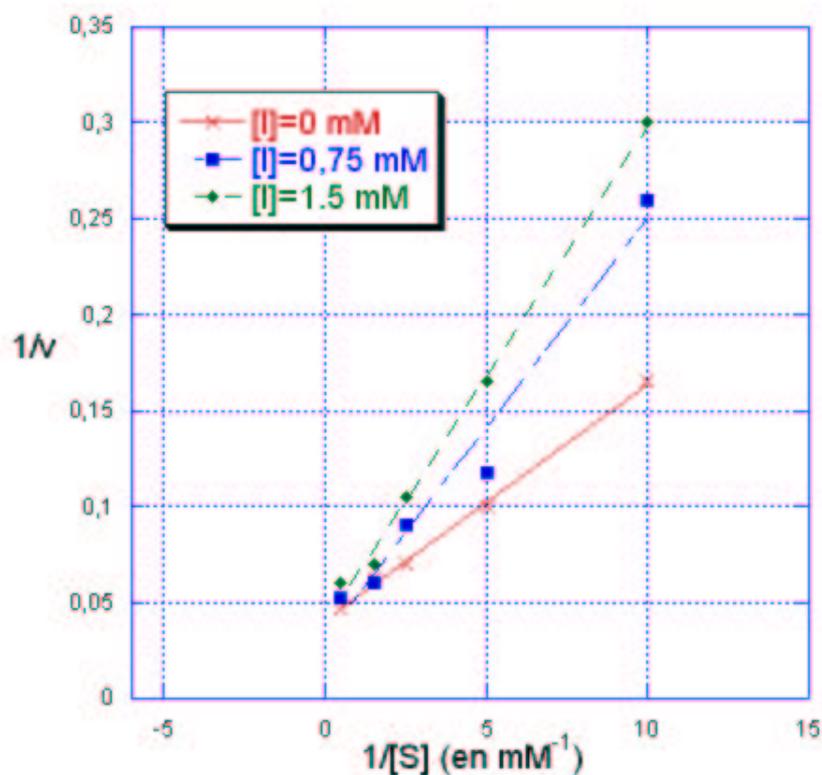


figure 6

Fin de l'épreuve

Bibliographie : ce sujet est une libre adaptation des travaux réalisés par l'équipe du professeur Sinaÿ.

La publication de référence est :

S.K. Das, J.-M. Mallet, J. Esnault, P.-A. Driguez, P. Duchaussoy, P. Sizun, J.-P. Hérault, J.-M. Herbert, M. Petitou, P. Sinaÿ.

Synthesis of conformationally locked carbohydrates : A Skew-Boat Conformation of L-Iduronic Acid Governs the Antithrombotic Activity of Heparin
Angew. Chem. Int. Ed., **2001**, 113, 1723-1726.