

75. Les dérivés sulfatés¹⁾ de l'acide chondroïtine-sulfurique et leur action anticoagulante.

Sur les polysaccharides aminés IV²⁾

par Kurt H. Meyer, R. P. Piroué et M. E. Odier.

(26 I 52)

En 1916 *MacLean* et *Howell* découvraient l'héparine et son action anticoagulante. Comme cette nouvelle substance était le seul anticoagulant physiologique connu, on pensa très tôt à l'utiliser dans le traitement des thromboses. Cependant son emploi en thérapeutique tarda à se répandre du fait du prix de revient élevé du produit qui nécessite des injections répétées de doses relativement fortes.

La découverte du dicoumarol et de ses dérivés (1940—41) ne résolut que partiellement le problème, car s'ils présentent par rapport à l'héparine les avantages de pouvoir être administrés par voie buccale et de produire une hypocoagulabilité plus durable, ils ont des inconvénients très graves. Ce sont des antivitamines K qui s'opposent au niveau du foie à la formation de la prothrombine. Or, un déficit en prothrombine ne suffit pas toujours à éviter une thrombose. Il peut exister dans le sang des activateurs de la coagulation (facteur V) qui rendent inopérante l'hypoprothrombinémie provoquée par le dicoumarol.

C'est la raison pour laquelle de nombreux chercheurs ont essayé de préparer des anticoagulants du type de l'héparine.

En 1930—31, *Demole*³⁾ & *Fischer*⁴⁾ insistèrent sur le fait que de nombreuses substances anticoagulantes comme l'hirudine et l'héparine contiennent des groupes $-\text{SO}_3\text{H}$. En 1935, *Bergström*⁵⁾ découvrait les propriétés anticoagulantes des esters sulfuriques de polysaccharides, tandis que les esters sulfuriques des mono- et di-saccharides étaient inactifs.

Dès cette époque on tenta de préparer des anticoagulants synthétiques ou semi-synthétiques en sulfatant divers polysaccharides (acide chondroïtine sulfurique^{5) 6)}, cellulose⁶⁻¹¹⁾, inuline¹²⁾, xylane⁸⁾, glyco-

1) Conformément à l'usage anglo-saxon, nous désignons par «sulfatation», l'estérification du groupe $-\text{OH}$ par l'acide sulfurique.

2) Communication III: *K. H. Meyer, J. Fellig & Ed. H. Fischer*, *Helv.* **34**, 939 (1951).

3) *V. Demole & M. Reinert*, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **158**, 211 (1930).

4) *A. Fischer*, *Bioch. Z.* **240**, 364 (1931).

5) *S. Bergström*, *Naturwiss.* **23**, 706 (1935); *Z. physiol. Ch.* **238**, 163 (1936).

6) *P. Karrer, H. Koenig & E. Usteri*, *Helv.* **26**, 1296 (1943).

7) *I/S. Solusol*, *Dan. P.* 65269 (1946).

8) *E. Husemann, K. N. von Kaulla & R. Kappesser*, *Z. Naturforschg.* **1**, 584 (1946).

9) *E. Chargaff, F. Bancroft & M. Stanley-Brown*, *J. Biol. Chem.* **115**, 155 (1936).

10) *T. Astrup, I. Galsmar & M. Volkert*, *A. Physiol. Scand.* **8**, 215 (1944).

11) *T. Astrup & J. Piper*, *A. Physiol. Scand.* **9**, 351 (1945).

12) *B. Ingelmann*, *Ark. Kemi Mineral. Geol.* **24**, 4 (1946).

gène¹⁾, amidon^{1) 2) 3)}, chitine^{4) 2)}, acide alginique^{5) 6)}, dextranes⁷⁾. Toutes ces substances sulfatées présentent l'inconvénient de posséder ou bien une action anticoagulante bien inférieure à celle de l'héparine, ou bien une toxicité qui empêche une éventuelle utilisation en thérapeutique. On est loin pourtant d'avoir épuisé toutes les possibilités qu'offrent les sulfatations de polysaccharides. Comme on peut s'y attendre avec les polymères, les produits de départ sont si inhomogènes qu'il est certainement encore possible de partir de produits mieux caractérisés.

En outre, on remarque de grandes différences d'activité selon les méthodes de dosage utilisées. L'activité des substances préparées jusqu'à ce jour a été généralement déterminée avec une seule méthode.

C'est pour ces raisons que nous avons repris à la fois le problème de la synthèse des anticoagulants du type de l'héparine et l'étude de différentes méthodes de dosage d'activité, choisies parmi les plus utilisées, en tenant compte de la conception actuelle du mécanisme de la coagulation sanguine.

Comme les dérivés sulfatés de l'acide chondroïtine-sulfurique semblent être les produits les plus actifs, nous avons eu recours à ce polysaccharide pour étudier les différents aspects de ce problème: préparation de la matière première en vue d'obtenir un produit finement divisé, séchage, méthodes de sulfatation, influence du poids moléculaire et du degré de sulfatation sur l'activité anticoagulante. Nous rapportons enfin nos essais réalisés avec d'autres polysaccharides sulfatés, qui se sont d'ailleurs révélés beaucoup moins intéressants que les esters sulfuriques de l'acide chondroïtine-sulfurique.

1. *Matières premières.*

On obtient facilement l'acide chondroïtine-sulfurique sous la forme de son sel sodico-calciqne à partir des cartilages nasaux de porc (septum nasale)⁸⁾. Nous l'avons également obtenu à partir de trachées et de septa nasalia de bœuf; mais leur richesse plus grande en protéines rend la préparation plus laborieuse et diminue le rendement de l'opération. Le produit obtenu ne semble pas cependant se distinguer de celui provenant des cartilages de porc. Les poids moléculaires des deux produits sont de l'ordre de 30 000.

¹⁾ E. Husemann, K. N. von Kaulla & R. Kappesser, Z. Naturforsch. **1**, 584 (1946).

²⁾ T. Astrup, I. Galsmar & M. Volkert, A. Physiol. Scand. **8**, 215 (1944).

³⁾ J. Reuse, C. r. Soc. Chim. Biol. **131**, 834 (1939).

⁴⁾ P. Karrer, H. Koenig & E. Usteri, Helv. **26**, 1296 (1943).

⁵⁾ E. G. Snyder, U. S. P. 2.508.433 (1950).

⁶⁾ D. Molho & J. Cotte, Bull. Soc. Chim. Biol. **33**, 312 (1951).

⁷⁾ A. Grönwall, B. Ingelmann & H. Mosimann, Upsala Lakarefören Förh. **50**, 397 (1945); Chim. et Ind. **55**, 206 (1946).

⁸⁾ K. H. Meyer, M. Odier & A. E. Siegrist, Helv. **31**, 1400 (1948).

Nous avons également préparé au moyen d'échangeurs d'ions, l'acide chondroïtine-sulfurique libre à partir de son sel sodico-calcique. Mais cet acide libre, même à l'état sec, est instable et se décompose en quelques semaines. Ceci est probablement dû à la présence de traces d'eau.

2. Degré de division du produit de départ.

L'acide chondroïtine-sulfurique et ses sels ne sont solubles qu'en milieu aqueux. Comme les agents de sulfatation se décomposent en présence d'eau, on est obligé de travailler en système hétérogène. Le degré de division du polysaccharide joue évidemment un rôle prépondérant dans ce type de réaction. La dispersion par congélation d'une solution aqueuse, suivie de sublimation de la glace au vide, donne des produits qui ne se laissent que partiellement sulfater. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des produits fraîchement précipités à l'alcool de leur solution aqueuse, lavés à l'éther et séchés au vide ordinaire. Un séchage absolu n'est pas recommandable, car les produits anhydres ne se laissent qu'incomplètement sulfater. Nous ignorons si des traces d'eau ou d'alcool favorisent la réaction, ou bien si le séchage est accompagné d'une agglomération des petites particules et partant, d'une diminution de la surface réagissante.

3. Méthodes de sulfatation.

La plupart des auteurs ont utilisé comme agent de sulfatation, l'acide chlorosulfonique dissous dans la pyridine¹⁾²⁾. Nous avons constaté que les polysaccharides traités selon cette méthode sont considérablement dégradés au cours de la réaction. Au moyen d'une solution d'anhydride sulfurique dans la pyridine nous avons pu obtenir des produits relativement peu dégradés. Cependant cette méthode n'est pas très commode et nous avons cherché à l'améliorer.

Nous avons finalement trouvé que l'anhydride sulfureux remplaçait avantageusement la pyridine. Excellent dissolvant de l'anhydride sulfurique d'une part et de l'acide chlorosulfonique d'autre part, qu'on peut ajouter tous deux en quantité théorique, l'anhydride sulfureux est facile à éliminer par simple évaporation.

L'utilisation de l'anhydride sulfureux comme solvant avait déjà été proposée par *Burkhardt* et coll.³⁾, puis par *Ross* et coll.⁴⁾ pour préparer des acides arylsulfoniques et des alcools primaires sulfatés. Il ne semble pas, cependant, qu'on l'ait jamais utilisé pour préparer des esters sulfuriques de polysaccharides. Grâce à cette méthode, nous avons obtenu facilement et rapidement des substances relativement peu dégradées, de propriétés constantes.

1) *R. Tamba*, *Bioch. Z.* **141**, 274 (1923).

2) *E. Gebauer-Fülneegg*, *W. H. Stevens & O. Bingler*, *B.* **61**, 2000 (1928).

3) *G. N. Burkhardt & A. Lapworth*, *Soc.* **1926**, 684.

4) *J. Ross*, *J. H. Percy*, *R. L. Brandt*, *A. J. Gebhart*, *J. E. Mitchell & S. Jolles*, *J. Ind. Eng. Chem.* **34**, 924 (1942).

Le tableau I résume quelques-unes de nos expériences de sulfatation, réalisées avec divers polysaccharides.

Tableau I.

Polysaccharide	Humidité en %	Méthode de sulfatation	Temp.	Durée en heures	Dégradation	Rend. en %	S % ¹⁾
Acide chond.-sulfurique (sel de Na)	19	SO ₂ -SO ₃	-20°	6	très faible	86	13
Acide chond.-sulfurique (sel de Na)	19	SO ₂ -SO ₃ HCl	-20°	6	faible	90	17
Acide chond.-sulfurique (sel de Na)	15	Pyridine-SO ₃	60°	6	faible	91	9
Acide chond.-sulfurique (sel de Na)	15	Pyridine-SO ₃	20°	17	très faible	75	8
Acide chond.-sulfurique (sel de Na)	15	Dioxane-SO ₃	20°	25	très faible	90	6
Acide chond.-sulfurique (sel de Na)	0	SO ₃ HCl pur	-12°	17	très forte	55	14
Acide chond.-sulfurique libre	0	Pyridine-SO ₃	60°	6	forte	70	14
Galactomannane de caroubes	7	SO ₂ -SO ₃	-20°	6	forte	16	10
Lichénine	11	SO ₂ -SO ₃	-20°	6	moyenne	60	15
Chitosane	11	SO ₂ -SO ₃	-20°	6	faible	40	15
Chitosane	0	SO ₂ -SO ₃	-20°	6	moyenne	17	16
Chitosane	18	SO ₂ -SO ₃ HCl	-20°	6	faible	70	9
Xylane	22	SO ₂ -SO ₃	-20°	6	faible	25	10

4. Poids moléculaire, constitution et activité anticoagulante.

Nous avons constaté qu'une dégradation du produit s'accompagnait toujours d'une baisse de l'activité anticoagulante. Les meilleurs produits que nous avons obtenus ont des poids moléculaires de l'ordre de 26 000, ce qui correspond à un degré de polymérisation de 50 restes aldobioniques. Les produits fortement dégradés sont pratiquement inactifs.

Tableau II.

Acide chond.-sulf.	Soufre %	$[\alpha]_D^{20}$	$[\eta]^*$	Poids moléculaire
Produit de départ préparé selon K. H. Meyer et coll. ²⁾	6	-31°	0,8	30000
Produit sulfaté par SO ₂ -SO ₃ HCl	17	-20°	0,6	26000
Produit sulfaté par SO ₂ -SO ₃	12	-21°	0,6	28000

*) $[\eta] = \frac{\eta_{sp}}{c}$ = Viscosité intrinsèque ou viscosité limite; concentration en gr/100 cm³.

¹⁾ Analyses effectuées par le Laboratoire de micro-analyse Peisker-Ritter à Brugg.

²⁾ K. H. Meyer, M. E. Odier & A. E. Siegrist, Helv. 31, 1400 (1948).

Il semble que la teneur en groupes $-\text{SO}_3\text{H}$ joue également un rôle important. Seuls les produits contenant au moins 11 à 12% de soufre lié (ce qui correspond environ à deux groupes $-\text{SO}_3\text{H}$ par période), présentent une bonne activité anticoagulante. Cependant il ne s'agit certainement pas d'une règle générale, car *Marbet & Winterstein*¹⁾ ont isolé des eaux-mères provenant de l'extraction de l'héparine, un polysaccharide voisin de l'acide chondroïtine-sulfurique (β -héparine), contenant 6% de soufre et présentant une activité anticoagulante égale à 25% celle de l'héparine.

5. Conception actuelle du mécanisme de la coagulation sanguine.

Depuis 20 ans, la théorie classique de la coagulation du sang a subi de nombreuses et profondes modifications. La figure 1 présente sous une forme résumée le mécanisme généralement admis à l'heure actuelle.

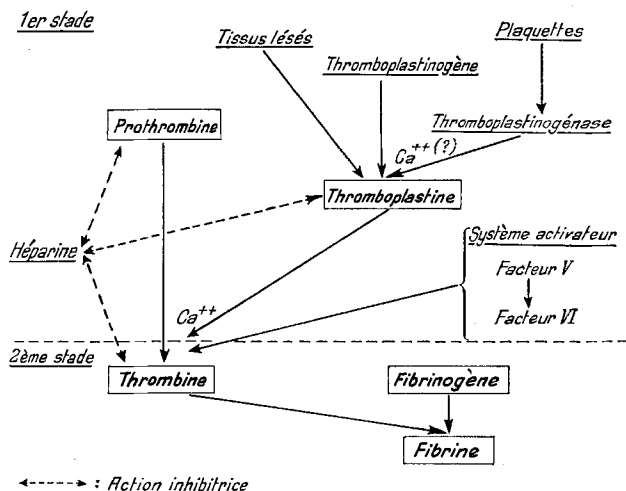


Fig. 1.

1er stade. La prothrombine est une globuline, préparée au niveau du foie sous l'influence de la vitamine K. Lorsque la coagulation est déclenchée, elle se transforme en thrombine, ceci sous l'influence du calcium et de la thromboplastine.

La thromboplastine (ou thrombokinasé) se présente sous deux formes:

a) Une thromboplastine libérée des tissus lésés.

b) Une thromboplastine formée à partir d'une substance antihémophile, le thromboplastinogène (ou prothrombokinasé), ceci sous l'influence d'un enzyme d'origine plaquettaire, la thromboplastinogénase. Selon certains auteurs, le calcium serait nécessaire pour que cette réaction puisse s'accomplir. Il est également très probable que la thromboplastine formée agisse comme activateur (réaction autocatalytique).

La transformation de la prothrombine en thrombine est encore influencée par la présence d'un activateur, le facteur V (ou facteur labile, ou Ac.-globuline). Selon *Owren*²⁾, ce facteur V serait inactif et se transformerait en facteur VI actif.

¹⁾ R. Marbet & A. Winterstein, *Helv.* **34**, 2311 (1951).

²⁾ P. A. Owren, *Acta Med. Scand.* **128**, 327 (1947).

2^e stade. La thrombine formée à partir de la prothrombine agit sur le fibrinogène qui se transforme en fibrine. Selon Quick, la thrombine agirait également, au cours d'une réaction autocatalytique, sur les plaquettes, permettant ainsi la libération de la thromboplastinogénase.

Action des anticoagulants.

a) *Dicoumarol et dérivés.* Ce sont des antivitamines K et ils s'opposent, au niveau du foie, à la formation de la prothrombine. En clinique, ils présentent par rapport à l'héparine, les avantages d'être moins coûteux, de pouvoir être administrés par voie buccale et de provoquer une hypocoagulabilité plus durable. Ils ont cependant des inconvénients très graves. Ils sont toxiques, leur action n'est pas immédiate, mais ne se manifeste que plusieurs heures après leur administration. Les accidents hémorragiques provoqués par des doses trop fortes sont graves, car le sang ne revient que lentement à son état de coagulabilité normal. D'autre part, un déficit en prothrombine ne suffit pas toujours à éviter une thrombose. Il existe parfois dans le sang, un excès d'activateur (facteur V) qui peut rendre inopérante, l'hypoprothrombinémie provoquée par le dicoumarol ou ses dérivés.

b) *Héparine.* On sait depuis les travaux de Howell et de Quick principalement que l'héparine possède une action inhibitrice de la thrombine. Cependant Wadsworth et coll.¹⁾ montrèrent que l'héparine présentait encore une action inhibitrice vis-à-vis de la thromboplastine. Dans l'organisme, l'héparine jouerait un rôle stabilisateur et ne serait présente que pour neutraliser l'action de petites quantités de thromboplastine libérées accidentellement. Il est maintenant établi que l'action de l'héparine est multiple et qu'elle agit sur la thrombine, la thromboplastine et, à hautes concentrations du moins, sur la prothrombine²⁾.

Au point de vue thérapeutique, l'héparine est l'anticoagulant idéal. Son action est rapide et puissante. Les accidents sont rares et toujours bénins, une dose trop forte pouvant être immédiatement neutralisée par une injection de protamine. Elle présente, en revanche, les inconvénients de nécessiter des injections répétées de doses relativement élevées et d'être difficilement accessible.

6. Méthodes de dosage d'activité.

Il existe de nombreuses méthodes pour apprécier le pouvoir anticoagulant de l'héparine ou de produits semblables à l'héparine. On peut opérer «in vivo» ou «in vitro». Il est évident que ce sont les essais «in vivo» qui donnent les résultats les plus sûrs et qui permettent le mieux de se rendre compte de la valeur d'un anticoagulant de synthèse, par rapport à celle de l'héparine. Ils sont cependant d'une technique un peu délicate et prennent beaucoup de temps.

Toutes ces méthodes consistent à comparer l'anticoagulant d'activité inconnue à une héparine standard, ceci dans des conditions opératoires identiques.

Nous avons vu plus haut que le mécanisme de la coagulation est complexe, que l'action de l'héparine elle-même est multiple. Or, si les esters sulfuriques, préparés jusqu'à aujourd'hui, présentent tous une action antithrombine plus ou moins puissante, ils peuvent accuser de notables différences quant à leur action sur les autres facteurs de la coagulation. Par exemple, Molho et coll.³⁾ ont montré récemment

¹⁾ A. Wadsworth & F. et E. Maltaner, Am. J. Physiol. **119**, 80 (1937).

²⁾ J. H. Ferguson, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **37**, 23 (1937—38).

³⁾ D. Molho & J. Cotte, Bl. Soc. Chim. Biol. **33**, 312 (1951).

que les esters sulfuriques de l'acide alginique étaient doués d'une action antithromboplastine égale à 15 % de celle de l'héparine, tandis que leur action anticoagulante totale n'atteignait que 5 %. D'autres esters sulfuriques, comme ceux de la cellulose, de la chitine et de l'amidon, sont presque complètement dépourvus de cette action antithromboplastine¹).

Il résulte de ces faits que, selon la méthode de dosage utilisée, les résultats obtenus peuvent présenter de notables différences. On observe de sensibles variations en particulier, selon que l'on opère en présence ou en absence de thromboplastine.

A. *Méthode Reinert & Winterstein*²). Nous avons opéré selon la description détaillée qu'en a donnée *Foster*³), en utilisant du plasma de bœuf. Le principe de la méthode est le suivant:

On détermine la quantité de Ca^{++} , nécessaire pour coaguler en une demi-heure à 37°, 50% d'une quantité donnée de plasma contenant une quantité fixe d'héparine standard. C'est ce qu'on appelle la *quantité optimum de Ca^{++}* . Les échantillons de plasma sont placés dans des tubes standards et l'on mesure la hauteur totale du liquide avant de les placer dans le thermostat. Après une demi-heure, on retourne les tubes et on mesure la hauteur du liquide non coagulé. La différence donne la quantité de plasma coagulé.

On détermine ensuite dans un *dosage d'orientation* quelle est environ la quantité d'anticoagulant d'activité inconnue nécessaire pour coaguler en 30 min. 50% du plasma citraté, recalcié avec la quantité optimum de Ca^{++} .

Puis dans le *dosage définitif*, on introduit dans des échantillons de plasma citraté et recalcié avec la quantité optimum de Ca^{++} , des quantités croissantes d'héparine standard, choisies de manière qu'on ait après 30 min. des plasmas coagulés de 0 à 100%. On fait de même en remplaçant l'héparine par l'anticoagulant inconnu (en utilisant les indications fournies par le dosage d'orientation). On compare les courbes obtenues au point 50% et on a ainsi l'activité.

Cette méthode présente de nombreux inconvénients. La quantité optimum de Ca^{++} est difficile à déterminer. Elle varie considérablement suivant les plasmas et selon les saisons. Pour un même échantillon, elle se modifie parfois en quelques heures. Tous les esters sulfuriques de polysaccharides que nous avons dosés ainsi ont révélé une activité anticoagulante très faible, souvent en contradiction avec les chiffres obtenus par les autres méthodes et les essais «in vivo».

D'autre part, nous avons remarqué que le mode de décalcification du plasma n'était pas indifférent. *Reinert & Winterstein*, puis *Foster* et coll. utilisaient du plasma citraté. Nous avons fait l'essai en utilisant aussi du plasma de bœuf oxalaté. La quantité optimum de Ca^{++} est alors d'environ trois fois inférieure à celle qui est nécessaire pour le plasma citraté. L'acide chondroïtine-sulfurique sulfaté présente une activité trois fois supérieure en présence de plasma oxalaté, activité qui se rapproche de celle décelée par les autres méthodes. Ces faits montrent que l'action de l'oxalate et celle du citrate ne sont pas identiques, et confirment les remarques faites par *Quick & Stefanini*⁴). Selon ces auteurs le citrate provoquerait principalement une perte d'activité de la prothrombine, plutôt qu'une action décalcifiante. Ainsi la prothrombine qui est facilement adsorbée sur du phosphate tricalcique à partir de plasma oxalaté, n'est pas adsorbée quand le même plasma est traité avec du citrate. Il se peut que les différences d'activité trouvées par certains auteurs pour des produits semblables proviennent de différences dans le mode de décalcification

¹) *T. Astrup, J. Galsmar & M. Volkert, Acta Physiol. Scand.* **8**, 215 (1944).

²) *M. Reinert & A. Winterstein, Arch. Intern. Pharmacodyn. Ther.* **62**, 47 (1939).

³) *R. H. K. Foster, J. Lab. Clin. Med.* **27**, 820 (1942).

⁴) *A. J. Quick & M. Stefanini, J. Gen. Physiol.* **32**, 191 (1948).

du plasma. Le tableau III résume quelques-unes des valeurs que nous avons trouvées avec différents polysaccharides sulfatés.

Tableau III.

Polysaccharide sulfaté	Soufre lié %	Activité anticoagulante*)		
		plasma citraté	plasma oxalaté	«In vivo»
Acide chondroïtine-sulfurique . . .	17	15	41	50—60
Acide chondroïtine-sulfurique . . .	12	10	37	50
Lichénine	15	3		
Galactomannane de caroubes . . .	10	1		
Xylane	10	1		
Chitosane	15	6		

*) Toutes les valeurs du pouvoir anticoagulant sont exprimées en % d'une héparine standard des laboratoires *Connaught* de Toronto, qui titre 130 unités anticoagulantes internationales au mg.

B. *Mesure du temps de coagulation du plasma oxalaté recalciifié* (Temps de *Howell*). On introduit dans des tubes standards, des échantillons de plasma humain oxalaté, des quantités croissantes d'héparine et du Ca^{++} . La lecture des temps de coagulation permet d'établir une courbe en fonction des quantités d'héparine ajoutée. On détermine ensuite, les quantités d'anticoagulant d'activité inconnue nécessaires pour obtenir une courbe qui recouvre le mieux possible celle que l'on a obtenue avec l'héparine.

Tableau IV.

Héparine		Acide chondroïtine-sulfurique sulfaté	
γ	Temps de coagulation	γ	Temps de coagulation
0	2' 30"	0	2' 30"
3	3' 00"	6	2' 50"
7	5' 20"	14	4' 40"
10	12' 30"	20	12' 30"

On voit d'après le tableau IV qu'il faut une quantité double d'acide chondroïtine-sulfurique sulfaté pour obtenir une action semblable à celle de l'héparine.

Cependant, si on se trouve en présence d'un produit d'activité totalement inconnue, les tâtonnements inévitables pour trouver les concentrations d'anticoagulant à ajouter au plasma pour obtenir une courbe qui recouvre celle de l'héparine, rendent cette méthode laborieuse. Elle permet en revanche de vérifier facilement les résultats obtenus par d'autres méthodes.

D'autre part, il est nécessaire d'établir simultanément les deux courbes (celle de l'héparine et celle du produit inconnu), car le temps de coagulation d'un plasma oxalaté recalciifié peut varier de plusieurs min. au cours de la journée.

C. *Méthode à la thrombine*. Cette méthode repose sur le fait qu'en ajoutant des anticoagulants du type de l'héparine à des plasmas oxalates, contenant une quantité constante de thrombine, on allonge leur temps de coagulation.

Nous avons opéré selon la technique de *Studer & Winterstein*¹⁾, avec quelques modifications de détail. Nous préférons, entre autre, utiliser du plasma humain au lieu de plasma de bœuf.

¹⁾ A. Studer & A. Winterstein, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **9**, 6 (1951).

En ajoutant à des plasmas oxalatés des quantités croissantes d'héparine, on trace une courbe de référence, et on note les temps de coagulation de chacun d'eux après adjonction de thrombine (fig. 2). On trace une courbe similaire en remplaçant l'héparine par l'anticoagulant envisagé.

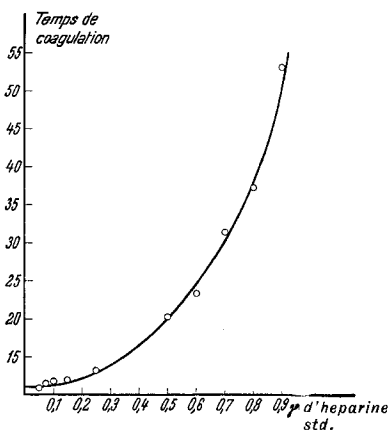


Fig. 2.

Influence de l'héparine sur les temps de coagulation (en présence de thrombine) d'un plasma oxalaté.

Calcul d'activité. On détermine l'activité de l'anticoagulant inconnu en comparant sa courbe avec celle de l'héparine standard aux environs du point 30 sec.

$$\text{Activité} = h \cdot 100/s.$$

s: nombre de γ de l'anticoagulant inconnu donnant un temps de coagulation de 30 secondes environ;

h: nombre de γ d'héparine donnant le même allongement du temps de coagulation (lu sur la courbe).

Exemple: 1,4 γ du sel de sodium de l'acide chondroïtine-sulfurique sulfaté ont donné un temps de coagulation de 34 sec., ce qui correspond sur la courbe à 0,77 γ d'héparine.

$$\text{Activité} = 0,77 \cdot 100/1,4 = 55\%.$$

Lors de dosages en série, on ne trace pas de courbe pour chaque anticoagulant, mais on se contente de déterminer un point aux environs de 30 sec. En revanche, la courbe de l'héparine doit être établie pour chaque plasma. Studer et coll. ont montré en effet, que suivant les plasmas, les courbes obtenues peuvent présenter de sensibles différences.

D. *Méthode à la thromboplastine.* Différentes méthodes ont déjà été proposées pour mesurer l'activité anticoagulante de l'héparine et de produits semblables en présence de thromboplastine. Fischer¹⁾ & Chargaff²⁾ utilisent du plasma de poulet et un extrait embryonnaire dilué comme source de thromboplastine. Astrup et coll.³⁾ préfèrent le plasma et la thromboplastine de bœuf.

En même temps que Studer & Winterstein, nous avons mis au point les conditions précises d'une méthode de dosage de l'activité anticoagulante, mais en nous inspirant de la technique proposée par Quick⁴⁾.

¹⁾ A. Fischer & A. Schmitz, Z. physiol. Ch. **210**, 129 (1932).

²⁾ E. Chargaff, F. W. Bancroft & M. Stanley-Brown, J. Biol. Chem. **115**, 149 (1936).

³⁾ T. Astrup & I. Galsmar, Acta Physiol. Scand. **8**, 361 (1944).

⁴⁾ A. J. Quick, J. Biol. Chem. **109**, lxxiii (1935); J. Am. Med. Assoc. **110**, 1658 (1938).

La méthode de *Quick* consiste à déterminer le temps de coagulation du plasma oxalaté et recalciifié, en présence d'un excès de thromboplastine. Le temps obtenu est appelé « temps de prothrombine »; il est proportionnel à la quantité de prothrombine se trouvant dans le sang. Depuis quelques années la détermination du « temps de prothrombine » est devenue d'un usage courant en clinique pour suivre l'évolution d'un traitement anticoagulant au dicoumarol. Or, les anticoagulants du type de l'héparine, ajoutés « in vitro » à un plasma donné allongent son « temps de prothrombine ». On peut utiliser ce fait pour mesurer l'activité anticoagulante d'un produit d'activité inconnue.

Comme dans la méthode à la thrombine on trace une courbe des temps de coagulation en fonction des quantités d'héparine ajoutées « in vitro » à un plasma donné (fig. 3).

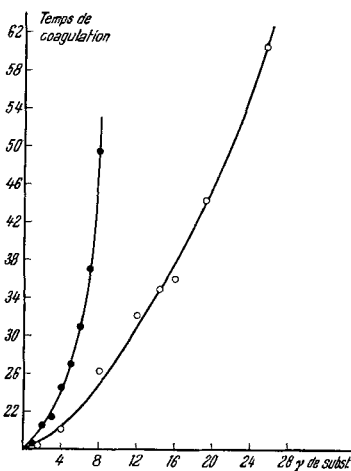


Fig. 3.

Influence des anticoagulants sur le « temps de prothrombine » d'un plasma donné.

- Héparine standard.
- Acide chondroïtine-sulfurique sulfaté (soufre: 17%).

On trace ensuite une courbe semblable en remplaçant l'héparine par l'anticoagulant envisagé. On compare les deux courbes aux environs du point 30 secondes.

Les courbes que l'on obtient tant avec l'héparine qu'avec l'acide chondroïtine-sulfurique sulfaté rappellent celles que l'on observe dans la méthode à la thrombine et les résultats obtenus sont comparables.

Calcul de l'activité. Comme dans la méthode à la thrombine on applique la formule

$$\text{Activité} = h \cdot 100/s.$$

Exemple: 12 γ du sel de Na de l'acide chondroïtine-sulfurique sulfaté ont donné un temps de coagulation de 32,1 sec., ce qui correspond sur la courbe (fig. 3) à 6,4 γ d'héparine standard.

$$\text{Activité} = 6,4 \cdot 100/12 = 53\%.$$

Lors de dosages en série, on se contente d'établir la courbe de l'héparine standard et un point aux environs de 30 sec. avec l'anticoagulant inconnu.

Cette méthode de dosage présente l'avantage de tenir compte, non seulement de l'effet antithrombine des anticoagulants, mais aussi de leur action antithromboplastine. Certains esters sulfuriques de polysaccharides (cellulose, chitine, amidon) sont dépourvus de cette action inhibitrice vis-à-vis de la thromboplastine¹⁾. Ils peuvent donner dans certains cas des temps plus longs que ceux que l'on observe avec l'héparine²⁾, donc une activité apparente plus grande. Ceci s'explique par le fait que lorsqu'on se trouve en présence d'un excès de thromboplastine (comme c'est le cas dans la méthode de *Quick*), il y a inhibition réciproque de l'enzyme et de l'anticoagulant. On obtient ainsi des temps relativement courts. Si, en revanche, on introduit dans le plasma des esters sulfuriques sans action sur la thromboplastine, seule l'action antithrombine entre en ligne de compte et les temps obtenus peuvent être plus longs que ceux observés en présence d'héparine. L'acide chondroïtine-sulfurique sulfaté paraît être doué d'une action inhibitrice vis-à-vis de la thromboplastine, semblable à celle de l'héparine puisque les temps observés sont proportionnels à l'activité anticoagulante décelée par d'autres méthodes, par les essais «in vivo» en particulier.

L'acide chondroïtine-sulfurique natif ne provoque aucun allongement du «temps de prothrombine» d'un plasma donné. En revanche les autres esters sulfuriques de polysaccharides que nous avons préparés (de chitosane, xylane, lichénine, etc.) allongent le «temps de prothrombine» et présentent donc aussi une action anticoagulante, quoique beaucoup plus faible que celle de l'héparine. Cependant, les courbes obtenues avec ces produits ne sont plus semblables à celles que l'on observe avec l'héparine d'une part et l'acide chondroïtine-sulfurique sulfaté d'autre part. Elles s'écartent plus ou moins régulièrement de ces dernières sans présenter de palier caractéristique. Il serait hasardeux dans ces cas de les comparer en un point donné (30 sec. par exemple) en vue d'en tirer une valeur précise de l'activité anticoagulante. Seuls des essais «in vivo» permettraient de donner une valeur correcte et indiscutable.

Donc si cette méthode ne permet pas de doser quantitativement «stricto sensu» tous les anticoagulants, elle permet néanmoins d'obtenir des données précieuses sur leur action anticoagulante.

E. *Essais «in vivo»*. Il est évident que ce sont les essais «in vivo» qui donnent les résultats les plus sûrs et qui permettent le mieux de se rendre compte de la valeur d'un anticoagulant par rapport à celle de l'héparine.

Nous avons injecté à une série de lapins de l'acide chondroïtine sulfurique contenant de 11 à 17 % de soufre lié. Nous avons appliqué au contrôle du sang des animaux traités le test de tolérance à l'héparine «in vitro» de *Waugh & Ruddick*³⁾, modifié par *Soulier*⁴⁾. Il consiste à mesurer le temps de coagulation du plasma oxalaté recal-

¹⁾ *T. Astrup, I. Galsmar & M. Volkert, Acta Physiol. Scand.* **8**, 215 (1944).

²⁾ *T. Astrup & I. Galsmar, Acta Physiol. Scand.* **8**, 361 (1944).

³⁾ *T. Waugh & D. W. Ruddick, Can. Med. Ass. J.* **50**, 547 (1944); **51**, 11 (1944).

⁴⁾ *J. P. Soulier & A. G. Le Bolloch, Rev. d'Hématol.* **5**, 148 (1950).

cifié, en présence de quantités croissantes d'héparine ajoutées «in vitro». Ce test a été appliqué avec succès en clinique et il est particulièrement apte à rendre compte, non seulement des états d'hypo-coagulabilité sanguine, mais encore des réactions d'hypercoagulabilité¹⁾. Nous avons en effet observé que 3 à 4 h. après l'injection, l'héparine provoquait une hypercoagulabilité passagère (phénomène très difficile à déceler avec la seule lecture du temps de coagulation simple [temps de *Howell*]). La grande sensibilité de cette méthode permet donc d'apprécier dans certains cas des modifications de la coagulabilité restées latentes et que d'autres méthodes ne permettent pas toujours de déceler.

Nous avons déterminé pour chaque plasma:

- a) Le temps de coagulation du plasma oxalaté recalcifié (temps de *Howell*).
- b) Le temps de coagulation du plasma oxalaté recalcifié, en présence d'une unité internationale d'héparine pour 0,5 cm³.

Ces deux essais font partie du test de tolérance à l'héparine «in vitro».

- c) Le «temps de prothrombine».

Les «temps de prothrombine» ne sont que faiblement allongés après des injections d'héparine et d'acide chondroïtine-sulfurique sulfaté, ce qui est normal, puisque l'héparine est avant tout une antithrombine et n'influence que fort peu la prothrombine.

L'acide chondroïtine-sulfurique sulfaté présente 45 min. après l'injection une activité anticoagulante égale à 50% celle de l'héparine. Son action est plus durable et est encore sensible 4 h. après l'injection alors que celle de l'héparine est épuisée après 2 h. déjà. Lors d'une prochaine publication, nous donnerons les résultats détaillés de ces essais.

Conclusion.

Les résultats que nous avons obtenus avec l'acide chondroïtine-sulfurique sulfaté montrent que ce produit est pourvu d'une action anticoagulante suffisamment puissante pour qu'on puisse envisager son éventuelle application clinique.

Partie expérimentale.

I. Sulfatation du chondroïtine-sulfate de sodium.

1. *Reprécipitation.* 3,5 g de chondroïtine-sulfate de Na²⁾ sont dissous dans 100 cm³ d'eau distillée. On reprécipite le polysaccharide en versant dans cette solution 3 à 4 volumes d'éthanol 95%, sous violente agitation au «Vibromischer»³⁾. On ajoute 50 à 100 mg d'acétate de Na pour favoriser la floculation. 5 à 10 min. d'agitation suffisent pour obtenir un précipité qui se dépose facilement. On laisse reposer quelques heures, siphonne le liquide surnageant et centrifuge 10 min. à 3000 t/min. Les culots sont triturés trois fois à l'éthanol, puis 2 fois à l'éther. Les derniers culots obtenus sont triturés avec une grosse baguette de verre jusqu'à disparition de l'odeur d'éther. On termine le séchage au vide ordinaire sur silicagel. *Rendement de la reprécipitation:* 90%. *Humidité:* 19%.

2. *Sulfatation au moyen du mélange pyridine-SO₃.* On prépare le réactif sulfatant en absorbant 1,1 g de SO₃ dans 35 cm³ de pyridine puriss. anhydre. On suspend ensuite, 1 g de chondroïtine-sulfate de Na reprécipité dans 30 cm³ de pyridine anhydre. La

¹⁾ J. P. Soulier & A. G. Le Bolloch, Sem. des Hôp. de Paris **70**, 3702 (1950).

²⁾ K. H. Meyer, M. E. Odier & A. E. Siegrist, Helv. **31**, 1400 (1948).

³⁾ AG. für Chemie-Apparatebau, Zürich.

suspension est introduite à travers un entonnoir à robinet dans un ballon à 3 cols rodés. Les deux autres cols du ballon sont munis respectivement d'un agitateur et d'un tube de dégagement contenant du silicagel puis du P_2O_5 . Le mélange sulfatant est ajouté durant une heure à 60° (bain-marie) et on maintient cette température encore 6 h. Puis on refroidit extérieurement à l'eau glacée, introduit quelques morceaux de glace dans le ballon et neutralise en additionnant goutte à goutte de la soude caustique n. sous violente agitation. On dialyse dans un sac de cellophane «Visking»¹⁾ n° 30/32 pendant 3 jours contre de l'eau courante et deux jours contre de l'eau distillée dont le pH a été amené à 7,5 par addition de quelques gouttes de soude caustique.

Après la dialyse, on vérifie que le pH est toujours entre 7 et 7,5 à l'intérieur de la membrane et que les ions SO_4^{2-} ont été éliminés. Le produit est alors précipité sous forte agitation («Vibromischer») par addition de 3 à 4 volumes d'éthanol et 50 à 100 mg d'acétate de Na. Les produits fortement sulfatés donnent parfois un précipité visqueux qui colle aux parois du récipient ainsi que sur la tige de l'agitateur. Dans ce cas, le produit est redissous et reprécipité. La substance est alors centrifugée et séchée par triturations successives à l'éthanol (3 fois) et à l'éther (2 fois). On la laisse finalement au vide une nuit sur silicagel. *Soufre lié* (par rapport au produit sec): 9%. *Humidité*: 11%. *Rendement*: 95%. *Viscosité* $[\eta]$: 0,8.

3. *Sulfatation au moyen du mélange pyridine-acide chlorosulfonique*. On prépare l'acide chondroïtine-sulfurique libre en traitant 6 g de sel sodico-calciqne, dissous dans 60 cm³ d'eau, par 38 g d'amberlite acide (IR-100-H) pendant 30 min., en agitant. On répète deux fois cette opération, filtre et congèle le filtrat. La glace est sublimée sous pression réduite (0,1 mm de Hg) en présence de silicagel.

On prépare à froid un mélange de 60 cm³ de pyridine (distillée sur P_2O_5) et de 5 cm³ de SO_3HCl pur. On y introduit 2 g d'acide chondroïtine-sulfurique libre séché sur P_2O_5 au vide poussé. On chauffe à l'abri de l'humidité 6 h. à 60°. Après refroidissement, on neutralise, dialyse, congèle et sublime la glace au vide poussé. On obtient ainsi une poudre jaune-brun. *Soufre lié* (par rapport au produit sec): 12%. *Humidité*: 4%. *Rendement*: 83%. *Viscosité* $[\eta]$: 0,1.

4. *Sulfatation par l'acide chlorosulfonique*. On introduit 1 g de chondroïtine-sulfate de Na séché 3 jours sur P_2O_5 au vide poussé, à 80°, dans une éprouvette rodée contenant 7 cm³ de SO_3HCl pur refroidi à -12°. On bouche soigneusement l'éprouvette et laisse réagir en agitant de temps en temps avec une baguette de verre. Après 17 h. on obtient une liqueur homogène, légèrement brunâtre. Celle-ci est versée goutte à goutte sur de la glace finement broyée, puis neutralisée par de la soude caustique, dialysée et précipitée comme ci-dessus.

Soufre lié (par rapport au produit sec): 14%. *Humidité*: 9%. *Rendement*: 55%. *Viscosité* $[\eta]$: 0,01.

5. *Sulfatation par le mélange SO_2-SO_3* . Préparation du SO_2 liquide: Le SO_2 obtenu à partir d'une bombe est déshydraté dans 2 flacons-laveurs contenant respectivement du silicagel et de l'acide sulfurique 100%, puis dans un tube rempli de perles de verre et de P_2O_5 . Il est finalement condensé dans un ballon de 500 cm³ refroidi extérieurement par un bain de neige carbonique-cellosolve. Le tube d'arrivée du SO_2 plonge jusqu'au fond du ballon. Un tube de dégagement contenant du silicagel conduit à la chapelle. Lorsque l'on a obtenu 180—200 cm³ de SO_2 liquide, la distillation est arrêtée et le ballon bouché hermétiquement au moyen d'un bouchon de caoutchouc. Il est immédiatement plongé dans un bain à -20°.

Préparation du SO_3 liquide: On distille de l'oléum à 25% à travers une colonne Widmer de 20 cm; la température du ballon collecteur est maintenue à 25—30° au moyen d'une lampe de chauffage infra-rouge, ceci pour éviter la polymérisation du SO_3 .

On prélève 0,4 cm³ (0,8 g) de SO_3 au moyen d'une pipette sèche reliée à une poire en caoutchouc et on l'ajoute au SO_2 ; 1 g de chondroïtine-sulfate de Na reprécipité est introduit alors dans le ballon. On bouche hermétiquement et secoue dans le bain à -20° durant 6 h. Le SO_2 est ensuite évaporé au vide, le ballon étant plongé dans de l'eau froide.

1) *Visking Corporation*, Chicago.

Un tube à silicagel est placé entre la trompe à eau et le ballon. Après l'évaporation du SO_2 , on fait le vide pendant 2 h. encore, ceci pour éliminer toute trace de SO_2 . Le résidu sec est repris par 15 à 20 cm^3 de soude caustique n. glacée, tout en refroidissant extérieurement. On ajuste le pH à 7–7,5, dialyse et précipite le produit sulfaté comme ci-dessus. *Soufre lié* (par rapport au produit sec): 13%. *Humidité*: 15%. *Rendement*: 86%. *Viscosité* $[\eta]$: 0,6.

6. *Sulfatation par le mélange SO_2 -acide chlorosulfonique*. 0,5 g d'acide chlorosulfonique pur (rigoureusement exempt d'acide sulfurique) sont dissous dans 150 cm^3 de SO_2 liquide préparé comme ci-dessus. On introduit dans cette solution 1 g de chondroïtine-sulfate de Na reprécipité et on agite 6 h. dans le bain à -20° . On évapore ensuite le SO_2 au vide et reprend immédiatement par 50 cm^3 de soude caustique n. en refroidissant. On neutralise, dialyse, précipite et sèche comme dans les exemples précédents.

Soufre lié (par rapport au produit sec): 17%. *Humidité*: 15%. *Rendement*: 90%. *Viscosité* ($[\eta]$): 0,6.

II. Mesures de viscosité.

La viscosité a été déterminée au viscosimètre d'Ostwald à 20° avec 10 cm^3 de solution. La viscosité limite $[\eta]$ est déterminée par extrapolation sur une série de mesures faites avec des concentrations de polysaccharide variant de 1 à 5% dans l'eau distillée.

III. Mesure du poids moléculaire.

Nous mesurons le poids moléculaire de nos produits en déterminant le pouvoir réducteur selon une modification de la méthode de Willstätter & Schudel¹⁾. Dans un erlenmeyer rodé de 50 cm^3 , on dissout une prise (600 mg) dans 10 cm^3 d'eau et ajoute 2 cm^3 d'une solution de carbonate de sodium à 5%. On introduit ensuite, sous la surface du liquide, 6 cm^3 d'une solution d'iode 0,02-n. à l'aide d'une burette munie d'une pointe effilée (pH final 10,5–10,7). On bouche le flacon et le laisse reposer une heure à l'obscurité à température ordinaire. On acidule par 2,5 cm^3 d'acide sulfurique 20% et titre l'iode par le thiosulfate 0,1-n., en ajoutant vers la fin du titrage quelques gouttes d'une solution d'amidon. Un blanc sans polysaccharide est traité parallèlement à chaque détermination.

IV. Contrôle de l'activité anticoagulante — Méthode à la thromboplastine.

Nous avons procédé comme suit en modifiant légèrement la technique de Quick²⁾ et celle de Shapiro³⁾.

Appareillage. Les mesures se font au thermostat à 37° dans des tubes à culture en verre épais de 19 mm/56 mm.

Réactifs. 1. Oxalate de sodium 0,1-n. 2. Chlorure de sodium 0,85%. 3. Chlorure de calcium 0,025-n. 4. Héparine standard de Toronto (sel sodique d'une héparine purifiée par la brucine) qui possède par définition une activité de 130 u. a. c.⁵⁾ mg. Nous utilisons des solutions de 10, 20 et 50 γ/cm^3 dans du chlorure de sodium 0,85%. 5. Thromboplastine: nous utilisons une thromboplastine extraite du cerveau de lapin⁶⁾. On introduit le contenu d'une ampoule (0,15 g d'extrait) dans un petit tube à centrifuger. On y ajoute 8 cm^3 de chlorure de sodium 0,85% et remue doucement pour mettre la poudre en suspension. On place le tube dans un bain-marie à 45 – 50° durant 10 min. en remuant de temps en temps, puis centrifuge 30 sec. sans dépasser 2000 t/min. On décante le liquide opalescent, que l'on conserve gelé dans le compartiment réfrigérateur d'une armoire frigorifique. Au moment de l'emploi on réactive la thromboplastine par chauffage de 2 min. à 45° .

¹⁾ R. Willstätter & G. Schudel, B. 51, 780 (1918).

²⁾ A. J. Quick, J. Am. Med. Assoc. 110, 1658 (1938).

³⁾ S. Shapiro, B. Sherwin, M. Redish & H. Campbell, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 50, 85 (1942); S. Shapiro, Exper. Med. and Sur. 2, 103 (1944).

⁴⁾ R. B. H. Gradwohl, Dir. Gradwohl School of Lab. and X-Ray Technique, St. Louis, Missouri, «The Estimation of Prothrombin Time in Anticoagulant Therapy» (1950).

⁵⁾ Unités anticoagulantes (anticoagulant units).

⁶⁾ Difco Laboratories, Detroit, Mich.

Technique de l'analyse. On utilise du sang humain oxalaté (0,5 cm³ d'oxalate pour 4,5 cm³ de sang veineux). On le centrifuge 10 min. à 2500 t/min., puis sépare le plasma. Durant le dosage, tous les réactifs sont conservés au thermostat à 37°. On introduit dans le premier tube à essai: 0,1 cm³ de plasma, 0,2 cm³ de chlorure de sodium 0,85%, 0,1 cm³ de thromboplastine, 0,1 cm³ de chlorure de calcium 0,025-n.

Au moment où on introduit le chlorure de calcium, on déclenche le compteur. Pour bien mélanger les réactifs on agite au moyen d'un fil de platine ou d'une fine tige de verre recourbée. On fait passer la tige alternativement le long des parois du tube en partant du fond. On arrête la montre au moment où le caillot de fibrine se forme. On a alors de «temps de prothrombine». Dans les conditions décrites ci-dessus, le temps de prothrombine normal est de 18 à 20 sec. On répète l'opération en introduisant dans les tubes suivants des quantités croissantes d'héparine (tableau V). On remplace ensuite l'héparine par l'anticoagulant envisagé.

Tableau V.

Plasma cm ³	Thrombo- plastine cm ³	NaCl 0,85% cm ³	CaCl ₂ 0,025-n. cm ³	Hépar. γ/cm ³	Hépar. cm ³	Hépar. γ	Temps sec.
0,10	0,10	0,20	0,10	—	—	—	18,0
0,10	0,10	0,10	0,10	10	0,10	1	18,6
0,10	0,10	—	0,10	10	0,20	2	20,5
0,10	0,10	0,05	0,10	20	0,15	3	21,4
0,10	0,10	—	0,10	20	0,20	4	24,5
0,10	0,10	0,10	0,10	50	0,10	5	27,0
0,10	0,10	0,08	0,10	50	0,12	6	32,9
0,10	0,10	0,06	0,10	50	0,14	7	37,0
0,10	0,10	0,05	0,10	50	0,15	7,5	45,0
0,10	0,10	0,04	0,10	50	0,16	8	49,5
0,10	0,10	0,02	0,10	50	0,18	9	>60

Nous remercions vivement le Dr *R. Della Santa*, médecin-adjoint au Centre de Transfusion Sanguine de Genève, de l'intérêt qu'il a pris à ce travail et de l'aide qu'il nous a apportée pour les essais «in vivo».

SUMMARY.

1. Different methods of sulfation of chondroitin sulfate have been studied. The use of SO₂—SO₃ or SO₂—SO₃HCl mixtures as sulfating agents, hitherto not used, gave the best results.

2. Chondroitin sulfate, sulfated according to this method, contains from 12 to 17% sulfur. It has a molecular weight of 26,000 corresponding to a degree of polymerisation of 50 aldobionic residues.

3. In the «in vitro» as in the «in vivo» assays, sulfated chondroitin sulfate acts in the same way as heparin. Its anticoagulant activity amounts to about 50% of that of heparin.

4. Different methods of «in vitro» analysis of anticoagulant activity have been studied. The method whose results conform best with the «in vivo» assays, is the so-called «thromboplastin method».

Laboratoires de Chimie inorganique et organique
de l'Université de Genève.