



ÉCOLE NATIONALE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

**ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA NEUROTOXINE V
DU SCORPION ANDROCTONUS
MAURETANICUS MAURETANICUS.**

MÉMOIRE

Présenté et soutenu publiquement le **Novembre 1979**

devant L'ÉCOLE NATIONALE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

par

Lamine SIDIBE

Pour obtenir le Grade de Pharmacien
(Diplôme d'État)

M M. les Professeurs J. JOSSELIN **Président**

F. MIRANDA
Docteur M. SIMAGA
Docteur B. HAIDARA } **Examineurs**

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI

ANNEE ACADEMIQUE 1978 - 1979

Directeur Général	: Professeur Aliou BA
Directeur Général Adjoint	: Professeur Bocar SALL
Secrétaire Général	: Monsieur Godefroy COULIBALY
Conseiller Technique	: Professeur Philippe RANQUE

PROFESSEURS MISSIONNAIRES

Professeur Bernard BLANC	: Gynécologie-Obstétrique
Professeur Sadio SYLLA	: Anatomie-Dissection
Professeur André MAZER	: Physiologie
Professeur Jean-Pierre BISSET	: Biophysique
Professeur François MIRANDA	: Biochimie
Professeur Michel QUILICI	: Immunologie
Professeur Humbert GIONO-BARBER	: Pharmacodynamie
Professeur Jacques JOSSELIN	: Biochimie
Professeur Oumar SYLLA	: Chimie organique
Professeur GRAS	: Toxicologie-Hydrologie
Docteur Bernard LANDRIEU	: Biochimie
Docteur J.P. REYNIER	: Pharmacie Galénique
Docteur Mme P. GIONO-BARBER	: Anatomie-Physiologie Humaines
Docteur Mme Thérèse FARES	: Anatomie-Physiologie Humaines
Docteur EMile LOREAL	: O.R.L.
Docteur Jean DELMONT	: Santé Publique

PROFESSEURS TITULAIRES RESIDANT A BAMAKO

Professeur Aliou BA	: Ophtalmologie
Professeur Bocar SALL	: Orthopédie-Traumatologie-Anatomie
Professeur Mamadou DEMBELE	: Chirurgie Générale
Professeur Mohamed TOURE	: Pédiatrie
Professeur Souleymane SANGARE	: Pneumo-Phtisiologie
Professeur Mamadou KOUMARE	: Pharmacologie-Matières Médicales
Professeur P. SAINT-ANDRE	: Dermatologie-Vénérologie-Léprologie
Professeur Philippe RANQUE	: Parasitologie-Zoologie
Professeur Bernard DUFLO	: Pathologie Médicale-Thérapeutique

ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Docteur Aly GUINDO	: Sémiologie Digestive
Docteur Abdoulaye AG-RHALY	: Sémiologie Rénale
Docteur Sory KÉITA	: Microbiologie
Docteur Yaya FOFANA	: Microbiologie
Docteur Moctar DIOP	: Sémiologie Chirurgicale
Docteur Balla COULIBALY	: Pédiatrie - Médecine du Travail
Docteur Bénitiéni FOFANA	: Obstétrique
Docteur Mamadou Lamine TRAORE	: Gynécologie-Obstétrique-Méd.Légale
Docteur Boubacar Cisse	: Dermatologie
Docteur Yacouba COULIBALY	: Stomatologie
Docteur Sidi Yaya SIMAGA	: Santé Publique
Docteur Sanoussi KONATE	: Santé Publique
Docteur Issa TRAORE	: Radiologie
Docteur Mamadou Kouréïssi TOURE	: Sémiologie Cardio-Vasculaire
Docteur Siné BAYO	: Histologie-Embryologie-Anapath.
Madame KEITA (Oulématou) BA	: Biologie Animale
Madame DIABY	: Santé Familiale
Monsieur Cheick Tidiani TANDIA	: Hygiène du Milieu

CHARGES DE COURS

Docteur L. AVRAMOV	: Psychiatrie
Docteur Christian DULAT	: Microbiologie
Docteur Patrick DEFONTAINE	: Physiologie-Anesthésie-Réanimation
Docteur Marie-Colette DEFONTAINE	: Gynécologie-Hématologie
Docteur Isack Mamby TOURE	: Microbiologie
Docteur Gérard TRUSCHEL	: Anatomie-Traumatologie-Sémio.Chir.
Docteur Henri DUCAM	: Pathologie Cardiovasculaire
Docteur Boukassoum HAIDARA	: Galénique-Chimie Organique
Docteur Elisabeth ASTORQUIZA	: Epidémiologie
Docteur Hamady Modi DIALLO	: Chimie Analytique
Docteur Brigitte DUFLO	: Sémiologie digestive
Professeur Tiémoko MALLET	: Mathématiques
Professeur Alévé GUINDO	: Mathématiques
Professeur Amadou Baba DIALLO	: Physique
Professeur N'Golo DIARRA	: Botanique-Cryptogamie-Biologie Végét.
Professeur Ibrahima TOURE	: Physique
Professeur Lassana KEITA	: Physique
Professeur Souleymane TRAORE	: Physiologie Générale
Professeur Daouda DIALLO	: Chimie Générale - Minérale

A LA MEMOIRE DE MON PERE ET DE MA MERE.

A MESDAMES , Assitan SIDIBE et Fatimata COULIBALY,

qu'elles trouvent ici l'expression de mon sentiment de gratitude pour tous les sacrifices auxquels elles ont consenti pendant la durée de mes études.

A MES ENFANTS.

A MON NEVEU Tonko SIDIBE,

qui m'a beaucoup aidé durant mes études, qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

A LA MEMOIRE DE MONSIEUR MOUSSA AROUNA SANGARE,

*Combien serait-il heureux de partager avec
moi la joie de ce jour inoubliable.*

A TOUS MES FRERES ET SOEURS,

mes remerciements chaleureux.

A MONSIEUR ET MADAME DIAKITE SATIQUI,

*Qu'ils trouvent ici l'expression de mes
vifs remerciements pour m'avoir rendu le
séjour en France, facile et très agréable.*

MES REMERCIEMENTS VONT A TOUS MES AMIS QUI, D'UNE
MANIERE OU D'UNE AUTRE M'ONT AIDE DURANT MES ETUDES.

JE VOUDRAIS REMERCIER PARTICULIEREMENT NOTRE MAITRE,
LE PROFESSEUR ALIOU BA, DIRECTEUR GENERAL DE L'ECOLE
NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE,

*dont le seul souci est la bonne formation
de ses étudiants.*

MES REMERCIEMENTS VONT A TOUS LES PROFESSEURS DE
L'ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE.

A TOUT LE PERSONNEL DE LA DIRECTION DE L'ECOLE
NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE,

qui sont dévoués à notre cause.

*Qu'ils trouvent ici l'expression de ma
gratitude.*

MES REMERCIEMENTS VONT A TOUT LE PERSONNEL DU
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE DE LA FACULTE DE MEDECINE
SECTEUR NORD DE MARSEILLE;

*pour nous avoir rendu très agréable
notre séjour parmi eux.*

JE VOUDRAIS REMERCIER PARTICULIEREMENT
MONSIEUR JEAN-PIERRE ROSSO,

*pour m'avoir parfaitement encadré
pendant la préparation de ce mémoire.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MIRANDA,

*qui a bien voulu nous proposer ce sujet
et qui nous a acceptés dans son labora-
toire et, qui enfin, a déployé des efforts
inestimables dans tout le domaine pour
que nous puissions mener à bien ce travail,*

*Qu'il reçoive ici toute notre gratitude
et tous nos remerciements.*

TABLE DES MATIERES

	<u>PAGES</u>
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE - METHODES DE PURIFICATION ET DE DETERMINATION DE LA SEQUENCE D'UNE PROTEINE	2
CHAPITRE I : PRINCIPES GENERAUX DE LA PURIFICATION D'UNE PROTEINE	3
1 - Procédés de séparation basés sur la taille moléculaire	3
A - Dialyse et ultracentrifugation	3
B - Centrifugation en gradient de densité	3
C - Chromatographie d'exclusion moléculaire	4
2 - Procédés de séparation basés sur les diffé- rences de solubilité	5
A - La précipitation isoélectrique	5
B - Dissolution par les sels (salting-in) et relargage (salting out)	6
3 - Procédés de séparation basés sur la charge électrique	6
A - Les méthodes électrophorétiques	6
B - La chromatographie sur échangeurs d'ions	8
4 - Séparation des protéines par absorption sélective	8
5 - Procédé de séparation basé sur la spécificité du ligand : chromatographie d'affinité	9
CHAPITRE II : DETERMINATION DE LA COMPOSITION GLOBALE DE LA PROTEINE EN AMINO-ACIDES	10
1 - Les anciennes méthodes	10
2 - Les méthodes chromatographiques	10

	<u>PAGES</u>
CHAPITRE III : DETERMINATION DES AMINO-ACIDES-N-TERMINAUX	12
1 - La dénitrophénylation	12
2 - La réaction de dansylation	13
3 - Méthode de dégradation d'Edman	15
A - Réduction de la protéine	15
B - Alkylation	15
C - Dessalage	15
D - Contrôle de la réaction d'alkylation	15
E - Détermination automatique des séquences d'acides aminés en phase liquide	17
- couplage	17
- clivage	18
- conversion	21
F - Méthodes d'identification des PTH-acides aminés	22
I - Identification par chromatographie en couche mince	22
1 - Techniques chromatographiques	22
2 - Révélation	22
II - Identification par chromatographie gazeuse	23
1 - Appareillage	23
2 - Résolutions des PTH-acides aminés	24
3 - Silylation des PTH-acides aminés	24
III - Identification des PTH-acides aminés par chromatographie liquide à haute pression	25
1 - Appareillage	25
2 - Identification des PTH-acides aminés par HPLC	26
a) Comparaison de la HPLC avec d'autres méthodes chromatographiques d'identification	26
b) Systèmes chromatographiques	27
IV - Identification des PTH-acides aminés de la phase aqueuse	28
1 - Méthodes d'analyse	28
2 - Colorations spécifiques	28
 CHAPITRE IV : DETERMINATION DES AMINO-ACIDES C. TERMINAUX	 30
1 - METHODE DES CARBOXYPEPTIDASES	30
2 - Méthode de l'hydrazinolyse	30

	<u>PAGES</u>
CHAPITRE V : ETUDE DES PEPTIDES	32
1 - Hydrolyse chimique	32
2 - Hydrolyse enzymatique	32
a) La trypsine	32
b) La chymotrypsine	32
c) La pepsine	33
d) La protéase d'origine staphylococcique	33
3 - Purification des peptides	33
4 - Composition en amino-acides	33
5 - Détermination de la séquence	33
 DEUXIEME PARTIE - RESULTATS EXPERIMENTAUX	 35
A - PURIFICATION	36
B - CONTROLE DE LA PURIFICATION	36
C - ETUDE DE LA SEQUENCE	38
1 - Réduction et carboxyméthylation de la toxine V	38
2 - Détermination des amino-acides N- terminaux	38
3 - Identification des PTH-amino-acide	39
4 - Digestion de la protéine par une protéase de staphylococcus aureus	39
5 - Séparation des peptides	39
6 - Détermination de l'amino-acide C-terminal	42
7 - Résultats des différents séquençages	42
a) Séquençage de la protéine	44
b) Séquençage des peptides	44
8 - Etablissement de la séquence primaire complète de la toxine V d'androctonus mauretanicus mauretanicus	44

CONCLUSION

45

TROISIEME PARTIE - BIBLIOGRAPHIE

A - Ouvrages généraux consultés

B - Mémoires originaux cités dans le texte

ASSOCIATION ANCIENS EXTERNES DES HOPITAUX DE MARSEILLE

Service Dactylographie-Offset

25, Rue Bravet - 13005 MARSEILLE - Tél. : 42.58.60

INTRODUCTION

Les neurotoxines sont des outils très importants car leur étude ouvre la voie à une meilleure connaissance de l'aspect moléculaire de la conduction et de la transmission nerveuses.

En ce qui concerne les neurotoxines du venin de scorpion, il est maintenant établi que leur action se manifeste sur les canaux sodium et potassium des axones (ADAM et coll. (1966) ; KOPPENHÖFFER et SCHMIDT (1968 a. et b). Ceci explique l'intérêt croissant que les pharmacologistes moléculaires portent aux neurotoxines animales dont l'utilisation aide de plus en plus à la compréhension du fonctionnement des membranes excitables.

L'objet de notre travail, qui est l'établissement de la structure primaire de la toxine V du venin du scorpion d'Afrique du Nord *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Amm), entre dans le cadre des recherches entreprises dans le laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine, Secteur Nord, de l'Université d'AIX-MARSEILLE, sur les venins des scorpions.

P R E M I E R E P A R T I E

METHODES DE PURIFICATION ET DE DETERMINATION
DE LA SEQUENCE D'UNE PROTEINE

CHAPITRE I

PRINCIPES GENERAUX DE LA PURIFICATION D'UNE PROTEINE

1 - PROCÉDES DE SEPARATION BASES SUR LA TAILLE MOLECULAIRE

A - Dialyse et Ultrafiltration

Les protéines globulaires en solution peuvent être facilement séparées des solutés de faible poids moléculaire par dialyse :

Cette technique utilise une membrane semi-perméable qui retient les grosses molécules et laisse passer les molécules de taille inférieure.

Une autre méthode de séparation des protéines d'avec les petits molécules est l'ultrafiltration dans laquelle une pression ou une force centrifuge est utilisée pour filtrer les molécules de solutés à travers une membrane semi-perméable.

B - Centrifugation en gradient de densité

En solution, les protéines ont tendance à sédimenter lorsqu'on les soumet à des forces centrifuges élevées qui s'opposent à la tendance à la diffusion. Il est donc possible de séparer un mélange de protéines par des méthodes de centrifugation.

Dans la plupart des techniques courantes, un gradient de densité continu de saccharose est d'abord préparé dans un tube à centrifuger en plastique par un système qui mélange une solution concentrée de saccharose à de l'eau dans un rapport décroissant au fur et à mesure que le tube est rempli, de telle sorte que la densité du milieu soit la plus grande à l'extrémité inférieure du tube.

Le mélange de macromolécules est déposé à la partie supérieure du gradient.

La centrifugation à grande vitesse du tube dans un rotor en position horizontale, amène chaque type de macromolécules à sédimenter à sa propre vitesse déterminée essentiellement par le poids de la particule, mais aussi par sa densité et sa forme, ce qui se traduit par la constitution de bandes séparées ou zones.

Habituellement, la centrifugation est arrêtée lorsque l'équilibre est atteint, c'est-à-dire lorsque les bandes deviennent immobiles.

La position des bandes protéiques peut être localisée optiquement ou par recueil soigneux du contenu du tube en perçant un trou de petite taille à son extrémité inférieure : les échantillons sont collectés et analysés. Le tube en plastique peut également être congelé et coupé en couches minces pour une analyse.

C - Chromatographie d'exclusion moléculaire

L'une des méthodes les plus utilisées et les plus efficaces pour séparer les protéines les unes des autres par leur poids et leur taille est la chromatographie d'exclusion moléculaire.

Dans la chromatographie d'exclusion moléculaire, également appelée "gel filtration" ou "filtration moléculaire", le mélange de protéines est dissous dans un tampon convenable et va traverser par gravité une colonne contenant des billes tassées d'un matériel inerte extrêmement hydraté et polymérisé, qui a d'abord été lavé et équilibré avec le même tampon.

Les colonnes habituellement utilisées sont formées de Sephadex (nom commercial d'un dérivé polysaccharidique) ou de Biogel (nom commercial du polyacrylamide), les billes de gel présentant différents degrés de porosité interne.

Dans les colonnes, les protéines de différentes tailles moléculaires pénètrent plus ou moins dans les pores internes des billes et ainsi traversent la colonne à différentes vitesses.

Les très grandes molécules protéiques ne peuvent entrer dans les pores des billes et on dit qu'elles sont "exclues" : elles sortent dans le volume d'exclusion ou "volume mort" de la colonne, défini comme le volume de la phase aqueuse située à l'extérieur des billes.

Inversement, les petites molécules peuvent entrer librement dans les pores des billes. Les petites protéines sont retardées par la colonne, tandis que les plus grosses passent rapidement au travers.

A partir des mesures de la concentration protéique dans les fractions de l'éluat, une courbe d'éluat peut être obtenue.

2 - PROCEDES DE SEPARATION BASES SUR LES DIFFERENCES DE SOLUBILITE

La solubilité des protéines en solution est fonction, en dehors de leurs caractéristiques intrinsèques:

- du pH,
- de la force ionique,
- des propriétés électriques du solvant et
- de la température.

Ces variables peuvent être utilisées pour séparer les constituants d'un mélange de protéines, car chaque protéine possède une composition particulière en amino-acides qui détermine son comportement comme électrolyte.

A - La précipitation iso-électrique

Les protéines ont des pH iso-électriques qui diffèrent selon leur contenu en résidus d'acides aminés possédant des chaînes latérales ionisables.

Elles peuvent donc être séparées les unes des autres par une précipitation iso-électrique.

Quand le pH d'un mélange protéique est ajusté au pH iso-électrique de l'un de ses composants, ce composant aura tendance à précipiter, laissant en solution les protéines dont le pH iso-électrique est supérieur ou inférieur au pH choisi.

B - Dissolution par les sels (salting in) et relargage (salting out) des protéines

Les sels neutres agissent sur la solubilité des protéines globulaires.

A faible concentration, les sels augmentent la solubilité de nombreuses protéines, phénomène appelé dissolution par les sels ou "salting in".

Les sels d'ions bivalents, comme le chlorure de magnésium $MgCl_2$ et le sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$ sont les plus efficaces pour provoquer un "salting in".

L'action des sels neutres sur la solubilité des protéines est fonction de leur force ionique qui mesure à la fois la concentration et le nombre de charges électriques sur les cations et les anions fournis par les sels.

L'effet de "salting-in" est dû à des modifications de la tendance spontanée d'ionisation des chaînes latérales dissociables sur la protéine.

Par ailleurs, lorsque la force ionique augmente, la solubilité d'une protéine commence à diminuer. A une force ionique suffisamment élevée, une protéine peut être presque complètement précipitée : cet effet est appelé relargage ou "salting-out".

3 - PROCEDES DE SEPARATION BASES SUR LA CHARGE ELECTRIQUE

La séparation de protéines selon leur charge électrique dépend en fin de compte de leurs propriétés acido-basiques. Les protéines diffèrent par leur composition et leur séquence en amino-acides et chacune d'elles possède ainsi des propriétés acido-basiques distinctes.

A - Les méthodes électrophorétiques

Il existe un grand nombre de formes différentes d'électrophorèse (également appelée ionophorèse) utilisées pour la séparation et l'analyse d'un mélange de protéines.

- L'électrophorèse "libre"

Le prototype de toutes ces méthodes modernes est l'électrophorèse "libre" ou de "frontière", d'abord développée par A. TISELIUS, en Suède, en 1937. Dans l'électrophorèse "libre", une solution tampon d'un mélange de protéines est placée dans une cellule d'observation ayant la forme d'un U avec une couche de tampon pur placée au-dessus de la solution protéique. La cellule est immergée dans un bain à température constante, isolée des vibrations et un champ électrique est établi entre les électrodes, les protéines chargées négativement vont migrer vers l'anode et celles qui sont chargées positivement vers la cathode.

Afin d'obtenir un schéma complet de toutes les protéines dans un mélange, le pH du milieu est habituellement choisi de telle sorte que toutes les protéines migrent dans le même sens, mais avec des mobilités différentes.

- L'électrophorèse "de zone"

Dans l'électrophorèse de zone, la solution aqueuse de protéines est immobilisée dans une matrice ou support solide, matériel poreux hydraté qui possède une rigidité mécanique éliminant les anomalies dues à la convection ou à la vibration. En biochimie clinique, les plus largement utilisés de ces supports sont le papier filtre et les bandes d'acétate de cellulose.

L'électrophorèse est poursuivie jusqu'à ce que les principaux composés protéiques se séparent en zones, d'où le nom d'électrophorèse "de zone". La position et la quantification des protéines dans ces zones sont déterminées grâce à une coloration des protéines, la densité de coloration est proportionnelle à la quantité de protéines et peut être estimée avec un densitomètre.

En recherche fondamentale pour vérifier le degré de pureté d'une protéine, on utilise souvent l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La migration des protéines s'effectue à travers des gels hétérogènes, cylindriques et verticaux. Ceux-ci sont préparés à partir d'un monomère principal (acrylamide) et d'un monomère de liaison (N, N'-méthylène-bis-acrylamide) polymérisés, à l'abri de l'air, en présence d'un catalyseur (N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène diamine

ou TEMED) et d'un oxydant (persulfate d'ammonium). Le fractionnement des protéines, sous forme de disques résulte des différences de mobilité électrophorétique et d'un pouvoir de filtration du gel.

Après l'électrophorèse, la coloration des protéines s'effectue soit avec le noir amide, soit avec le bleu de coomassie.

L'évaluation quantitative est réalisable avec un densitomètre-intégrateur sur lequel s'adapte un disque spécial permettant la photométrie en transmission des électrophorégrammes. Un filtre intervient suivant le colorant utilisé :

- noir amide : filtre à 610 nm (écran rouge)
- bleu de coomassie : filtre à 560 nm (écran jaune vert).

B - La chromatographie sur échangeurs d'ions

Elle fut d'abord utilisée avec succès pour la séparation de mélanges de protéines par H.SOBER et E.PETERSON aux Etats-Unis en 1956. Les matériaux les plus communément utilisés pour la chromatographie des protéines sont des dérivés de cellulose préparés par synthèse. La diéthyl-amino-éthyl-cellulose (DEAE cellulose) contient des groupements chargés positivement à pH 7 et se comporte ainsi comme un échangeur d'anions. A l'inverse la carboxy méthyl-cellulose (CM-cellulose) contient des groupements chargés négativement à pH neutre et fonctionne donc en échangeur de cations.

Des mélanges de protéines sont séparés et leurs composants individuels successivement élués sur des colonnes de DEAE-cellulose par exemple en passant des séries de tampons de pH décroissant ou une série de solutions de sels de force ionique croissante qui ont pour effet de diminuer les liaisons des protéines anioniques avec le support échangeur.

4 - SEPARATION DES PROTEINES PAR ADSORPTION SELECTIVE

Les protéines peuvent être absorbées, puis sélectivement éluées sur des colonnes d'un matériel finement divisé, relativement inerte, qui possède une grande surface par rapport à la taille des

molécules. Il s'agit de substances non polaires (comme le charbon) ou de substances polaires (comme les gels de silice ou d'alumine).

Le plus largement et le plus efficacement utilisé de ces absorbants pour la purification des protéines, est une forme cristalline du phosphate de calcium, l'hydroxyapatite, la même substance minérale que celle trouvée dans l'os. Vraisemblablement les groupements chargés négativement des molécules protéiques se lient aux ions Ca^{2+} dans les cristaux de l'hydroxyapatite. Les protéines peuvent être éluées, à partir des colonnes d'hydroxyapatite, à l'aide de tampons phosphates.

5 - PROCEDE DE SEPARATION BASE SUR LA SPECIFICITE DU LIGAND : CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Certaines protéines peuvent être isolées à partir d'un mélange très complexe et amenées à un degré élevé de purification, souvent en une seule étape par la chromatographie d'affinité. Cette méthode est basée sur des propriétés biologiques de certaines protéines, c'est-à-dire leur capacité de fixer non covalentiellement et spécifiquement une autre molécule appelée "ligand".

Cette méthode dépend ainsi de l'affinité biologique de la protéine pour un ligand caractéristique. La protéine se lie spécifiquement au composé fixé sur la colonne tandis que les autres molécules traversent cette dernière sans être retenues : l'éluion de la protéine étudiée peut être ensuite obtenue de telle sorte que l'on doit ensuite l'éluier par une solution contenant la molécule de ligand libre.

CHAPITRE II

DETERMINATION DE LA COMPOSITION GLOBALE DE LA PROTEINE EN AMINO-ACIDES

1 - LES ANCIENNES METHODES

Les amino-acides basiques étaient précipités par l'acide phosphotungstique et fractionnés ensuite. Les amino-acides neutres et les amino-acides acides étaient estérifiés par l'éthanol et l'acide chlorhydrique, les esters étant ensuite séparés par distillation fractionnée.

Les techniques microbiologiques de séparation des amino-acides utilisaient les cultures microbiennes : la concentration de l'acide amino-acide était évaluée soit par la méthode turbidimétrique, soit par titrage de l'acide lactique formé (cas d'utilisation d'une culture de *Lactobacillus*).

2 - LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

En 1947, la technique de chromatographie de partage sur papier fut introduite par CONSDEN et collaborateurs.

La technique de séparation par chromatographie d'échange d'ions s'est montrée encore plus efficace.

Dans une ampoule spéciale pour hydrolyse, on dispose un échantillon de la protéine isolée et purifiée et on ajoute de l'acide chlorhydrique 6N très pur ; on congèle et, après avoir fait le vide dans l'ampoule, on la scelle et on la place à l'étuve à 110°C pendant 20 heures ou 70 heures. Ensuite, on sort l'ampoule, on l'ouvre et on sèche le contenu à l'aide d'un évaporateur rotatif.

On reprend l'hydrolysate dans le tampon d'analyse et on le chromatographie sur échangeur d'ions.

Il sort de l'enregistreur automatique un diagramme présentant une série de pics dont chacun représente un amino-acide donné. Chaque amino-acide est ensuite quantifié par rapport à une analyse standard.

Les résultats correspondent à la composition globale de la protéine en amino-acides.

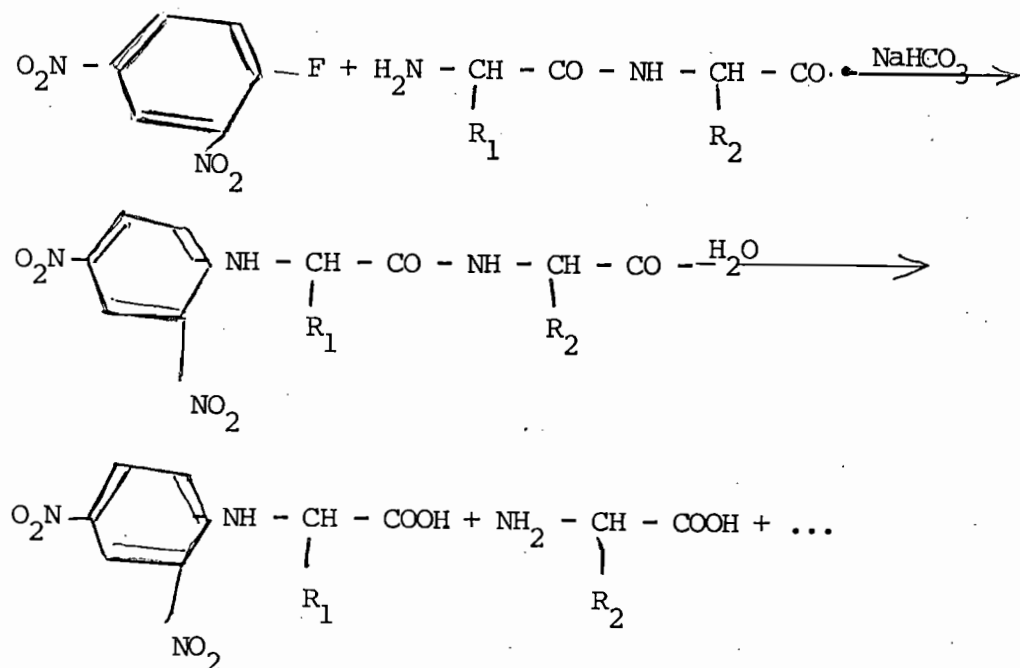
CHAPITRE III

DETERMINATION DES AMINO-ACIDES N-TERMINAUX

On peut faire subir à une protéine diverses modifications chimiques en vue de la détermination des amino-acides N-terminaux. Ainsi plusieurs méthodes ont été décrites par différents auteurs.

1 - LA DINITROPHENYLATION

En 1945, SANGER a montré que le 1-fluoro-2-4-dinitrobenzène (DNFB) réagissait quantitativement avec les fonctions aminées libres de l'insuline dans certaines conditions et qu'une molécule de dinitro-phényl (DNP)-glycine, DNP-phénylalanine et ϵ -DNP-lysine pouvaient être isolées à partir de la molécule de DNP-insuline par hydrolyse acide.



On pèse l'échantillon de protéine (1 à 2 μ moles) et un poids équivalent de bicarbonate de sodium. On mélange les deux produits et on les dissout dans l'eau. A ce mélange on ajoute deux volumes de solution éthanolique à 5% de 1-fluoro-2-4-dinitrobenzène (DNFB) ; on laisse 2 heures à la température ambiante en agitant ; on acidifie ensuite par addition de quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré.

Les DNP-protéines sont habituellement insolubles dans ces conditions. On va donc centrifuger le mélange et recueillir le précipité. Ce précipité va être lavé successivement avec de l'éther et de l'alcool éthylique afin de la débarrasser de l'excès de DNFB et de DN-phénol formé au cours de la réaction. On le soumet enfin successivement à un lavage avec de l'eau, de l'acétone et de l'éther.

La DN-protéine obtenue est séchée dans un cristalliseur sur Cl_2Ca ou P_2O_5 .

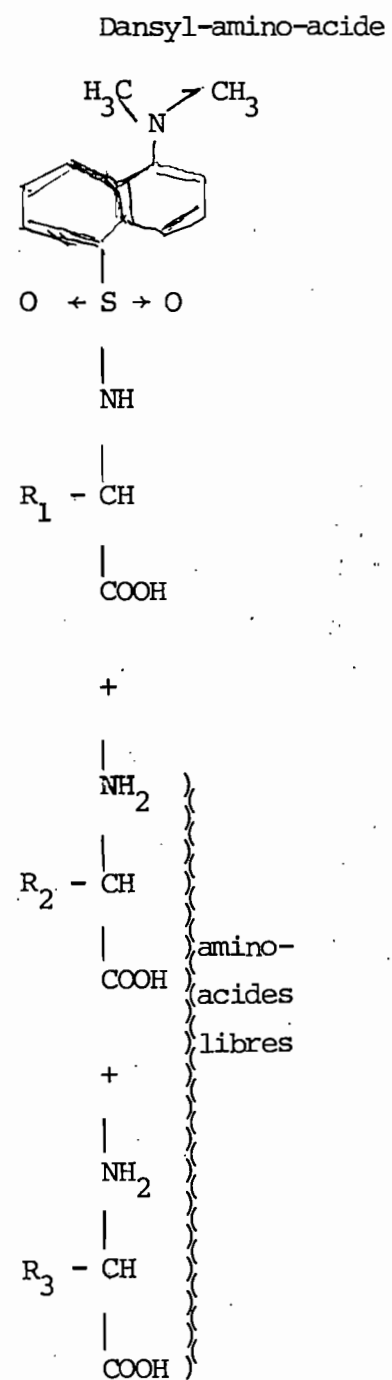
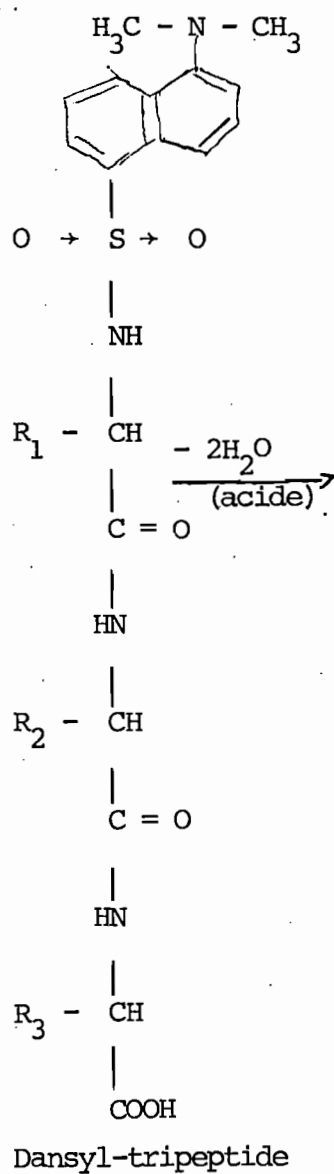
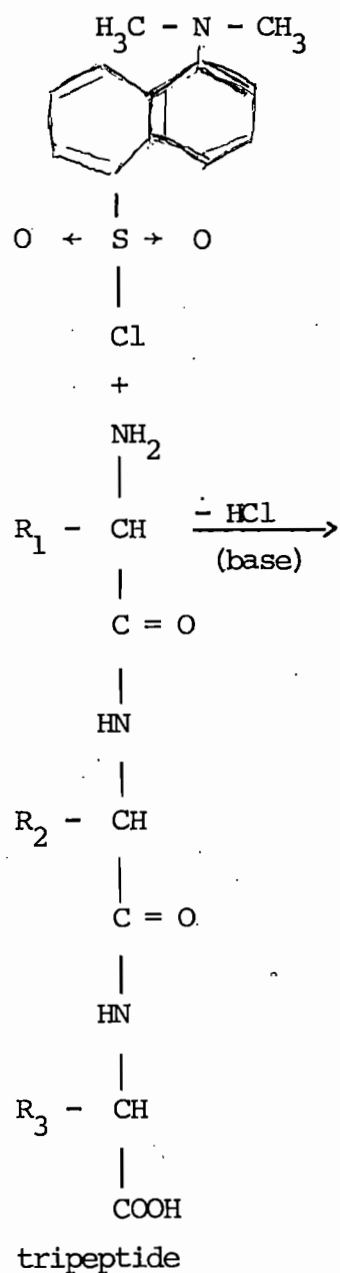
2 - LA REACTION DE DANSYLATION

Le chlorure de 1-diméthylaminonaphtène-5 sulfonyl, appelé chlorure de dansyl, est utilisé comme réactif de marquage.

Les groupements dansyl sont extrêmement fluorescents et le dérivé dansylé de l'acide-amino N-terminal pourra donc être détecté et mesuré avec une grande précision par des méthodes fluorométriques.

Le procédé de dansylation est cent fois plus sensible que la méthode de Sanger.

Exemple : Identification de l'acide-amino N-terminal d'un tripeptide sous forme de dérivé dansylé.



3 - METHODE DE DEGRADATION D'EDMAN

Actuellement la méthode la plus largement utilisée comme réaction de marquage de l'acide-amino N-terminal est celle décrite par P.EDMAN (1956).

La protéine doit être réduite et alkylée au préalable.

A - Réduction de la protéine

La protéine est mise dans un milieu réducteur et dénaturant : le milieu réducteur permet la coupure des ponts disulfures et la libération des groupements - SH ; le milieu dénaturant permet le déplissement de la molécule.

B - Alkylation

L'alkylation des résidus de cystéine éventuellement formés s'opère dans le même milieu tampon que celui utilisé pour la réduction.

On ajoute à la protéine l'agent d'alkylation fraîchement préparé.

Plusieurs méthodes d'alkylation ont été décrites :

- . méthode à l'acide iodo-acétique.
- . méthode à l'iodure de méthyle.

C - Dessalage

Afin de purifier la protéine alkylée, on la fait passer sur un réseau de mailles de Sephadex de taille appropriée duquel elle sera exclue. Le dessalage a lieu en milieu acétique 1M. Les sels et les autres dérivés formés au cours de la réaction d'alkylation sont retardés et éliminés par la suite.

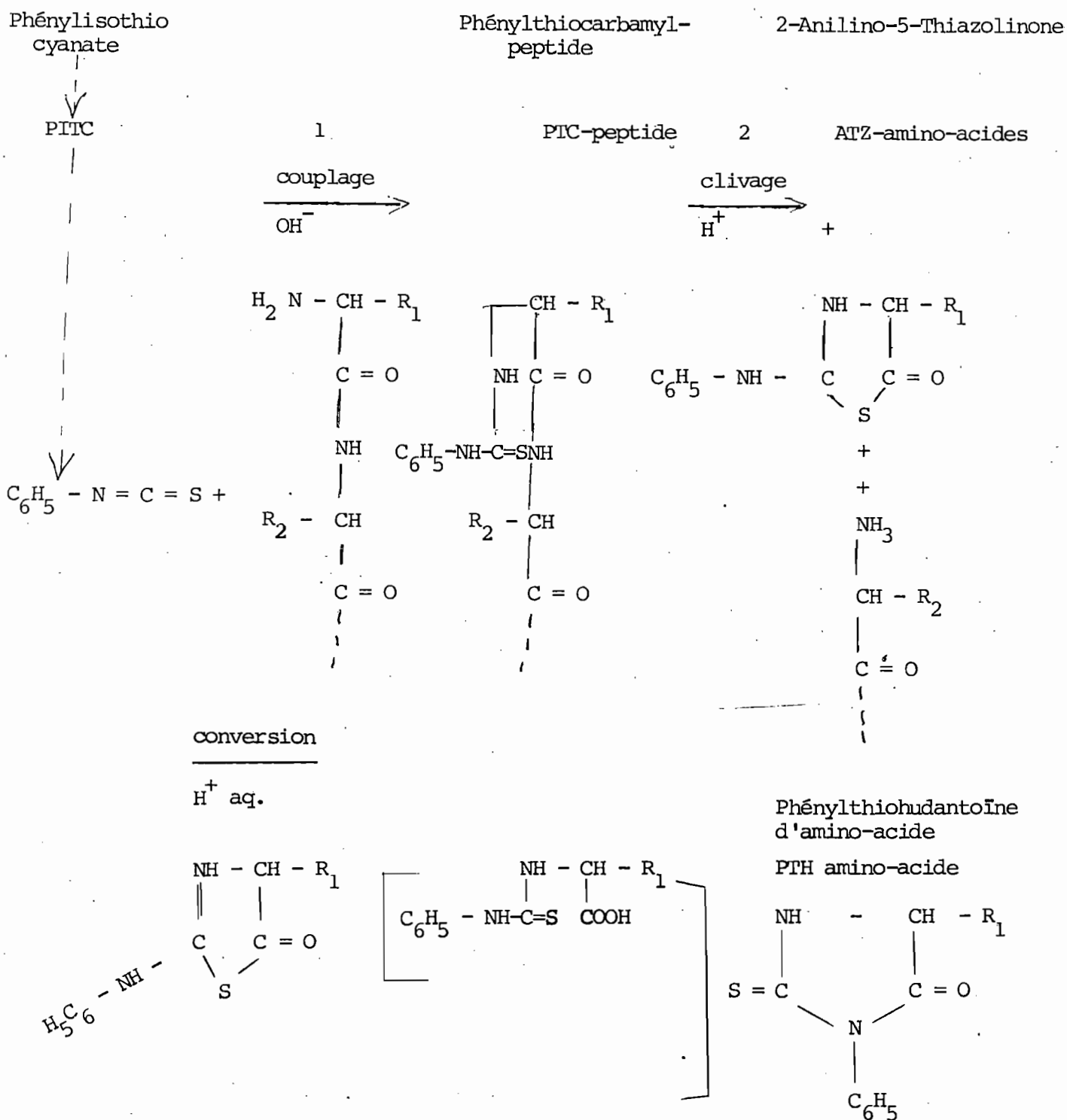
D - Contrôle de la réaction d'alkylation

Pour s'assurer que la réaction d'alkylation a été bien conduite, on prélève un échantillon de la protéine que l'on soumet à une hydrolyse acide totale. L'hydrolysate est ensuite chromat-

graphié et les amino-acides sont analysés.

La protéine alkylée est ensuite placée dans le séquenceur automatique pour y subir la dégradation d'EDMAN dont le principe est le suivant :

PRINCIPE DE LA DEGRADATION D'EDMAN



E - Détermination automatique des séquences d'acides-amino en phase liquide

La dégradation d'EDMAN s'effectue en 3 étapes dont 2 ont lieu dans le séquenceur automatique (EDMAN 1967) : il s'agit du couplage (du phénylisothiocyanate PITC avec la protéine) et du clivage (formation de l'ATZ).

La troisième étape se fait hors du séquenceur : il s'agit de la conversion de l'ATZ en PTH-acide aminé.

Le couplage

Le phénylisothiocyanate (PITC) étant très peu soluble et relativement instable en milieu aqueux alcalin, le mélange du réactif et du tampon de couplage est réalisé extemporanément dans la coupelle du séquenceur au début de chaque cycle, selon les modalités suivantes :

- . addition du PITC en solution dans le n-heptane (5 : 100 ; V/V) : le volume délivré doit permettre le recouvrement du film de protéine ou de peptide ;
- . vide restreint, suivi d'un léger séchage à l'azote : cela permet d'évacuer le contenu de la canalisation de PITC et d'éliminer partiellement le n-heptane ;
- . addition du tampon de couplage (9,0 < pH < 9,6) : le volume délivré doit également permettre le recouvrement du film de protéine.

Elimination des constituants du tampon, du PITC en excès et de ses dérivés secondaires

A cet effet, la procédure suivante est mise en oeuvre :

- vide progressif suivi d'un balayage d'azote sous vide partiel ; il en résulte une certaine évaporation de divers constituants du mélange réactionnel (eau, composés organiques tels que le n-propanol la pyridine..) ;
- addition du benzène : au fur et à mesure de son ascension le long du film de PTC-protéine, le benzène solubilise les constituants organiques. Lorsqu'il atteint la gorge de la coupelle, il est collecté et récupéré dans le flacon-poubelle ;

- vide progressif, suivi d'un balayage d'azote sous vide partiel : assure l'élimination du benzène résiduel présent dans la coupelle et le séchage du film de PTC-protéine ;

- addition d'un deuxième solvant : un deuxième lavage par un solvant organique plus polaire que le benzène tel que l'acétate d'éthyle ou de butyle est nécessaire pour extraire le quadrol et éliminer toute trace de diphénylthiourée.

Le clivage

- addition d'un acide anhydre peu volatil (le volume délivré doit permettre le recouvrement du film de PTC-protéine). Les acides utilisés sont l'acide n-heptafluorobutyrique (HFBA) ou, plus rarement, l'acide n-heptafluoropropionique. La réaction de clivage est pratiquement immédiate ;

- vide progressif suivi d'un balayage d'azote sous vide partiel : cela permet d'évacuer le contenu de la canalisation de HFBA et d'évaporer partiellement l'acide.

Extraction et collecte des 2-anilino-5 thiazolinones (ATZ) des acides aminés

- addition du chlorobutane : au fur et à mesure de son ascension le long du film de protéine résiduelle, ce solvant solubilise l'ATZ-acide aminé qui sera collecté dans la gorge de la coupelle et récupéré dans le collecteur de fractions ;

- vide progressif suivi d'un balayage d'azote sous vide partiel : il permet l'évaporation du chlorobutane résiduel et le séchage du film de la protéine amputée d'un résidu sur laquelle sera effectué un nouveau cycle de dégradation.

Composition des tampons usuels

Tampon quadrol (N,N,N',N'-tétrakis- (2-hydroxypropyl) éthylène diamine 1,0 M acide trifluoroacétique (TFA), pH 9,0, n-propanol-eau (3 : 4 ; V/V), (EDMAN et BEGG 1967).

Tampon diméthylbenzylamine (DMBA)

D-M-B-A-n-propanol-eau (10 : 34 : 40 ; V/V/V), pH 9,4 (HERMODSON et coll. 1972).

Tampon diméthylallylamine (DMAA)

DMAA-n-propanol-eau (2 : 40 : 34 ; V/V/V), pH 9,4.

Le pH des tampons est ajusté avec de l'acide trifluoro-acétique pur ou de l'acide acétique glacial.

Avantages et inconvénients des trois types de tampons de couplage

a) Tampon quadrol 1,0M. Son pouvoir tampon est très ~~long~~ ^{bon} et l'on obtient des films de protéines très homogènes. Malheureusement l'extraction complète de ce tampon non volatil nécessite un lavage prolongé avec du benzène, puis de l'acétate d'éthyle. Par conséquent ce tampon ne convient pas à l'analyse séquentielle des peptides ou des protéines très hydrophobes qui peuvent être extraits lors de ces lavages prolongés.

b) Tampon DMBA. Son pouvoir tampon est correct et il a pour principal avantage d'être soluble dans le benzène. Il n'est donc pas nécessaire de recourir à un lavage par l'acétate d'éthyle pour l'éliminer. Ce tampon peut être utilisé pour l'analyse des protéines et des peptides hydrophobes.

c) Tampon DMAA. Ce tampon étant très volatil, il est nécessaire d'en rajouter de petites quantités en cours de la réaction de couplage, de façon à maintenir le pH du milieu réactionnel constant. Mais du fait de cette volatilité, la majeure partie du tampon peut être éliminée par évaporation sous vide et la quantité de benzène nécessaire pour le lavage du film est très réduite, ce qui limite au maximum les pertes de peptides. Toutefois, l'identification des PTH-acides aminés est rendue plus délicate en raison de l'accumulation des produits de dégradation secondaire. Il est utilisé pour l'analyse séquentielle des petits peptides.

Contrôle de la pureté des solvants

Peroxydes et aldéhydes sont nocifs pour la dégradation d'EDMAN. Leur présence dans les solvants peut être aisément dépistée. Néanmoins, le meilleur critère de qualité des produits est la réalisation satisfaisante d'une séquence sur une protéine témoin.

Test pour la présence de peroxydes (EDMAN et HENSCHEN 1975)

Solutions :

A : KI à 1% dans l'eau

B : à un gramme d'amidon soluble, on ajoute 5 ml d'eau, la pâte obtenue est transférée dans 200 ml d'eau bouillante.

L'ébullition est prolongée une minute.

La solution peut être conservée par addition de chloroforme (quelques gouttes).

Procédure :

Dans un tube à essai sont mélangés 2 ml de solvant et 1 ml de solution A.

L'ensemble est évaporée sous azote. Le solvant contient des peroxydes si une coloration bleue se développe à l'adjonction au résidu de 0,5 ml de solution B.

Test de Tollens pour la présence d'aldéhydes (EDMAN et HENSCHEN 1975)

Procédure :

A 5 ml de nitrate d'argent (AgNO_3) à 10% dans l'eau sont ajoutés 5 ml de soude à 10%.

De l'ammoniaque 3M est ajoutée goutte à goutte jusqu'à ce que le précipité se redissolve (≈ 5 ml) : 100 μ l de la solution ci-dessus sont ajoutés au même volume de solvant ; l'ensemble est laissé à l'obscurité une heure sous agitation.

La présence d'aldéhydes se traduit par l'apparition d'un précipité.

N.B. Au cours de la réaction de Tollens se forme du fulminate d'argent explosif.

La conversion

Comme il a été dit plus haut, c'est au cours de la conversion qu'est effectuée la transformation de la thiazolinone d'acide aminé en PTH-acide aminé.

La conversion peut être manuelle ou automatique.

a) Conversion manuelle

- La méthode de référence est celle décrite par EDMAN et HENSCHEN (1975).

La thiazolinone est évaporée à sec sous vide. Au résidu sont ajoutés 200 μ l d'acide chlorhydrique 1 N. Le tube est balayé par un courant d'azote, bouché puis incubé dix minutes à 80°C. Il est ensuite refroidi puis on pratique une extraction avec deux fois 1 ml d'acétate d'éthyle.

La phase organique et la phase aqueuse sont séparées l'une de l'autre puis évaporées à sec sous azote : dans la phase aqueuse restent les PTH-Arg, - His, Cys SO₃H, de la pyridyl, éthyl-cystéine et divers sous produits ; la phase organique contient tous les autres PTH-amino-acides.

- Une autre technique de conversion a été introduite en même temps que la méthode de détermination de la séquence en phase solide (LAURSEN, 1971). La conversion est effectuée par l'acide trifluoroacétique à 20% dans l'eau sous azote, à 80°C, pendant 10 minutes. L'extraction est remplacée par une chromatographie sur une petite colonne de DOWEX 50 (0,50 x 1 cm), en forme H⁺, mis en suspension dans le méthanol ; restent accrochés sur la résine, outre des sous-produits les PTH-Arg et - His qui peuvent être élués par une base volatile. Les PTH-ASp et -GIU sont partiellement estérifiés.

- D'autres méthodes de conversion ont encore été décrites :

- Méthode thermique pure : la thiazolinone évaporée est portée à 80°C pendant 30 minutes (GUEYER et TODD, 1975).
- Méthode thermique et acide : méthode identique à la précédente, mis à part l'adjonction à la thiazolinone de 5 µl d'acide trifluoroacétique (STRYDOM, 1977).

En milieu alcoolique rendu acide par le méthanol-HCl (1 : 10), à 55°C pendant 10 minutes, des PTH-ASp et -Glu sont totalement estérifiés (TARR, 1975).

b) Conversion automatique

Un seul système de conversion automatique a été installé : il a été décrit dans un séquenceur en phase liquide modifié.

F - Méthodes d'identification des PTH-acides aminés

I - Identification par chromatographie en couche mince

1 - Techniques chromatographiques : la chromatographie s'effectue en migration ascendante, un grand nombre de systèmes ont été décrits :

- sur gel de silice (méthode n°3)
(BRIDGEN et coll., 1975) : on utilise des plaques de 10 x 10 cm
solvants : pour les PTH-amino-acides apolaires chloroforme-méthanol (99 : 1 ; V/V) ; pour les PTH-amino-acides polaires : chloroforme-méthanol (88 : 12 ; V/V).
- sur gel de silice (méthode n°2)
(COHENSOLAL et BERNARD, 1973) ; on utilise des plaques de 6,3 x 6,3 cm pour tous les PTH-amino-acides, une première migration ascendante jusqu'aux 2/3 de la hauteur, en solvant 1 : chloroforme-méthanol (90 : 10 ; V/V), est suivie d'une seconde migration ascendante sur toute la hauteur, en solvant 2, chloroforme pur ; pour les PTH-amino-acides polaires, on effectue une seule migration ascendante sur toute la hauteur, en chloroforme-méthanol (80 : 20 ; V/V).

- sur gel de silice (méthode n°1), méthode historique d'EDMAN et BEGG (1967) ; on utilise des plaques de 20x 20 cm.
Solvant : formamide-xylène. On effectue une seule migration et la révélation se fait en lumière ultra-violet.
- sur polyamide (KULBE, 1974) : on utilise des plaques de 5 x 5 cm il s'agit d'une chromatographie bidimensionnelle :
1ère dimension : toluène-n-pentane-acide acétique (60 : 30 : 16 ; V/V/V) ;
2ème dimension : acide acétique à 25%.

2 - Révélation

- en lumière ultra-violette : plaques contenant un indicateur de fluorescence à 254 nm : on observe une tache violet sombre sur fond clair ; pour la méthode sur polyamide, on incorpore 25 mg par litre de 2- (4'-tert-butylphényl) - 5 - (4'-biphényl)- 1,3,4 oxadiazol. On observe une tache sombre sur fond clair à 254 nm.
- azide-amidon : plaque préalablement imprégnée d'une solution d'amidon soluble à 1% (p/V) et séchée ensuite 30 minutes à 80°C ; pulvérisation d'une solution d'azide de Na à 10% - iode 0,1 N-eau (15 : 10 : 25 ; V/V/V) : on observe des taches blanches sur fond brun.
- coloration à la ninhydrine (ROSEAU et PANTEL, 1969) : la pulvérisation d'une solution de ninhydrine (100 mg), collidine (5 ml) dans 100 ml d'éthanol absolu, suivie d'un chauffage de 15 minutes à 110°C, donne des taches du PTH-acide aminé.

II - Identification par chromatographie en phase gazeuse

1 - Appareillage

- Chromatographe en phase gazeuse. L'appareil classique est équipé d'un programmateur linéaire de température et d'un détecteur d'ionisation de flamme. L'hélium est généralement utilisé comme gaz vecteur. Il est nécessaire d'employer des colonnes en verre car les métaux catalysent la décomposition des PTH-acides aminés.
- Supports inertes et phases stationnaires. Différents supports et

phases stationnaires ont été testés. Le meilleur pouvoir de résolution a été obtenu avec du chromosorb W-HP 100/120 "mesh", imprégné de chlorophénylsilicone (S-P-400 à 10%).

(PISANO et BRONZERT, 1969).

(PISANO et coll. 1972).

2 - Résolution des PTH-acides aminés : les PTH-acides aminés peuvent être classés en 3 groupes d'après leur comportement chromatographique :

- Groupe I : comporte les PTH-acides aminés les plus volatils qui donnent une bonne réponse en ionisation de flamme et apparaissent sous forme de pics bien symétriques. Ce sont : les PTH-Ala, -Gly, -Val, -Pro, -He, Leu, -Met et -Phe. Seuls les PTH-Leu et -Ile ne sont pas différenciés en raison de leur pouvoir de rétentions sur la colonne à peu près identique.
- Groupe II : dans ce groupe figurent les PTH-acides aminés : PTH-Tyr, -Trp, Gln, -His, -Asn.
- Groupe III :
 - IIIa : PTH-Thr, -Ser, -Lys et -S-carboxy-méthyl-cystéine.
 - IIIb : PTH-Asp, -Glu, -Cys et -Arg.

L'identification des PTH-acides aminés appartenant aux groupes II et III, nécessite au préalable leur transformation en dérivés volatils donnant une réponse satisfaisante en ionisation de flamme.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la technique de silylation.

3 - Silylation des PTH-acides aminés : Le réactif couramment utilisé est le N-O-bis (tri-méthylsilyl) acétamide (BSA) mais les conditions de silylation varient selon les auteurs.

- silylation de l'échantillon avant l'injection

Un volume adéquat de BSA est ajouté dans le tube contenant le PTH-acide aminé préalablement desséché. Après 10 minutes d'incubation à 55°C, une partie adéquate est prélevée pour l'analyse chromatographique.

- silylation au moment de l'injection

La seringue d'injection est remplie dans l'ordre avec de l'acétate d'éthyle, du BSA et l'échantillon dissous dans l'acétate d'éthyle. La silylation s'effectue au moment où le contenu de la seringue est introduit dans la chambre d'injection. Cette dernière méthode permet de réduire la quantité d'échantillon à silyler en minimisant les risques de destruction thermique des PTH-acides-aminés ; mais la réaction de silylation est parfois incomplète.

III - Identification des PTH-acides aminés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC)

1 - Appareillage

La chromatographie liquide à haute pression diffère de la chromatographie liquide classique par une meilleure résolution, par une plus grande sensibilité et par la rapidité des séparations. On utilise des phases stationnaires de granulométrie très fine (5 à 10 μ) ceci entraîne des pertes de charges importantes qui seront compensées par l'utilisation de pompes spéciales à haute pression.

Les dispositifs particuliers sont :

- la pompe :

elle doit pouvoir délivrer le solvant sous une pression de 50 à 300 bars. Elle doit fournir un débit aussi constant que possible, soit par sa conception propre, soit à l'aide d'un amortissement de pulsation.

- l'injecteur : 2 types

- un injecteur par vanne à bouche d'échantillonnage permet d'utiliser différents volumes d'échantillon
- injecteur à seringue automatique ; permet une très bonne reproductibilité.

- les colonnes : elles sont fabriquées à partir des tubes d'acier inoxydable, de dimensions standards :

- colonnes de type 1 : diamètre 3,0 mm ; longueur 30 cm
- colonnes de type 2 : diamètre 4,7 mm ; longueur 15-20 cm

Les colonnes de type 2 sont plus faciles à remplir de manière homogène : la résolution obtenue est sensiblement identique à celle que donnent les colonnes de type 1.

- les raccords : type "swageh", en acier inoxydable réusiné, sans volume mort.
- le détecteur : le maximum d'absorption des PTH-acides aminés se situe à 269 nm, mais un photomètre à longueur d'onde fixe de 254 nm est suffisant s'il dispose à la fois d'une grande stabilité et d'une grande sensibilité (c'est-à-dire d'une sensibilité d'environ 16 à 32/100 de densité optique à pleine échelle). La cellule de lecture est une microcuve à circulation de capacité inférieure à 10 µl. Le dessin du parcours est important : il doit éviter les angles brusques, sujets à turbulence et à piégeage des microbulles. La présence d'une restriction en aval de la microcuve prévient la formation de bulles par dégazage.
- L'élution : l'élution des solutés peut être obtenue : soit à l'aide d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants (système isocratique), soit par variation progressive du liquide éluant, allant d'un solvant de force éluante faible à un solvant de force éluante importante. Dans ce cas, il est nécessaire de prévoir, en amont de la pompe, un générateur de gradient.

2 - Identification des PTH-acides aminés par HPLC

a) Comparaison de la HPLC avec d'autres méthodes chromatographiques d'identification. L'analyse idéale des PTH-acides aminés doit réunir les conditions suivantes :

- 1/ séparation complète des constituants
- 2/ dosage
- 3/ faible quantité d'échantillon (égale ou inférieure à 1 nanomole)
- 4/ temps d'analyse aussi court que possible
- 5/ faible cout d'investissement
- 6/ non dégradation des échantillons

La HPLC réunit les conditions 2,3,4 et 6 (en analyse isocratique). La séparation des différents PTH-acides aminés, quoique bonne est incomplète et l'investissement est lourd. Le temps de séparation dépend de la méthode d'élution envisagée : 6 à 7 minutes pour chaque groupe de PTH-acides aminés (polaires et apolaires)

en système isocratique ; 20 à 25 minutes dans le cas d'une élution par gradient.

Avec la chromatographie en phase gazeuse, on observe plusieurs inconvénients : nécessité de transformer chimiquement certains PTH-acides aminés afin de les rendre plus volatiles ; décomposition thermique de plusieurs PTH-acides aminés, la quantité relativement importante d'échantillon la dévantage.

La détermination des PTH-acides aminés par chromatographie sur couche mince a l'avantage d'être rapide et peu coûteuse mais l'impossibilité d'une estimation vraiment quantitative limite. Cette méthode à une recherche rapide des constituants de l'échantillon préalable au dosage proprement dit.

Enfin, l'utilisation d'un analyseur automatique d'acides aminés peut être envisagée après hydrolyse des PTH-acides aminés en acides aminés libres, mais la durée d'hydrolyse limite,

Cette méthode, en conclusion la HPLC permet une séparation rapide avec une grande sensibilité des PTH-acides aminés ; l'absence de transformation préalable à l'injection de l'échantillon avantage cette méthode par rapport à la chromatographie en phase gazeuse ; il est possible, par ailleurs, avec cette technique de récupérer séparément les constituants après analyse quantitative.

b) Systèmes chromatographiques

On peut distinguer deux types de chromatographie adaptés à la séparation des PTH-acides aminés :

- Chromatographie solide-liquide où la phase stationnaire est un solide (silice ou alumine) et la phase liquide un solvant ou un mélange approprié de solvants apte à éluer les solutés : cette méthode s'applique bien aux composés organiques polaires.

- Chromatographie liquide-liquide, dans laquelle la phase stationnaire est constituée par un liquide qui imprègne le support solide (terre de diatomée ou silice). Si la phase stationnaire est non polaire et si la phase mobile, constituée par un solvant ou un mélange de solvants, est polaire, on parle alors de chromatographie de partage à polarité de phase inversée. Ce type de chromatographie convient bien aux composés peu polaires.

c) Solvants : dans un cas comme dans l'autre les solvants utilisés doivent être aussi purs que possible. Par ailleurs il est rare qu'un solvant unique permette d'obtenir une séparation optimale ; deux possibilités s'offrent alors :

- soit la mise au point d'un mélange de solvants permettant la séparation d'un groupe ou de la totalité des composés (système isocratique)
- soit l'utilisation d'un mélange, souvent plus simple, dont la composition peut être changée au cours du temps (appareil à gradient) ceci est particulièrement utilisé pour la chromatographie en "phase inversée".

IV - Identification des PTH-acides aminés de la phase aqueuse.

La phase aqueuse est desséchée et reprise dans le méthanol. Elle peut contenir les PTH-Arg-His, et des dérivés de la cystéine.

1 - Méthodes d'analyse

- hydrolyse des PTH-Arg, et -His en acides aminés et analyse sur la petite colonne de l'autoanalyseur
- HPLC (ZIMMERMAN et coll. 1977)
- méthodes chromatographiques sur polyamide (HOPP, 1976) (REED et MAC KAY, 1978).

2 - Colorations spécifiques

- PTH-histidine (SANGER et TUPPY, 1951)

Solutions :

A : HCl 0,1 N, para-anisidine à 1% dans l'éthanol absolu

B : iso-amyl nitrite à 10% (V/V) dans l'éthanol absolu

C : NH₄OH concentrée (solution très fraîche).

Tremper la bande de papier dans un mélange (50 : 50 ; V/V) des solutions A et B. Laisser sécher. Mettre en contact avec des vapeurs de la solution C : on observe une coloration brun orange, non stable.

- PTH-arginine (YAMADA et TIANO, 1966)

Solutions :

A : phénanthrènequinone 5 mg/20 ml d'éthanol

B : NaOH 25%

Mélanger 4 ml de la solution A et 1 ml de la solution B. Tremper la bande de papier dans cette solution. Laisser sécher 15 minutes. Observer à 366 nm : le PTH-Arg donne une tache fluorescente ; la coloration reste stable pendant plusieurs heures.

CHAPITRE IV

DETERMINATION DES AMINO-ACIDES C-TERMINAUX

1 - METHODE DES CARBOXYPEPTIDASES

Les carboxypeptidases coupent une chaîne polypeptidique à partir de son extrémité C-terminale en détachant les acides aminés les uns après les autres.

On distingue trois groupes de carboxypeptidases : A, B, C en fonction de la spécificité de leur substrat.

La carboxypeptidase A : isolée du pancréas de boeuf par ANSON (ANSON M.L., 1937), elle libère plus rapidement les résidus C-terminaux des amino-acides aromatiques et des amino-acides aliphatiques à longue chaîne : tyrosine, phénylalanine, tryptophane, glutamine, histidine, alanine, valine et homosérine. Elle n'agit pas sur les résidus C-terminaux proline, arginine et lysine.

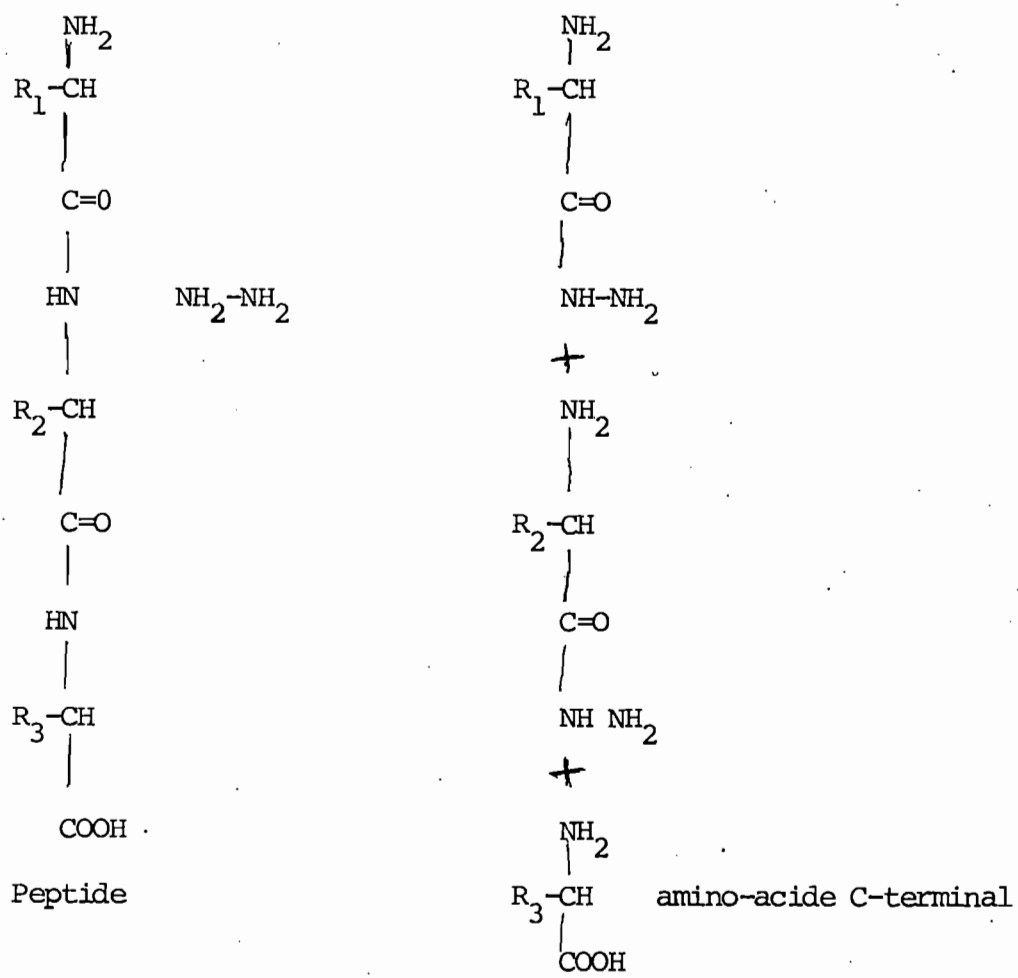
La carboxypeptidase B : agit spécifiquement sur les résidus C-terminaux lysine et arginine.

La carboxypeptidase C : a été isolée à partir de la sève des végétaux. Elle agit spécifiquement sur les résidus C-terminaux leucine, proline, acide glutamique, lysine, histidine, alanine.

2 - METHODE DE L'HYDRAZINOLYSE

Dans cette méthode, la rupture de toutes les liaisons peptidiques est obtenue par transformation de tous les résidus d'acides aminés, sauf le résidu C-terminal, en hydrazides. Le résidu C-terminal apparaît sous forme d'acide aminé libre qui peut être facilement identifié par chromatographie.

Principes de la réaction d'un peptide avec l'hydrazine



CHAPITRE V

ETUDE DES PEPTIDES

La protéine purifiée va être ensuite soumise à l'hydrolyse afin d'obtenir une fragmentation en peptides.

1 - HYDROLYSE CHIMIQUE

Dans certaines conditions, l'hydrolyse acide partielle permet d'obtenir une fragmentation de la protéine en peptides. L'acide chlorhydrique est utilisé à différentes concentrations. La température optimale de la réaction est également variable.

A la fin de l'opération, on obtient un mélange de peptides dont la séparation, s'ils sont trop nombreux, pose souvent des problèmes. C'est pourquoi, l'hydrolyse enzymatique, généralement plus limitée et mieux contrôlée, est préférée à cette méthode.

2 - HYDROLYSE ENZYMATIQUE

A - La trypsine

La trypsine, enzyme digestif sécrété par le pancréas sous forme de son précurseur, le trypsinogène a été isolé depuis de nombreuses années et cristallisée. Elle catalyse uniquement l'hydrolyse des liaisons peptidiques dans lesquelles la fonction carboxylique est fournie par l'arginine ou la lysine.

Le nombre de fragments peptidiques peut être prédit à partir du nombre total de résidus lysine et arginine dans la chaîne.

B - La chymotrypsine

C'est comme la trypsine, un enzyme digestif, une endopeptidase. Elle catalyse essentiellement l'hydrolyse des liaisons dans lesquelles la fonction carboxylique est fournie par un amino-acide aromatique : phénylalanine, tyrosine ou tryptophane.

C. - La pepsine

Elle est moins spécifique que les deux enzymes précédents.

D - La protéase d'origine staphylococcique

enzyme isolé depuis peu à partir du *Staphylococcus aureus*, il se comporte d'une manière extrêmement spécifique puisqu'il n'hydrolyse que les liaisons Glu-X.

3 - PURIFICATION DES PEPTIDES

A la fin de l'hydrolyse, on congèle et on lyophilise l'hydrolysate.

Après avoir été dissous dans une petite quantité de la solution d'élution, le mélange de peptides est passé sur une colonne d'un tamis moléculaire (Biogel).

Après filtration, on congèle et on lyophilise les fractions obtenues.

4 - COMPOSITION EN AMINO-ACIDES

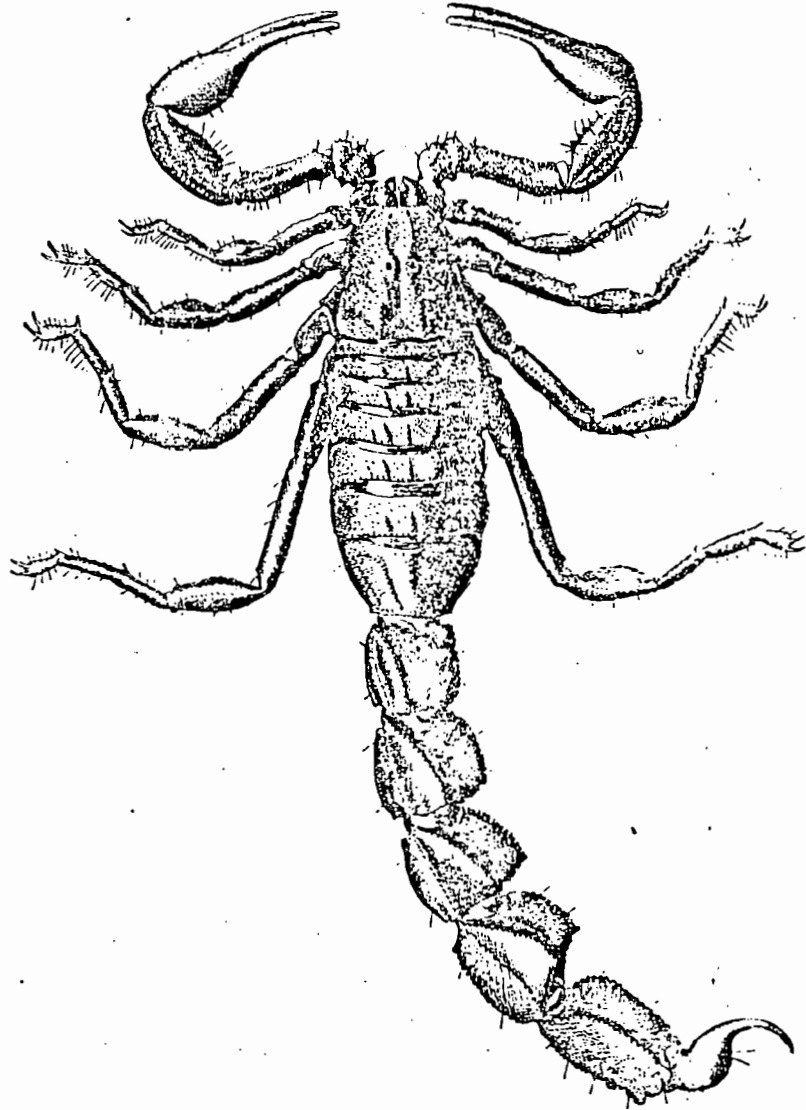
Elle est obtenue par les méthodes citées précédemment (chapitre II).

5 - DETERMINATION DE LA SEQUENCE

Chaque peptide est ensuite placé dans le séquenceur automatique pour y subir la dégradation d'EDMAN.

C'est le "programme peptide" qui est employé et le tampon utilisé est le DMBA.

Les opérations de conversion et d'identification des PTH-amino-acides sont évidemment celles utilisées dans l'étude de la séquence des protéines.



Androctonus mauretanicus mauretanicus

DEUXIEME PARTIE

RESULTATS EXPERIMENTAUX

INTRODUCTION

La structure de la toxine V du Scorpion Androctonus maure-tanicus mauretanicus a été principalement déterminée en appliquant la méthode de dégradation d'Edman en phase liquide à l'aide d'un séquenceur de protéine utilisé alternativement avec un "programme protéine" employant le tampon quadrol et un "programme peptide" employant le tampon DMBA.

A - PURIFICATION

La toxine V du venin de scorpion Nord-Africain, collecté à Marrakech (Maroc) a pu être isolée en faisant appel à la technique générale de purification mise au point au laboratoire (MIRANDA et coll. 1970 a et b), MIRANDA et LISSITZKY 1961) pour les venins de scorpions et de serpents et dont les principes de base sont, dans l'ordre de leur utilisation :

- l'extraction par l'eau à base température ;
- la filtration moléculaire ;
- la chromatographie par échange d'ions.

La filtration moléculaire a été réalisée, comme d'habitude, sur Sephadex G-50 "superfine", dans un tampon acétate d'ammonium 0,1M, pH 8,50.

Pour la chromatographie par échange d'ions, on a utilisé un échangeur de cations, le CM-Sephadex, G-50, dans un tampon acétate d'ammonium 0,15 M, pH 6,30.

B - CONTROLE DE LA PURIFICATION

La pureté de la fraction obtenue a été vérifiée par mesure de l'activité spécifique tout au long du pic de toxine issu de la chromatographie d'échange d'ions, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et par étude de la composition en amino-acides (tableau 1).

Acide aspartique	9,99	(10)
Thréonine	0,86	(1)
Sérine	3,12	(3)
Acide glutamique	4,08	(4)
Proline	2,20	(2)
Glycine	7,01	(7)
Alanine	2,92	(3)
1/2 Cystine	7,07	(8)
Valine	1,17	(1)
Méthionine	-	(0)
Isoleucine	3,00	(3)
Leucine	3,06	(3)
Tyrosine	5,06	(5)
Phénylalanine	2,09	(2)
Histidine	-	(0)
Lysine	6,99	(7)
Arginine	2,97	(3)
Tryptophane	2,12	(2)

TABLEAU 1 : Composition en amino-acides de la toxine V d'Androctonus mauretanicus. Les résultats expérimentaux sont exprimés en nombre de résidus par molécule.

Les chiffres théoriques entre parenthèses sont déduits de la séquence primaire de la molécule.

C - ETUDE DE LA SEQUENCE

1 - Réduction et carboxyméthylation de la toxine V

La protéine est réduite par le ^{dithioerythritol} dithioérytol, (37 mg par μ mole de protéine) dans un tampon tris-guanidine 5 M, EDTA, 0,014 M pH 8,6, sous azote, pendant 20 heures, à 40°C et à l'obscurité.

L'alkylation est obtenue avec l'acide iodo-acétique (112 mg par μ mole de protéine), dans le même tampon que celui utilisé pour la réduction, pendant 20 minutes, à la température ambiante, à l'obscurité et sous azote.

La réaction est stoppée par ajout d'acide acétique concentré de façon à ce que le milieu devienne 1 M en acide acétique.

Le dessalage de la protéine est réalisé sur une colonne de Sephadex G-25 (3,2 x 80 cm) équilibrée dans l'acide acétique 1 M.

La protéine est ensuite lyophilisée.

Par analyse des amino-acides sur l'appareil BECKMAN 120C on vérifie que la modification chimique s'est déroulée avec un rendement proche de 100%.

2 - Détermination des amino-acides N-terminaux

On a utilisé la méthode de dégradation automatique d'Edman en phase liquide.

Elle est réalisée sur la protéine réduite et alkylée, dans un séquenceur de protéines PS 100 (SOCOSI, 94100 - St-Maur, France) selon un "programme protéine" utilisant le tampon quadrol 1 M.

On a réalisé aussi une dégradation automatique sur les peptides issus d'une digestion enzymatique (cf paragraphe ultérieur concernant la digestion par une protéase de Staphylococcus aureus, selon un "programme peptide" utilisant le tampon DMBA. Dans ce dernier cas, on a ajouté au peptide de l'apomyoglobine succinylée de merluche protéine "protectrice" qui limite les pertes de peptides lors des cycles de dégradation.

3 - Identification des PTH-amino-acides

Elle a été faite successivement :

- par chromatographie sur couche mince
- par chromatographie en phase gazeuse sur un appareil Beckman GC 65
- par HPLC (Waters).

Les dérivés de l'arginine et de l'histidine ont été identifiés respectivement selon les méthodes de Sakaguchi et de Pauly.

4 - Digestion de la protéine par une protéase de Staphylococcus aureus

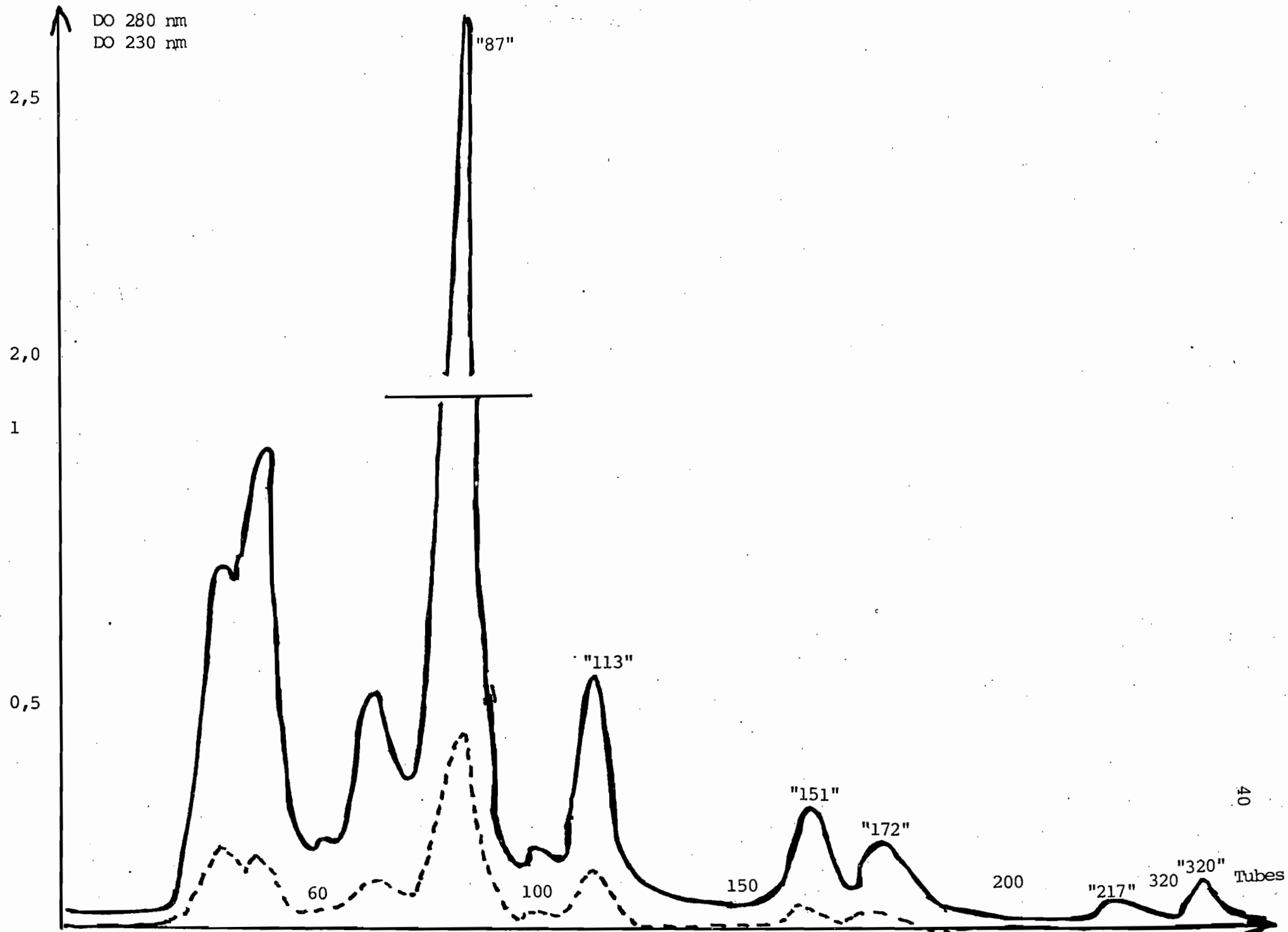
La protéine est digérée à 37°C, pendant 48 heures, dans un tampon acétate d'ammonium 0,05 M, pH 4,0, le rapport pondéral enzyme/sur substrat étant de 10%. La réaction est arrêtée par congélation puis on lyophilise.

5 - Séparation des peptides

L'hydrolysate peptidique est fractionné sur deux colonnes de Biogel P₆ (200-400 mesh) de 2 X 200 cm, montées en série dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M, pH 7,8.

L'éluat (volume des fractions = 1,7 ml) de la filtration est lu à deux longueurs d'onde différentes (280 nm et 230 nm) à spectrophotomètre Beckman DBG1 (voir schéma de la dilution).

Les fractions obtenues sont lyophilisées, puis sur des parties aliquotes de chaque fraction, une hydrolyse acide (HCl 6 N) est réalisée de façon à déterminer les compositions en amino-acides (voir tableau 2).



Peptides Amino- Acides	"87"	"113"	"153"	"172"	"217"	"320"
Asp	2,18 (2)	1,81 (2)	-	-	-	1,03 (1)
The	-	-	-	-	-	-
Ser	2,09 (3)	1,08 (1)	1,84 (2)	1,61 (2)	-	-
Glu	2,09 (2)	1,08 (1)	2,22 (2)	1,35 (1)	1,10 (1)	-
Pro	2,12 (2)	0,64 (1)	1,18 (1)	1,03 (1)	-	-
Gly	2,30 (2)	-	3,82 (4)	2,23 (2)	2,10 (2)	1,11 (1)
Ala	1,73 (2)	1,07 (1)	1,34 (1)	1,23 (1)	-	-
C.M.C.	1,89 (3)	1,13 (2)	1,49 (2)	0,39 (1)	0,76 (1)	0,84 (1)
Val	0,82 (1)	0,81 (1)	-	-	-	-
Met	-	-	-	-	-	-
Ile	0,73 (1)	0,83 (1)	-	-	-	-
Leu	0,82 (1)	0,86 (1)	-	-	-	-
Typ	1,82 (3)	0,76 (2)	1,44 (2)	0,98 (2)	-	-
Phe	-	-	-	-	-	-
Lys	1,75 (2)	1,76 (2)	2,62 (3)	-	2,03 (3)	0,93 (1)
Trp	nd	nd	nd	nd	nd	nd

TABLEAU 2 : Composition en amino-acides des peptides obtenus après hydrolyse par la protéase de *Staphylococcus aureus* et filtration sur Biogel P₆. A côté de chaque valeur expérimentale pour les différents amino-acides, figurent entre parenthèses les chiffres déduits de la séquence de chaque peptide.

nd : non déterminé.

6 - Détermination de l'acide-amino C-terminal : hydrolyse par les carboxypeptidases A,B

Dans les tubes à hémolyse contenant la toxine V réduite et carboxyméthylée, en solution dans un tampon alcalin (diméthylamine-acide trifluoroacétique 0,4 M, pH 8,0) on a ajouté soit la carboxypeptidase A, soit la carboxypeptidase B, dans un rapport pondéral enzyme/substrat égal à 2%, la digestion s'effectuant à 35°C.

Les temps d'hydrolyse sont de 1,5, 15, 30, 60 minutes
8 heures, 24 heures.

A chacun de ces temps, une partie aliquote du tube à hémolyse, acidifiée par l'acide acétique pur, puis lyophilisée, est passée sur l'analyseur d'acides-amino.

Aucun acide-amino à partir de l'extrémité C-terminale n'a pu être libéré que ce soit par la carboxypeptidase A, que ce soit par la carboxypeptidase B.

On peut supposer, mais cela reste à démontrer que l'extrémité C-terminale se trouve sous une forme amidée empêchant l'attaque des différentes carboxypeptidases.

Ce cas a été déjà mis en évidence au cours de l'établissement d'autres structures primaires de toxines de scorpions (MIRANDA 1978).

7 - Résultats des différents séquençages

Le langage à une lettre pour les acides-amino est utilisé (voir tableau 3).

Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide aspartique	Asp	D
Asn + Asp	Asx	B
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Acide glutamique	Glu	E
Gln + Glu	Glx	Z
Glycine (glycocolle)	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V
Carboxyméthylcystéine		CMC

TABLEAU 3 : Représentation symbolique des amino-acides

a) Séquençage de la protéine

On a pu ainsi déterminer 34 résidus à partir de l'extrémité n-terminale.

L K D G Y I I D D L N C T F F C G R N A Y C D D E C K K K G G E S G Y x x W A x x Y

b) Séquençage des peptides

A partir des compositions en amino-acides des différents peptides, on a pu estimer qu'un grand nombre d'entre eux étaient sous une forme homogène. Le séquençage respectif des peptides a donné les résultats suivants :

"87" : S G Y C Q W A S P Y G N A C W C Y K L P D R V x I x x

"113" : N A C W C Y K L P D R V S I K E

"151" : C K K K G G E S G Y C Q W A S P Y G

"172" : S G Y C Q W A S P Y G

"217" : C K K K G G E

"320" : K G R C N

8 - Etablissement de la séquence primaire complète de la toxine V d'Androctonus mauretanicus mauretanicus
(voir schéma 2)

LKDGYIIDDLNCTFFCGRNAYCDDECKKKGGESGYxxWAXXY

Séquence
N-terminale de la
toxine V.

"217"

CKKKGGES

"151"

CKKKGGESGYCQWASPYG

"172"

SGYCQWASPYG

" 87"

SGYCQWASPYGNACWCYKLPDRVWIXX

"113"

NACWCYKLPDRVSIKE

"320"

KGRCN

LKDGYIIDDLNCTFFCGRNAYCDDECKKKGGESGYCQWASPYGNACWCYKLPDRVSIKEKGRCN

Séquence primaire
complète de la
toxine V.

Schéma 2 : Etablissement de la séquence primaire complète de la toxine V d'Androctonus
mauretanicus mauretanicus

CONCLUSION

La neurotoxine V du scorpion Androctonus mauretanicus mauretanicus a été purifiée grâce aux méthodes générales mises au point dans le laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine, Secteur Nord, de Marseille. Sa séquence a été déterminée par la méthode de dégradation d'Edman dans un séquenceur de protéines automatiques en phase liquide.

Les résultats obtenus ont permis d'inclure cette neurotoxine dans l'une des trois familles de toxines définies au laboratoire d'après les données rassemblées sur les neurotoxines de différentes espèces de scorpions nord-africains (ROCHAT H. et Coll. 1970).

La connaissance de nombreuses structures primaires de neurotoxines contribuera également à formuler des hypothèses sur les résidus essentiels à l'activité, en attendant que la synthèse peptidique apporte des arguments plus démonstratifs dans ce domaine. Elle éclairera peut être aussi l'étude phylogénique des différentes espèces de scorpions.

Un autre intérêt des venins de scorpions est celui de contenir, à côté des principes actifs sur les vertébrés, des composés spécifiquement toxiques sur les invertébrés (Insectes et Crustacés).

L'étude comparée de ces différents principes actifs et de leurs récepteurs conduira certainement à une connaissance meilleure sur le plan moléculaire de la transmission nerveuse.

Enfin, dans le domaine des applications thérapeutiques la détermination des structures des neurotoxines de scorpions apporte une contribution intéressante dans le traitement des envenimements en permettant la préparation de sérums antivenimeux parfaitement dosés obtenus en mélangeant (dans des proportions calculées en fonction des concentrations dans un venin donné des différentes toxines) des sérums spécifiques de chacune des familles de neurotoxines (DELORI 1976).

TROISIEME PARTIE

BIBLIOGRAPHIE

A - OUVRAGES GENERAUX CONSULTEES

- Amino acid determination. Methods and Techniques.
BLACKBURN S.
Marcel Dekker. INC Ed., New York, 1968.
- Biochimie - Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires.
LEHNINGER A.L.
Flammarion et Cie, Eds, 1977.
- A laboratory manual of analytical methods of protein chemistry
Tome I.
ALEXANDER P. et BLOCK R.J. Eds.
Pergamon Press London Oxford, New York, Paris, 1960.
- Determination automatique en phase liquide des séquences d'acides aminés.
Editions INSERM, 1979.
- Protein sequence determination, Methods and techniques.
BLACKBURN S.
Marcel Dekker, INC, New York, 1970
- Protein sequence determination.
NEEDLEMAN S.B. Ed.
Springer Verlag, Berlin, 1976.
- Techniques modernes de laboratoire et explorations fonctionnelles
Tome I.
HARTMANN L.
L'expansion Ed. Paris, 1970.
- The primary structure of proteins.
SCHROEDER W.A.
Harper et Row Eds New York, Evanston, London, 1968.

B - MEMOIRES ORIGINAUX CITES DANS LE TEXTE

- ADAM K.R., SCHMIDT H., STAMPFU R. et WEISS C. (1966)
Brit.J.Pharmacol., 26, 666.
- ANSON M.L. (1937)
J.Gen.Physiol., 20, 663.
- BRIDGEN J. (1963)
Dans "Instrumentation in aminoacid sequence analysis".
Perham, R.N. Ed 111.
- COHEN-SOLAL M. et BERNARD J.L. (1973)
J.Chromatogr. 80, 140.
- CONSDEN R., GORDON A.H. et MARTIN A.J.P. (1947)
Biochem.J., 41, 590.
- DELORI F., MIRANDA F. et ROCHEI H. (1976)
Dans "Animal Plant and Microbial Toxins",
2, 407.
OHSAKA H., HAYASHI K. et SAWAI Y. eds.
Plenum Press, New York.
- EDMAN P. (1956)
Nature, 177, 667.
- EDMAN P. et BEGG E. (1967)
Eur. J. Biochem; 1, 80.
- EDMAN P. et HENSCHEN A. (1975)
Dans "Protein sequence determination".
Needleman S.B. Ed Springer Verlag, Berlin, 211.
- GUYER R.L. et TODD W. (1975)
Anal. Biochem., 66, 400.
- HERMODSON M.A., ERICSSON L.H., TITANI K., NEURATH H. et WALSH K.A. (1972)
Biochemistry, 11, 4493.
- HOPP T.P. (1976)
Anal. Biochem., 74, 638.
- KOPPENHOFER E. et SCHMIDT H. (1968 a)
Experientia, 24, 41.
- KOPPENHOFER E. et SCHMIDT H. (1968 b)
Pflügers Arch., 303, 150.
- KULBE K.D. (1974)
Anal.Biochem., 59, 564.

- LAURSEN R.A. (1971)
Eur.J.Biochem., 20, 89.
- MIRANDA F. (1978)
Bull.Soc.Linnéenne Provence, 31, 75.
- MIRANDA F., KOPEYAN C., ROCHAT H., ROCHAT C., et LISSITZKY S. (1970a)
Eur.J.Biochem., 16, 514.
- MIRANDA F., KOPEYAN C., ROCHAT H., ROCHAT C. et LISSITZKY S. (1970b)
Eur.J.Biochem., 17, 477.
- MIRANDA F. et LISSITZKY S. (1961)
Nature (Lond), 190, 443.
- PISANO J.J. et BRONZERT T.J. (1969)
J.Biol.Chem., 244, 5597.
- PISANO J.J., BRONZERT T.J. et BREWER H.Jr. (1972)
Anal.Biochem, 45, 43.
- REED R.G. et MAC KAY C.M. (1978)
Anal. Biochem., 84, 324.
- ROSEAU et PANTEL (1969)
J.Chromatogr., 44, 392.
- ROCHAT H., ROCHAT C., KOPEYAN C., MIRANDA F., LISSITZKY S. et EDMAN P. (1970)
FEBS Letters, 10, 349.
- SANGER F. (1945)
Biochem J., 39, 507.
- SANGER F. et TUPPY H. (1951)
Biochem.J., 49, 463.
- SOBER H.A., GUTTER F.J., WYCKOFF M.M. et PETERSON E.A. (1956)
J.Am.Chem.Soc., 78, 756.
- STRYDOM D.J., HAYLETT T. et STEAD R.H. (1977)
Biochem.Biophys.Res. Commun, 79, 932.
- TARR G.E. (1975)
Anal.Biochem., 63, 361.
- TISELIUS A. (1937)
Trans.Faraday Soc., 33, 524.
- YAMADA S. et ITANO H.A. (1966)
Biochem.Biophys.Acta, 130, 538.
- ZIMMERMAN C.L., APELLA E. et PISANO J.K. (1977)
Anal.Biochem., 77, 569.
-