

50 576  
1995  
367

gen 20105530

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE



**THESE**

Présentée pour obtenir

le grade de **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE**

*Mention Chimie Organique et Macromoléculaire*

par

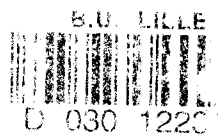
**Jamila NAJIB**

**ETUDES SYNTHETIQUES ET STRUCTURALES  
DE TOXINES CONTENANT TROIS OU QUATRE  
PONTS DISULFURE**

Soutenue le 25 octobre 1995 devant la commission d'examen

Pr. A. Tartar  
Pr. A. Benslimane  
Pr. J.G. Gesquière  
Dr. J. Mazurier  
Pr. G. Gacel  
Dr. P. Sautière

Président  
Examinateur  
Examinateur  
Examinateur  
Rapporteur  
Rapporteur



## Remerciements :

**A Monsieur le Professeur A. TATAR**, Directeur de l'unité CNRS URA 1309 à l'Institut Pasteur de Lille, qui m'a accueillie dans son laboratoire où j'ai pu bénéficier de sa grande culture scientifique et qui a toujours manifesté une grande disponibilité pour discuter les résultats de mes expériences et qui me fait l'honneur de présider cette thèse. Qu'il trouve dans ce travail un témoignage de ma respectueuse gratitude.

**A Monsieur le Professeur G. GACEL**, Doyen de la Faculté de Pharmacie d'Amiens, pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant d'en être le rapporteur. Qu'il soit assuré de mes sincères remerciements.

**A Monsieur le Docteur P. SAUTIERE**, Directeur de Recherches CNRS, qui en tant que collaborateur et rapporteur, m'a fait profiter de son expérience, de ses encouragements amicaux, tout au long de ce travail. Que cette thèse soit le témoignage de ma vive reconnaissance.

**A Monsieur le Professeur A. BENSLIMANE**, Directeur Général de l'Institut Pasteur du Maroc, qui me fait l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail malgré ses multiples occupations. Que ce mémoire soit pour moi l'occasion de le remercier et de l'assurer de mes sentiments les plus respectueux.

**A Monsieur le Docteur J. MAZURIER**, Directeur de Recherches CNRS, qui en tant qu'examineur, a bien voulu juger ce travail. Qu'il soit vivement remercié.

**A Monsieur le Professeur J.C. GESQUIERE**, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Lille, qui en tant que collaborateur a su, par son enthousiasme, sa compréhension, ses conseils et sa gentillesse m'apporter un soutien moral tout au long de ce travail.

Je remercie toute l'équipe du Service Chimie des Biomolécules, du Professeur TARTAR, et en particulier H. Drobecq, pour son collaboration technique précieuse au cours de ce travail.

Je remercie les membres du laboratoire de Spectrométrie de Masse à la Faculté de Médecine et en particulier, Mustafa Couach.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>DIVERSITE STRUCTURALE ET BIOLOGIQUE DES TOXINES DE SCORPION ET D'ARAIGNEE.....</b>	<b>4</b>
<b>I-LES TOXINES DES VENINS DE SCORPION.....</b>	<b>4</b>
<i>A-Les toxines à chaîne longue</i> .....	4
1)-Toxines de type $\alpha$ .....	4
2)-Toxines de type $\beta$ .....	5
3)-Insectotoxines.....	5
<i>B-Les toxines à chaîne courte</i> .....	9
1)-Les toxines agissant sur les canaux potassium.....	9
2)- Les toxines agissant chez les insectes.....	9
3)-Récemment une toxine agissant sur les canaux chlore.....	10
-L'organisation structurale des toxines à chaîne courte.....	11
-Relations structure-activité.....	15
<b>II-LES TOXINES DES VENINS D'ARAIGNEE.....</b>	<b>16</b>
<i>A-Les toxines agissant sur les canaux sodium</i> .....	18
<i>B-les toxines agissant sur les canaux calcium</i> .....	20
<i>C-Les toxines agissant sur les insectes</i> .....	23
Comparaison des séquences de toxines d'araignée.....	23
<b>REACTIVITE ET PROTECTION DE LA FONCTION THIOL.....</b>	<b>42</b>
<b>I- INTRODUCTION.....</b>	<b>42</b>
<b>II -PROTECTION DE LA FONCTION THIOL DE LA CYSTEINE EN SYNTHESE PEPTIDIQUE.....</b>	<b>43</b>
<i>A- Les groupes protecteurs de type alkylthio et alcythio</i> .....	44
1-Les groupes protecteurs de type sulfure (thioether).....	44
a ) Labiles en milieu acide.....	45
Labilité due à un effet inducteur.....	45
Labilité due à des effets mésomères.....	46
b) Groupes labiles en milieu basique.....	48
2-Les thioesters.....	49
a ) Les dérivés S-acétylés et S-benzoylés.....	49
b ) Les dérivés alkyloxycarbonylés ou carbamoylés.....	50
3-Les thioacetals et fonctions dérivées.....	51
a ) Les monothioacétals.....	51
b ) Les aminothioacétals (thioaminals).....	52

<i>B- Les protections sous formes de disulfures</i> .....	54
<b>REPLIEMENT OXYDATIF DES POLYPEPTIDES RICHES EN CYSTÉINES</b> .....	<b>66</b>
I-INTRODUCTION.....	66
II-OXYDATION PAR L' AIR ET ECHANGE DE DISULFURES MIXTES.....	69
III-OXYDATION EN UTILISANT DES SELS METALLIQUES.....	71
IV-OXYDATION PAR L'IODE.....	72
V- OXYDATION EN UTILISANT DES DERIVES HALOGENES.....	76
VI- OXYDATION EN UTILISANT DES SULFOXYDES.....	78
VII - UTILISATION DES DISULFURES ACTIVES.....	80
<b>LA CHLOROTOXINE</b> .....	<b>88</b>
I-INTRODUCTION.....	88
II-DISCUSSION.....	89
<i>A- Structure 3D de la chlorotoxine</i> .....	89
<i>B- Synthèse et identification de la nature de l'extrémité C-terminale de la chlorotoxine</i> .....	90
<i>C- détermination du rôle du pont disulfure supplémentaire</i> .....	92
<b>ROLE OF THE ADDITIONAL DISULFIDE BRIDGE IN CHLOROTOXIN, A MEMBER OF THE SHORT SCORPION TOXIN FAMILY</b> .....	<b>105</b>
<b>L'<math>\omega</math>-AGATOXINE IV A, BLOQUEUR DE CANAUX <math>Ca^{2+}</math> DE TYPE P</b> .....	<b>138</b>
<b>SOLID PHASE SYNTHESIS OF <math>\omega</math>-AGATOXIN IV A, A P-TYPE CALCIUM CHANNEL BLOCKER</b> .....	<b>145</b>
ABSTRACT.....	146
INTRODUCTION.....	147
MATERIALS AND METHODS.....	148
<i>1- Materials</i> .....	148
<i>2- Methods</i> .....	148
A - Solid phase peptide synthesis.....	148
B - Disulfide bond formation and purification.....	149
C - Synthesis and characterization of $\omega$ -Aga IVA under optimal conditions.....	151
D - Biological activity.....	151
III - RESULTS AND DISCUSSION.....	153
ACKNOWLEDGMENTS.....	165
<b>SYNTHESE DIVERGENTE DES ANALOGUES DE LA SCYLLATOXINE ET MISE EN EVIDENCE D'UNE REACTION SECONDAIRE</b> .....	<b>168</b>
III- CARACTERISATION DE LA REACTION SECONDAIRE OBSERVEE.....	173

**MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION D'AUTRES REACTIONS SECONDAIRES 186**

I-FORMATION DE THIAZOLIDINES LORS DE L'UTILISATION DE PROTECTIONS DE TYPE BOM OU BUM AVEC DES PEPTIDES POSSEDANT UNE CYSTEINE N-TERMINALE..... 186

II-CONTRIBUTION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE A LA CARACTERISATION DE REACTIONS SECONDAIRES EN SYNTHESE PEPTIDIQUE..... 187

III-PERSPECTIVES..... 188

**CONCLUSION GENERALE..... 196**

Ce travail effectué dans le laboratoire de Chimie des Biomolécules du Professeur A. TARTAR à l'Institut Pasteur de Lille, a fait l'objet des publications, des communications orales et affichées suivantes :

### **Articles parus dans des revues à comité de lecture internationale**

- Gesquière J.C, Najib J., Letailleur T., Maes P., and Tartar A., Formation of N<sup>ε</sup>-Fmoc lysine in N<sup>imm</sup>-Dnp-histidine-containing peptides. *Tetrahedron Letters* (1993) **34**, 1921-1924.

- Lippens G., Najib J., Wodak S.J., and Tartar A., NMR sequential assignment and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels. *Biochemistry* (1995) **34**, 13-21.

- Najib J., Letailleur T., Gesquière J.C., and Tartar A., Solid phase synthesis of w-agatoxin IVA, a P-type calcium channel blocker. *Peptide Science* (soumis).

- Najib J., Francart C., Bianci A.S., Gesquière J.C., Sautière P., Tartar A., Lippens G., Role of the additional disulfide bridge in chlorotoxin, a member of the short scorpion toxin family. (à soumettre: *European Journal of Biochemistry*)

### **Articles parus dans des livres**

- Gesquière J.C, Najib J., Diesis E., Barbry D., and Tartar A., Investigations of the side reactions associated with the use of Bom and Bum groups for histidine protection. *Peptides Chemistry and Biology*, Ed. J.A. Smith and J.E. Rivier (1992) 641-642.

- Gesquière J.C, Najib J., Chirat F., Déprez B., Drobecq H. Diesis E., and Tartar A., Contribution of mass spectrometry to the determination of side reactions in peptide synthesis. *In Innovation and perspectives in solid phase synthesis*, Ed. R. Epton, (1992) 221-225.
- Najib J., Sautière P., Gesquière J.C., and Tartar A., Solid phase synthesis of chlorotoxin a chloride channel blocker. *In Innovation and perspectives in solid phase synthesis*, Ed. R. Epton, (1994) 615-618.
- Lippens G., Najib J., Surubaru A.T., and Tartar A., NMR assignments and secondary structure of chlorotoxin, a chloride channel blocker. *In Innovation and perspectives in solid phase synthesis*, Ed. R. Epton, (1994) 583-586.
- Gesquière J.C., Najib J., Marko J., and Tartar A., A side reaction involving N<sup>im</sup>-Dnp histidine and lysine side chain. *In Innovation and perspectives in solid phase synthesis*, Ed. R. Epton, (1994) 513-516.

### **Communications affichées**

- Gesquière J.C, Najib J., Diesis E., Barbry D., and Tartar A., Investigations of the side reactions associated with the use of Bom and Bum groups for histidine protection. *Twelfth American Peptide Symposium*, Boston, USA (16-21 Juin 1991).
- Deprez B., Najib J., Vermeersch G., Gesquière J.C., Tartar A., A new side reaction involving  $\pi$ -Bom protected histidine and tryptophan: peptide dimerisation through methylene bond. *Third International Symposium. Innovation and*



*Perspectives in solid phase synthesis and complementary technologies, Peptides, Polypeptides, Glycopeptides, oligosaccharides, Oligonucleotides. DNA, RNA, Proteins, etc. Biological and Biomedical Applications, Oxford, U.K. (31 Aout-4 Sept 1993).*

- Gesquière J.C., Najib J., Marko J., and Tartar A., A side reaction involving N<sup>im</sup>-Dnp histidine and lysine side chain. *Third International Symposium. Innovation and Perspectives in solid phase synthesis and complementary technologies, Peptides, Polypeptides, Glycopeptides, oligosaccharides, Oligonucleotides. DNA, RNA, Proteins, etc. Biological and Biomedical Applications, Oxford, U.K. (31 Aout-4 Sept 1993).*

- Lippens G., Najib J., Surubaru A.T., and Tartar A., NMR assignments and secondary structure of chlorotoxin, a chloride channel blocker. *Third International Symposium. Innovation and Perspectives in solid phase synthesis and complementary technologies, Peptides, Polypeptides, Glycopeptides, oligosaccharides, Oligonucleotides. DNA, RNA, Proteins, etc. Biological and Biomedical Applications, Oxford, U.K. (31 Aout-4 Sept 1993).*

- Najib J., Sautière P., Gesquière J.C., and Tartar A., Solid phase synthesis of chlorotoxin a chloride channel blocker. *Third International Symposium. Innovation and Perspectives in solid phase synthesis and complementary technologies, Peptides, Polypeptides, Glycopeptides, oligosaccharides, Oligonucleotides. DNA, RNA, Proteins, etc. Biological and Biomedical Applications, Oxford, U.K. (31 Aout-4 Sept 1993).*

- Najib J., Lippens G., Surubaru A.T., Sautière P., Gesquière J.C., Tartar A., Chemical synthesis and determination of the secondary structure of chlorotoxin

by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *3ième Symposium Franco-Chinois*, Shanghai, Chine (5-7 Octobre 1993).

### **Communications orales**

- Gesquière J.C., Najib J., Diesis E., Tartar A., Identification of a side reaction during peptide synthesis: The use of mass spectroscopy. *Reunion scientifique internationale NFWO-NFRS*. Contacts groups « Structure and function of proteins ». Structure, Conformation and Synthesis of Biological active Peptides, Lille (11 Janvier 1991).

- Gesquière J.C., Najib J., Diesis E., Drobecq H., Tartar A., Contribution of mass spectroscopy to the determination of side reaction in peptide synthesis. *Solid Phase Synthesis Symposium*, Canterbury, England, (27-31 Aout 1991).

- Gesquière J.C., Najib J., Deprez B., Tartar A., New side reactions in peptide synthesis. *In Third Symposium Franco-Chinois*, Shanghai, Chine (5-7 Oct. 1993).

# I-INTRODUCTION

## INTRODUCTION

Les toxines animales sont des substances douées de multiples propriétés qui se manifestent en particulier au niveau du système nerveux central et périphérique, de différents muscles et de la coagulation sanguine.

Le mécanisme moléculaire d'action des toxines commence à être de mieux en mieux connu et s'exerce par le blocage d'une variété de molécules cibles comme des canaux ioniques, des récepteurs ou des enzymes.

Ces toxines animales sont largement utilisées comme outils pharmacologiques, en particulier pour identifier les canaux ioniques qu'elles bloquent de façon spécifique (Betz, 1990; Cook & Quast, 1990; Dreyer, 1990; Moczydowski et al, 1988). Les canaux ioniques sont des pores macromoléculaires présents dans les membranes cellulaires. Divers types de canaux en s'ouvrant et se fermant régulent les signaux électriques et les réponses du système nerveux. Les principales familles sont celles des canaux  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cl}^-$ . Des concentrations en toxines de l'ordre du nanomolaire suffisent pour bloquer ces canaux.

Les pharmacologues appellent récepteurs les sites d'interaction avec les toxines. La plus simple approche des récepteurs suggère que la toxine se lie de façon réversible à une classe unique de sites et que la fixation de la molécule de toxine sur un site de récepteur bloque une fraction fixe de la fonction sans influencer la fixation d'autres molécules de toxine sur d'autres récepteurs.

La fixation des toxines peut être utilisée pour déterminer la densité des récepteurs spécifiques aux toxines dans le tissu (Hille, 1992).

Le travail présenté dans ce mémoire apporte une contribution à l'étude de deux toxines l'une extraite du venin de scorpion et l'autre du venin d'araignée. L'étude a porté sur la détermination de la structure tridimensionnelle de la chlorotoxine, extraite du venin de scorpion *Leiurus quinquestriatus* (Debin et al., 1993), par résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton et la synthèse chimique de cette toxine à quatre ponts disulfure ainsi que son analogue à trois ponts disulfure. Un autre modèle de toxines à quatre ponts disulfure, extraite du venin

d'araignée *Agelenopsis aperta*, l' $\omega$ -agatoxine IVA (Mintz et al., 1992) a été synthétisé.

Un chapitre dans la première partie de ce mémoire est consacré à l'étude de la diversité des toxines de ces deux espèces.

Lors de la synthèse de ces toxines riches en cystéines, la difficulté majeure rencontrée est le problème d'agrégats ou de polymères durant l'étape d'oxydation des cystéines et de repliement des protéines d'où un chapitre traitant de la réactivité de la fonction thiol et de repliement oxydatif.

La dernière partie de ce mémoire traite les réactions secondaires qui ont été observées lors de la synthèse de ces toxines et des moyens de les maîtriser.

## Références

- Betz H.**, Homology and analogy in transmembrane channel design: Lessons from synaptic membrane proteins. *Biochemistry* (1990) **29**, 3591-3599.
- Cook, N. S., Quast, U.**, Potassium channels: Structure, classification, function, and therapeutic potential, *Chapter 8*, (Cook N.S., Ed) Chichester, U.K, Horwood (1990) pp 181-255
- Debin J.A., Maggio J.E., Strichartz G.R.**, Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am. J. Physiol. Soc.* (1993) **264**, C361-C369.
- Dreyer, F.**, Peptide toxins and potassium channels *Rev-physiol., Biochem-pharmacol.* (1990) **115**, 93-136.
- Hille B.**, Na and K channels of axons. *In ionic channels of excitable membranes (Sunderland & Massachusetts, Eds) Sinauerassociates inUSA* (1992) 59-82.
- Mintz I. M., Venema V. J., Swiderek K. M., Lee T. D., Bean B. P., Adams M.E.**, P-type calcium channels blocked by the spider toxin  $\omega$ -Aga-IVA. *Nature* (1992) **355**, 827-829.
- Moczydlowski, E., Lucchesi, K., and Ravindran, A.**, An emerging pharmacology of peptide toxins targeted against potassium channels. *J. Membr. Biol.* (1988) **105**, 95-111.

**II-DIVERSITE STRUCTURALE ET  
BIOLOGIQUE DES TOXINES DE  
SCORPION ET D'ARAIGNEE**

# DIVERSITE STRUCTURALE ET BIOLOGIQUE DES TOXINES DE SCORPION ET D'ARAIGNEE

## I-LES TOXINES DES VENINS DE SCORPION

Les scorpions appartenant à la famille des Buthidies représentent les espèces dangereuses pour l'homme. Leur venin renferme une variété de peptides toxiques pour les arthropodes et les mammifères. Ces peptides toxiques agissent comme des neurotoxines en modulant de manière très spécifique l'activité de canaux ioniques des membranes excitables  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$ . Les toxines de scorpion peuvent être classées en 2 catégories en fonction de la longueur de leur séquence (Ménez et al., 1992).

### A-Les toxines à chaîne longue

Ce sont des polypeptides ayant des séquences de longueur comprise entre 60 et 70 acides aminés et qui sont verrouillées par 4 ponts disulfure (Kopeyan et al. 1974, Rochat et al. 1979). Ces toxines varient considérablement dans leur spécificité et leur mode d'action apparent (Jover et al; 1980, Couraud et al. 1982). On en trouve trois groupes (Figure 1).

#### 1)-Toxines de type $\alpha$ .

Ces toxines affectent les canaux sodium chez les mammifères en induisant la prolongation de la dépolarisation des cellules nerveuses, musculaires et cardiaques et en ralentissant la vitesse d'inactivation des canaux sodium voltage-dépendant (Couraut et al. 19982). Ces toxines sont essentiellement isolées à partir des venins de scorpion des genres *Androctonus*, *Buthus* et *Leiurus*. On y trouve, par exemple, AaH II extraite d'*Androctonus australis* Hector (Rochat et al., 1972),



Lqq IV extraite de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (Kopeyan et al., 1985),  
Lqq V extraite de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (Kopeyan et al., 1978).

### **2)-Toxines de type $\beta$ .**

Ces toxines affectent les canaux sodium chez les mammifères en modifiant le potentiel d'activation des canaux sodium (Simard et Watt 1990). La plupart de ces toxines ont été isolées des venins de scorpion des genres *Centruroides* et *Tityus* : On citera en particulier TsVII extraite de *Tityus serrulatus* (Bechis et al., 1984). Des toxines de type  $\beta$  également présentes dans le venin de *Leiurus quinquestriatus* Lqh IT2 et Lqq IT1 extraites de (Zlotkin et al., 1985 et 1991).

### **3)-Insectotoxines.**

Ces toxines peuvent avoir une activité contracturante ou une activité relaxante. Ces deux groupes de toxines affectent les canaux sodium chez les insectes. Elles se fixeraient sur le même site, mais elles se différencient par leurs effets opposés sur les muscles des insectes. Elles sont essentiellement isolées à partir des mêmes scorpions *Androctonus* et *Leiurus*. On cite deux exemples : AaH IT extraite d'*Androctonus australis* Hector (Darbon et al., 1982) et Lqq IT1 extraite de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (Kopeyan et al., 1990).

Les toxines longues montrent toutes des similitudes de séquences entre elles (Figure 1) ainsi que des structures 3D analogues comme cela a été démontré par des études au moyen de la RMN 2D et les rayons X (Almassy et al. 1983, Fontecilla-Camps et al. 1980 et 1988, Pashkov et al. 1988, Darbon et al. 1991). La structure 3D de la toxine 3, extraite du venin du scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing, déterminée par radio-cristallographie (Fontecilla-Camps et al. 1980) montre une protéine globulaire (Figure 2) contenant 3 brins antiparallèles de feuillet  $\beta$  et une hélice  $\alpha$ . L'hélice est reliée aux 2 brins du feuillet par 2 des 4 ponts disulfure. Il a été également démontré que la toxine II du venin de scorpion *Androctonus australis* Hector (Fontecilla-Camps et al. 1988) ainsi que la toxine I du même scorpion (Darbon et al. 1991) sont caractérisées par des architectures globales similaires. Malgré les similitudes de séquences et de structures de ces

toxines entre elles, l'alignement de ces toxines met en évidence des insertions, des délétions et des mutations qui leur confèrent des spécificités variées. Il a été noté que seulement l'appariement de 3 ponts disulfure sur 4 est conservé (Ménez et al. 1992).

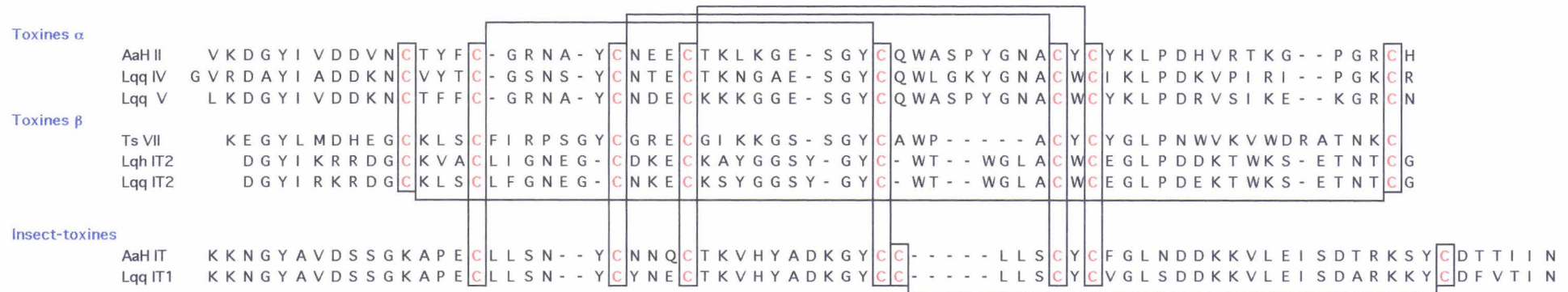


Figure 1 :Alignement de séquences de scorpion à chaîne longue

Toxines  $\alpha$  : AaH II (*Androctonus australis* Hector)

Lqq IV (*Leiurus quinquestriatus* )

Lqq V (*Leiurus quinquestriatus* )

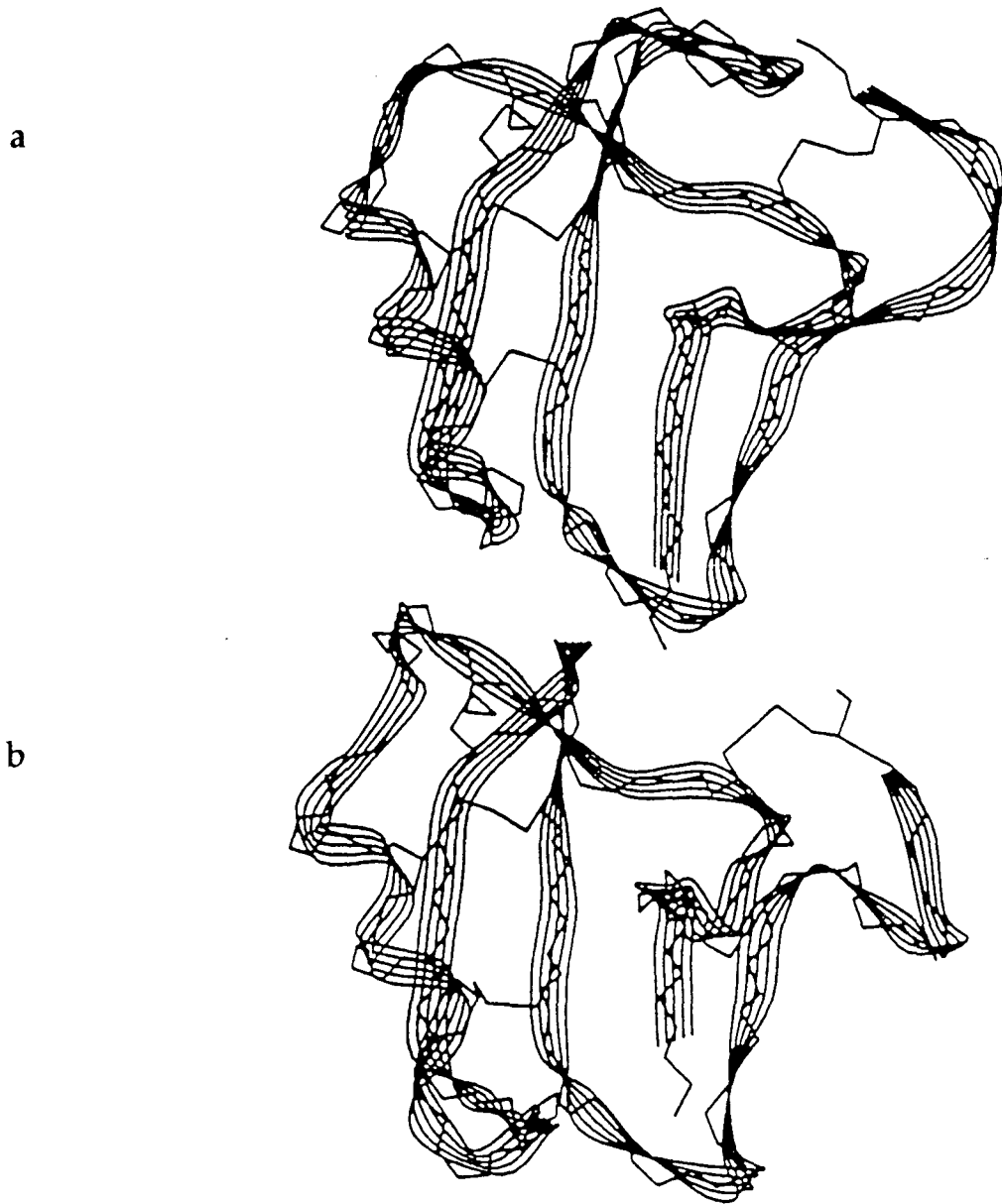
Toxines  $\beta$  : Ts (*T. serrulatus* )

Lqh IT2 ( *Leirus quinquestriatus hebraeus* )

Lqq IT2 ( *Leirus quinquestriatus quinquestriatus* )

insect-toxines : AaH IT (*Androctonus australis* Hector)

Lqq IT1 ( *Leirus quinquestriatus quinquestriatus* )



**Figure 2** : a) Structure 3D de la toxine II, du scorpion *Androctonus australis* Hector, déterminée par cristallographie aux rayons X (Fontecilla-Camps et al. 1988); b) Structure 3D de la toxine 3, du scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing (CsE-V3), déterminée par cristallographie aux rayons X (Fontecilla-Camps et al. 1980).

## **B-Les toxines à chaîne courte**

Ces toxines sont des polypeptides de longueur comprise entre 31 et 39 acides aminés et qui sont verrouillées par 3 à 4 ponts disulfure, ce qui leur confère une structure compacte très stable.

Les toxines courtes sont classées en fonction de leur activité physiologique et de la longueur de leur séquence.

### ***1)-Les toxines agissant sur les canaux potassium***

des mammifères sont des toxines " courtes" de 31 à 39 acides aminés avec 3 ponts disulfure.

- Charybdotoxine extraite du venin *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Gimenez-Gallego et al. 1988).

- Scyllatoxine extraite du venin *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Chicchi et al. 1988, Auguste et al. 1990).

- PO5 extraite du venin de *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Zerrouk et al 1993).

- Kaliotoxine extraite du venin de *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Crest et al 1992)

- Iberiotoxine extraite du venin *Buthus talamus* (Galvez et al., 1990, Johnson et al., 1992).

- Noxiustoxine extraite du venin *Centruroides noxius* (Possani et al. 1982)

### ***2)- Les toxines agissant chez les insectes***

et dont les cibles ne sont pas les canaux sodium sont aussi des toxines courtes de 34 à 36 acides aminés mais possédant 4 ponts disulfure.

- I<sub>5</sub>A extraite du venin de *Buthus eupeus* (Arseniev et al. 1984)

- I<sub>1</sub> extraite du venin de *Buthus eupeus* (Fazal et al. 1989)

- BsP<sub>1</sub> extraite du venin de *Buthus indicus* (Fazal et al. 1989)

- AmmP<sub>2</sub> extraite du venin d'*Androctonus mauretanicus* (Rochat et al. 1979).

3)-Récemment une toxine agissant sur les canaux chlore,

a été isolée : la chlorotoxine extraite du venin de scorpion *Leiurus quinquestriatus* (Debin et al. 1993). C'est une toxine de 36 acides aminés avec 4 ponts disulfure, dont la séquence s'apparente fortement à celles des insecto-toxines mentionnées ci dessus.

L'alignement des séquences primaires de ces différentes toxines de scorpion à chaîne courte (Figure 3), montre la présence d'un motif commun (Bontems et al. 1991b, Kobayashi et al. 1991) où la position des 6 cystéines est conservée. En outre le nombre d'acides aminés séparant la 2ième et la 3ième cystéine, la 5ième et la 6ième cystéine reste constant.

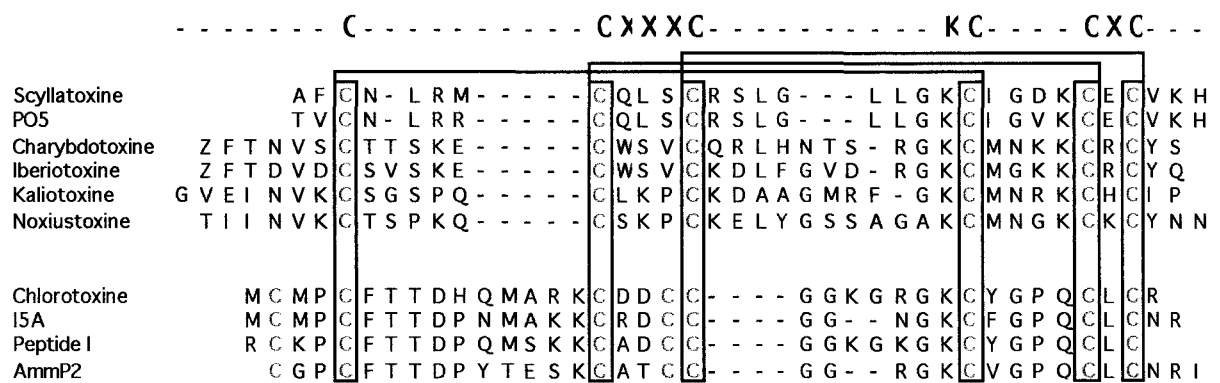
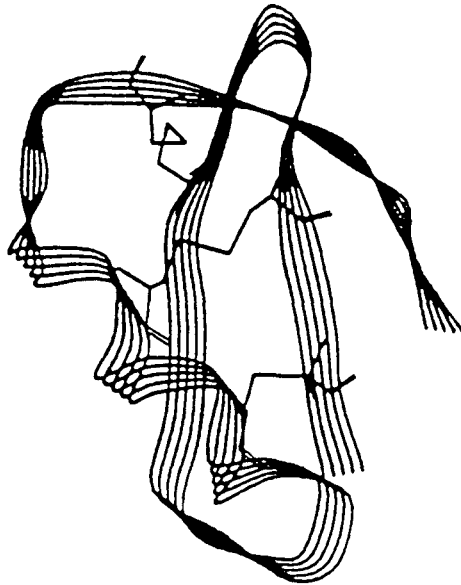


Figure 3 : Alignement des séquences de toxines, de scorpion, à chaîne courte.

L'analyse de séquences de ces toxines à chaîne courte ne montre pas une analogie nette avec les toxines à chaîne longue (Simard & Watt, 1990). Cependant l'appariement des 3 ponts disulfure du motif commun est analogue à celui des 3 ponts disulfure conservés dans les toxines à chaîne longue.

### -L'organisation structurale des toxines à chaîne courte.

La structure tridimensionnelle de la charybdotoxine déterminée par RMN 2D (Bontems et al. 1991) montre que la charybdotoxine est une molécule globulaire qui consiste en 3 petits brins de feuillet  $\beta$  reliés à une hélice  $\alpha$  courte par 2 ponts disulfure (Figure 4 ).



**Figure 4 :** Structure 3D de la charybdotoxine, isolée du venin de scorpion *Leiurus quinquestriatus*, déterminée par RMN (Bontems et al.,1991).

D'autres toxines de scorpion à chaîne courte et à 3 ponts disulfure et qui inhibent les canaux  $K^+/Ca^{2+}$  dépendant, telles que la scyllatoxine (Martins et al. 1990), l'iberiotoxine (Johnson et al., 1992), la PO5 (sabatier et al., 1993, Meunier et al., 1993) et la kaliotoxine (Crest et al., 1992) présentent des structures secondaires

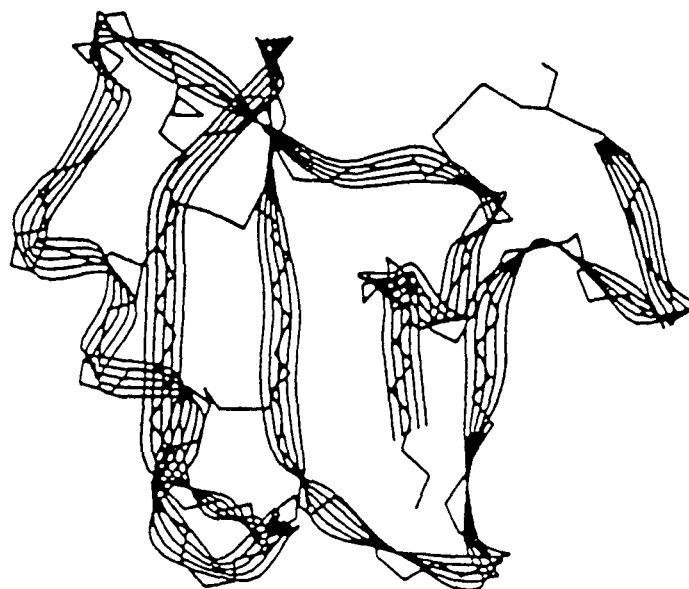
similaires à celle de la charybdotoxine à savoir une organisation typique hélice/feuillet. Les toxines de scorpion à chaîne courte et à 4 ponts disulfure telles que I<sub>5</sub>A (Arseniev et al. 1984), et plus récemment la chlorotoxine (Lippens et al. 1995) présentent le même motif structural que la charybdotoxine malgré la présence d'un 4ième pont disulfure.

La comparaison des structures 3D (Figures 4B) montre une nette similitude de structure entre les toxines à chaîne longue et la charybdotoxine.

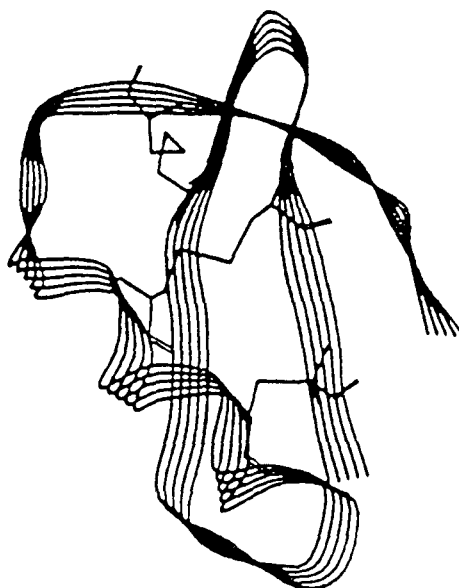
La figure 5 montre l'alignement de séquences de toxines de scorpion à chaîne courte et à chaîne longue et dont la structure secondaire a été élucidée par RMN ou rayons X. L'alignement de ces toxines révèle une bonne correspondance entre leurs éléments de structure secondaire, indépendamment de la taille de ces toxines. Au niveau du noyau structural (hélice/feuillet), la longueur de l'hélice  $\alpha$  et celles des deux brins du feuillet  $\beta$  du côté C-terminal, semblent changer légèrement d'une toxine à une autre et les segments reliant les éléments conservés (hélice/feuillet) peuvent adopter des boucles qui sont caractérisées non seulement par des mutations numériques mais aussi par des longueurs variables, comme cela est montré dans la figure 5. Par exemple les deux brins du feuillet  $\beta$  localisés dans la partie C-terminale, sont reliés l'un à l'autre par deux résidus dans le cas de la charybdotoxine de *Leiurus quinquestriatus*, de la toxine 3 de *Centruroides sculpturatus* Ewing (CsE-V3) et de l'insectotoxine AaH IT d'*Androctonus australis* Hector alors qu'ils sont reliés par sept résidus dans la toxine II d'*Androctonus australis* Hector et la toxine BeM9 de *Buthus eupeus* (Pashkov et al., 1988) qui est une toxine longue de type  $\alpha$  agissant chez les mammifères.



a



b



**Figure 4B** : Comparaison de structure 3D d'une toxine à chaîne courte et d'une toxine à chaîne longue. **a)** Structure 3D de la toxine 3, du scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing (CsE-V3), déterminée par cristallographie aux rayons X (Fontecilla-Camps et al. 1980). **b)** Structure 3D de la charybdotoxine, isolée du venin de scorpion *Leiurus quinquestriatus*, déterminée par RMN (Bontems et al., 1991a, b).

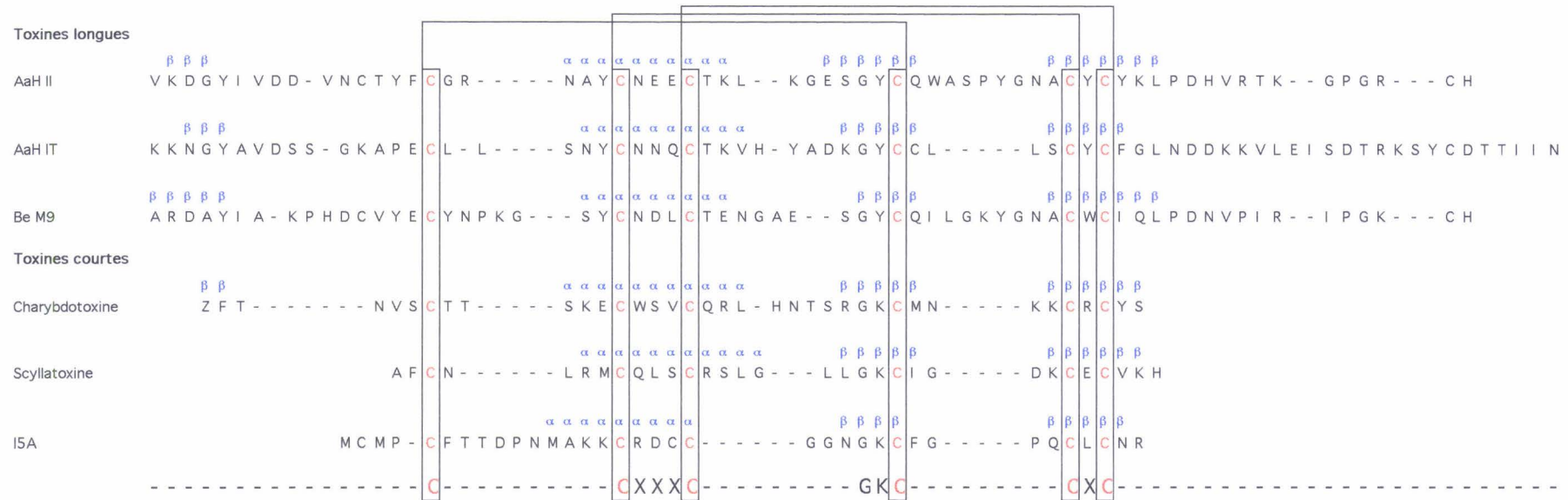


Figure 5 : Comparaison des séquences de toxines de scorpion à chaîne courte et à chaîne longue et dont la structure secondaire est connue.



aspartique et un acide glutamique et deux nouvelles charges positives sont rajoutées Lys30 et His31. En plus dans le cas de la PO5, par rapport à la scyllatoxine, une nouvelle charge positive arginine 7 apparaît au niveau de l'hélice, les trois arginines de l'hélice se situent du côté exposé au solvant et qui interagit avec le récepteur.

## II-LES TOXINES DES VENINS D'ARAIGNEE

Les toxines d'araignée contiennent une variété de neurotoxines et de nécrotoxines qui constituent une petite famille de facteurs humoraux doués de propriétés inflammatoires ainsi que de facteurs pouvant modifier plusieurs composantes de la circulation sanguine (Geren & Odell, 1984 ; Duchen & Gomez, 1984; Geren, 1986).

Les neurotoxines d'araignée contiennent également des cystéines, qui leur confèrent une structure stable comme les toxines de scorpion. Ces neurotoxines d'araignée agissent également sur les canaux ioniques. Cependant d'un point de vue structural, elles constituent un groupe beaucoup plus hétérogène autant par la longueur de leur chaîne que leur teneur en cystéines. Le mode d'action des neurotoxines d'araignée peut être présynaptique ou postsynaptique, activateur ou inhibiteur. Cependant le mécanisme moléculaire d'action de certaines de ces toxines n'est pas encore déterminé. L'origine et l'activité biologique de certaines toxines sont présentées dans la figure 7.

Ces neurotoxines peuvent être classées en 3 catégories en fonction de leur activité biologique, parmi lesquelles les toxines agissant sur :

- les canaux sodium
- les canaux calcium
- les insectes

Figure 7: Source et activité biologique de certaines toxines d'araignée.

toxines	type d'araignée	activité biologique
Agéline	<i>Agelena opulenta</i>	bloqueur présynaptique des canaux Ca.
$\omega$ -Agatoxines	<i>Agelenopsis aperta</i>	inhibiteur présynaptique : blocage des canaux Ca en inhibant de façon irréversible la libération des neurotransmetteurs au niveau des jonctions neuromusculaires.
$\mu$ -Agatoxines	<i>Agelenopsis aperta</i>	stimulateur présynaptique : active les canaux Na en induisant de façon irréversible la libération des neurotransmetteurs et autres au niveau des jonctions musculaires des insectes.
Neurotoxine Tx1	<i>Phoneutria nigriventer</i>	activation des canaux Na : provoquant le déchargement répétitif des potentiels d'action dans les membranes des fibres nerveuses et musculaires.
Neurotoxines Tx2	<i>Phoneutria nigriventer</i>	activation des canaux Na voltage-dépendant dans les membranes des cellules nerveuses et musculaires : provoquant la salivation, la lacrymation, des convulsions, la paralysie spasmodique des extrémités antérieures et postérieures et la mort suite à l'injection intracérébroventriculaire chez la souris.
Aptotoxines	<i>Aptostichus schlingeri</i>	activité paralytique et mortelle chez les larves d'insectes.
Curtatoxines	<i>Hololena curta</i>	activité paralytique et insecticide avec blocage présynaptique affectant les jonctions neuromusculaires chez les insectes.

## A-Les toxines agissant sur les canaux sodium

Dans cette catégorie, se trouvent également des toxines de nature non peptidique agissant sur les canaux  $\text{Na}^+$ , c'est le cas des  $\alpha$ -agatoxines qui sont des acylpolyamines (Quistad et al., 1990) de faible poids moléculaire, extraites du venin d'araignée *Agelenopsis aperta*.

Parmi les toxines de nature peptidique, on distinguera (Figure 8) :

- les  $\mu$ -agatoxines ( $\mu$ -aga I, II, III, IV, V et VI) extraites du venin d'*Agelenopsis aperta* (Skinner et al., 1989). Ce sont des neurotoxines contenant huit cystéines et présentent une forte homologie entre elles. Ces  $\mu$ -agatoxines agissent comme des stimulateurs présynaptiques : elles activent les canaux  $\text{Na}^+$  en induisant de façon irréversible la libération des neurotransmetteurs et autres au niveau des jonctions musculaires des insectes.

- des neurotoxines du venin d'araignée *Phoneutria nigriventer* à teneur variable en cystéines, parmi lesquelles :

- les neurotoxines TX2 (Cordeiro et al., 1992), la neurotoxine TX2-9 (32 résidus) avec six cystéines, les neurotoxines TX2-1 (53 résidus) et TX2-6 (48 résidus) avec dix cystéines et la neurotoxine TX2-5 (49 résidus) avec onze cystéines. Les neurotoxines TX2 activent les canaux  $\text{Na}^+$  voltage-dépendant dans les membranes des cellules nerveuses et musculaires, elles provoquent la salivation, la lacrymation, des convulsions, la paralysie spasmodique des extrémités antérieures et postérieures et la mort lors de l'administration par voie intracérébroventriculaire chez la souris.

- la neurotoxine TX1 (Diniz et al., 1990) (112 résidus) avec quatorze cystéines (la figure ne montre pas la partie N-terminale). La neurotoxine TX1 active les canaux  $\text{Na}^+$ , elle provoque le déchargement répétitif des potentiels d'action dans les membranes des fibres nerveuses et musculaires.

Ntx TX2-9	6C	32 AA	S F C I P F - - - K C K S D E N - - - C C K K F K - C K - T G I V K L - - - - C R W
$\mu$ -Aga I	8C	36 AA	E C V P E N G H - C R D W Y D E - - C C E G F Y - C S C R Q P P K - - - - C I C R N N N - N H 2
$\mu$ -Aga II	8C	37 AA	E C A T K N K - R C A D W A G P W - C C D G L Y - C S C R S Y P G - - - - C M C R P S S
$\mu$ -Aga III	8C	38 AA	A D C V G D G Q - R C A D W A G P Y - C C S G Y Y - C S C R S M P Y - - - - C R C R S D S - N H 2
$\mu$ -Aga IV	8C	37 AA	A C V G E N Q Q - C A D W A G P H - C C D G Y Y - C T C R Y F P K - - - - C I C R N N N - N H 2
$\mu$ -Aga V	8C	37 AA	A C V G E N K Q - C A D W A G P H - C C D G Y Y - C T C R Y F P K - - - - C I C R N N N - N H 2
$\mu$ -Aga VI	8C	37 AA	D C V G E S Q Q - C A D W A G P H - C C D G Y Y - C T C R Y F P K - - - - C I C V N N N
Ntx TX2-1	10C	53 AA	A T C A G Q D K P - C - - - K E T C D C C G E R G E C V C A L S Y E G K Y R C I C R Q G N F L I A W H K L A S C K
Ntx TX2-6	10C	48 AA	A T C A G Q D Q P - C - - - K E T C D C C G E R G E C V C - - - - G G P - - C I C R Q G Y F W I A W Y K L A N C K K
Ntx-TX2-5	11C	49 AA	A T C A G Q D T - - C - - - K V T C D C C G E R G E C V C - - - - G G P - - C I C R Q G N F L I A A Y K L A S C K C K
Ntx TX1	14C	112 AA	- A E L T S C F P V G H E - C D G D A S N C N C G D D V Y C G C G W G R W N - - - C K C K V A D Q S Y A Y - - - G I C K D K V N C P N R H L W P A K V C K K P C R R E C G G

Figure 8 : Alignement de séquences de neurotoxines des venins d'araignée agissant sur les canaux Na.  
 les neurotoxines TX1 et TX2 extraites de *Phoneutria nigriventer*  
 les  $\mu$ -agatoxines extraites d'*Agelenopsis aperta*  
 (la partie N-terminale de TX1 n'est pas représentée dans cette figure)

## B-les toxines agissant sur les canaux calcium

Dans cette catégorie, sont classées (Figure 9):

- l'agélénine extraite du venin d'*Agelena opulenta*, un polypeptide de 35 résidus dont six cystéines (Hagiwara et al., 1990) qui agit comme bloqueur présynaptique des canaux  $Ca^{2+}$ .

- les  $\omega$ -agatoxines extraites du venin d'*Agelenopsis aperta* :

l' $\omega$ -Aga IVA (Mintz et al., 1992) et l' $\omega$ -Aga IVB ou TK (Yu et al., 1993 ; Teramoto et al., 1993) contiennent 48 résidus dont huit cystéines. Il a été trouvé une toxine extrêmement intéressante : l' $\omega$ -Aga IVC, qui est biosynthétisée à partir de l' $\omega$ -Aga IVB par inversion de la configuration de la serine en position 46. Cette inversion de configuration de L en D est réalisée par une enzyme présente dans le venin d'*Agelenopsis aperta* (Gunther, 1994 ; Heck et al., 1994a, Heck et al., 1994b).

Les  $\omega$ -Aga IIIA et IIIB sont des toxines de 76 résidus, elles contiennent douze cystéines (Mintz et al., 1991). Récemment deux autres variantes d' $\omega$ -Aga III ont été isolées lors de la purification d' $\omega$ -Aga IIIA : il s'agit de  $\omega$ -Aga IIIC et IIID dont les séquences déterminées ne sont que partielles (Ertel et al., 1994). Toutes ces toxines de la famille  $\omega$ -Aga III présentent de fortes similitudes de séquences. La figure 9 montre que l'agélénine et les  $\omega$ -agatoxines IVA, IVB, IIIA et IIIB forment une famille homogène en alignant leurs cystéines.

Cependant, il existe une deuxième famille d' $\omega$ -agatoxines dont les cystéines ne s'alignent pas avec la première famille (agélénine,  $\omega$ -Aga IVA,  $\omega$ -Aga IVB,  $\omega$ -Aga IIIA,  $\omega$ -Aga IIIB), il s'agit de l' $\omega$ -Aga IIA constituée de 26 résidus dont six cystéines, l' $\omega$ -Aga IA faite de 66 résidus et l' $\omega$ -Aga IB de 36 résidus. Ces deux dernières toxines renferment un nombre impair de cystéines : elles ont respectivement neuf et cinq cystéines (Adams et al., 1990). Il a été démontré que l' $\omega$ -Aga IA est un hétérodimère (Santos et al., 1992) formé d'une chaîne majeure de 66 acides



aminés et une chaîne mineure de 3 acides aminés (Ser-Pro-Cys) reliées entre elles par un pont disulfure (Figure 10).

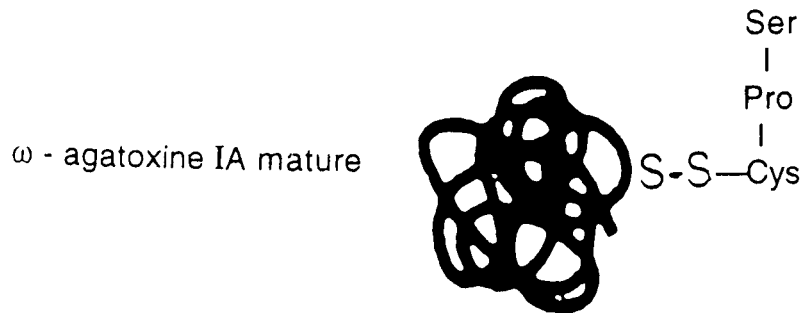


Figure 10 : représentation schématique de l' $\omega$ -agatoxine IA mature

Les  $\omega$ -agatoxines agissent comme des inhibiteurs présynaptiques, contrairement aux  $\mu$ -agatoxines qui sont des stimulateurs au niveau des canaux  $\text{Na}^+$ . Elles bloquent, en effet, les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  en inhibant de façon irréversible la libération des neurotransmetteurs au niveau des jonctions neuromusculaires.

- l' $\alpha$ -Latrotoxine est une neurotoxine isolée du venin de l'araignée *Lactrodectus mactans tredecimguttatus*, plus connue sous le nom de « veuve noire » (Grasso, 1976; Frontali et al., 1976). Elle est composée de deux polypeptides LTX de 130 kDa (Kiyatkin et al., 1990) et LMWP de 8 kDa (Kiyatkin et al., 1992). Elle se lie sélectivement aux terminaisons présynaptiques nerveuses des vertébrés et stimule la libération massive des neurotransmetteurs à partir de tous les types de synapses. Elle augmente la perméabilité des membranes au  $\text{Ca}^{2+}$  et par conséquent la libération des transmetteurs

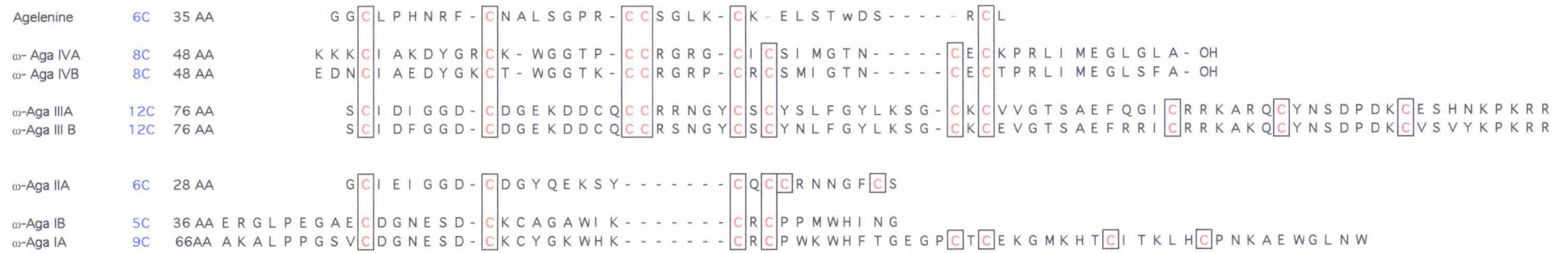


Figure 9 : Alignement de neurotoxines des venins d'araignée agissant sur les canaux Ca.  
 Agéénine extraite d'*Agelena opulenta*  
 Les  $\omega$ -agatoxines extraites d'*Agelenopsis aperta*

## C-Les toxines agissant sur les insectes

Dans ce groupe de toxines figure l' $\alpha$ -latroinsectotoxine isolée du venin de *Latroectus mactans tredecimguttatus* qui occupe une place à part en raison de sa taille (1411 résidus) (Kiyatkin et al., 1993). Elle est sans effet sur les vertébrés et a un mode d'action présynaptique similaire à celui de l' $\alpha$ -latrotoxine. On trouve également dans ce groupe les curtatoxines extraites du venin d'*Hololena curta* (Stapleton et al., 1990) et les aptotoxines extraites du venin d'*Aptostitus schlingeri*, neuf peptides insecticides ont été isolés de ce venin (Skinner et al., 1992). Ces insectotoxines (les curtatoxines et les aptotoxines) se répartissent en deux familles en fonction de l'alignement des cystéines (Figure 11).

- Dans la première famille sont regroupées l'aptotoxine VII de 32 résidus dont six cystéines et les curtatoxines 1, 2 et 3 avec un nombre d'acides aminés de 36 à 38 dont huit cystéines.

- Dans la deuxième famille figurent les aptotoxines IV et IX de 76 résidus dont huit cystéines.

Les aptotoxines ont une activité paralytique et mortelle chez les larves d'insectes. Les curtatoxines ont une activité paralytique et insecticide avec blocage présynaptique affectant les jonctions neuromusculaires chez les insectes. Le mécanisme d'action de ces neurotoxines insecticides reste indéterminé.

### *Comparaison des séquences de toxines d'araignée*

Dans la figure 12, ont été regroupées des toxines ayant des activités biologiques différentes et un nombre de cystéines variable mais qui d'un point de vue alignement des résidus de cystéine forment un ensemble homogène. L'analyse de l'alignement de la figure permet de constater la conservation des positions des six cystéines dans la famille 6C et qu'on retrouve également dans les autres familles à nombre plus élevé en cystéines. Ceci laisse supposer un appariement identique de ces 3 ponts disulfure dans ces différentes familles de toxines, par exemple, dans la famille à 8 cystéines, les deux cystéines supplémentaires

Aptotoxine VII	6C	32 AA	W L G [C] A R V K E A [C] G P W E W P - [C] [C] S G L K [C] - - D G S E - - - [C] H P Q
Curtatoxine 1	8C	36 AA	S [C] V G E Y G R [C] R S A Y E D - [C] [C] D G Y Y [C] N [C] S Q P P Y [C] L [C] R N N N - N H 2
Curtatoxine 2	8C	38 AA	A D [C] V G D G Q R [C] A D W A G P Y [C] [C] S G Y Y [C] S [C] R S M P Y [C] R [C] R S D S - N H 2
Curtatoxine 3	8C	38 AA	A D [C] V G D G Q K [C] A D W F G P Y [C] [C] S G Y Y [C] S [C] R S M P Y [C] R [C] R S D S - N H 2
Aptotoxine IV	8C	76 AA	E I P Q N L G S G I P H D R I K L P N G Q W [C] K T P G D L [C] S S S S E - - [C] [C] K A K H S N S V T Y A S F [C] S R E W S G Q Q G L F I N Q [C] R T [C] N V E S S M [C]
Aptotoxine IX	8C	76 AA	E I P Q N L G S D I P H D I I K L P N G Q W [C] K T P G A L [C] S S R S E - - [C] [C] K A K H S D S V T Y S S G [C] S R Q W S D Q Q G L F I N Q [C] R T [C] N V E S S M [C]

Figure11 : Alignement de séquences de neurotoxines d'araignée agissant sur les insectes  
 Les aptotoxines extraites d'*Aptostichus schlingeri*  
 Les curtatoxines extraites d'*Hololena curta*

devraient s'apparier entre elles (Figure 13). Cette hypothèse a été confirmée en déterminant la localisation des ponts disulfure:

- par coupure enzymatique dans le cas de l'agélénine (Inui et al., 1992), de l' $\omega$ -agatoxine IVA (Nishio et al., 1993), et de la  $\mu$ -agatoxine V (Skinner et al., 1989).

- par RMN dans le cas de l' $\omega$ -agatoxine IVB (Yu et al., 1993)

Pour les autres toxines présentées dans la figure 13, les  $\mu$ -agatoxines I, II, III, IV, VI (Skinner et al., 1989) et les curtatoxines 1, 2, 3 (Stapleton et al., 1990), la localisation des ponts disulfure a été déterminée uniquement par méthode prédictive.

Et maintenant si l'on examine l'alignement des séquences de toxines à 8 cystéines (Figure 12) c'est à dire les  $\mu$ -agatoxines et les  $\omega$ -agatoxines IV A et IV B du venin d'*Agelenopsis aperta*, et les curtatoxines 1, 2 et 3 d'*Hololena curta* on remarque qu'en plus de la conservation des positions des 8 cystéines retrouvées dans les autres toxines à nombre plus élevé en cystéines, le nombre d'acides aminés séparant la séquence Cys-Cys et la Cystéine suivante est constant, il se limite à 4 acides aminés et il y a conservation de la position d'une glycine distante d'un acide aminé de la séquence Cys-Cys. Dans cette famille on observe la conservation du motif suivant :

--Cys-[.....]-Cys-[.....]-Cys-Cys-X-Gly-X-X-Cys-X-Cys-[.....]-Cys-X-Cys--

La conservation de l'appariement des cystéines dans les  $\mu$ -agatoxines et les curtatoxines est probablement liée à la forte homologie de séquences existant entre ces toxines. Ces caractéristiques structurales pourraient expliquer la similitude de l'activité biologique (Figure 7) et permet de penser qu'elles ont probablement des structures tridimensionnelles similaires.

Les neurotoxines Tx3-1 et Tx3-2, extraites du venin d'araignée *Phoneutria nigriventer*, ont 8 cystéines (Cordeiro et al., 1993), conservant les mêmes positions que dans les autres séquences (figure 12).

Ntx TX2-9	6C	S F C I P F - - - K C K S D E N - - - C C K K F K - C K - T G I V k L - - - - - C R W
Agélinine	6C	G G C L P H N R F - C N A L S G P R - C C S G L K - C K - E L S T w D S - - - - R C L
Aptotoxine VII	6C	W L G C A R V K E A - C G P W E W P - - C C S G L K - C - - D G S E - - - - - C H P Q
$\mu$ -Aga I	8C	E C V P E N G H - C R D W Y D E - - C C E G F Y - C S C R Q P P K - - - - - C I C R N N N - NH <sub>2</sub>
$\mu$ -Aga II	8C	E C A T K N K - R C A D W A G P W - C C D G L Y - C S C R S Y P G - - - - - C M C R P S S
$\mu$ -Aga III	8C	A D C V G D G Q - R C A D W A G P Y - C C S G Y Y - C S C R S M P Y - - - - - C R C R S D S - NH <sub>2</sub>
$\mu$ -Aga IV	8C	A c V G E N Q Q - C A D W A G P H - C C D G Y Y - C T C R Y F P K - - - - - C I C R N N N - NH <sub>2</sub>
$\mu$ -Aga V	8C	A C V G E N K Q - C A D W A G P H - C C D G Y Y - C T C R Y F P K - - - - - C I C R N N N - NH <sub>2</sub>
$\mu$ -Aga VI	8C	D C V G E S Q Q - C A D W A G P H - C C D G Y Y - C T C R Y F P K - - - - - C I C V N N N
Curtatoxine 1	8C	S C V G E Y - G R C R S A Y E D - - C C D G Y Y - C N C S Q P P Y - - - - - C L C R N N N - NH <sub>2</sub>
Curtatoxine 2	8C	A D C V G D G Q - R C A D W A G P Y - C C S G Y Y - C S C R S M P Y - - - - - C R C R S D S - NH <sub>2</sub>
Curtatoxine 3	8C	A D C V G D G Q - K C A D W F G P Y - C C S G Y Y - C S C R S M P Y - - - - - C R C R S D S - NH <sub>2</sub>
$\omega$ -Aga IVA	8C	K K K C I A K D Y G R C K - W G G T P - C C R G R G - C I C S I M G T N - - - - - C E C K P R L I M E G L G L A - OH
$\omega$ -Aga IVB	8C	E D N C I A E D Y G K C T - W G G T K - C C R G R P - C R C S M I G T N - - - - - C E C T P R L I M E G L S F A
Ntx Tx3-1	8C	A E C A A V Y E - R C G K G Y K R - - C C E E R P - C K C N I V M D N - - - - - C T C K K F I S E
Ntx Tx3-2	8C	A C A G L Y K - K C G K G A S P - - C C E D R P - C K C D L A M G N - - - - - C I C K
Ntx TX2-1	10C	A T C A G Q D K P - C - - - K E T C D C C G E R G E C V C A L S Y E G K Y R - C I C R Q G N F L I A W H K L A S C K
Ntx TX2-6	10C	A T C A G Q D Q P - C - - - K E T C D C C G E R G E C V C - - - - G G P - - - C I C R Q G Y F W I A W Y K L A N C K K
Ntx-TX2-5	11C	A T C A G Q D T - - C - - - K V T C D C C G E R G E C V C - - - - G G P - - - C I C R Q G N F L I A A Y K L A S C K C K
$\omega$ -Aga IIIA	12C	S C I D I G G D - C D G E K D D C Q C C R R N G Y C S C Y S L F G Y L K S G C K C V V G T S A E F Q - - - G I C R R K A R Q C Y N S D - - P D K - C E S H N K P K R R
$\omega$ -Aga IIIB	12C	S C I D F G G D - C D G E K D D C Q C C R S N G Y C S C Y N L F G Y L K S G C K C E V G T S A E F R R - - - I C R R K A K Q C Y N S D - - P D K - C V S V Y K P K R R
Ntx TX1	14C	- A E L T S C F P V G H E - C D G D A S N C N C C G D D V Y C G C G W G R W N - - - - C K C K V A D Q S Y A Y - - - G I C K D K V N - C P N R H L W P A K V C K K P C R R E C G G

Figure 12 : Aligement de séquences de différentes familles de toxines d'araignée.

Les toxines à 6 cystéines : neurotoxine Tx2-9 de *Phoneutria nigriventer*,

agelenine d'*Agelena opulenta* et aptotoxine VII d'*Aptostichus schlingeri*

Les toxines à 8 cystéines : les  $\mu$ -agatoxines I, II, III, IV, V, VI et les

$\omega$ -agatoxines IV A et IV B d'*Agelenopsis aperta*, les curtatoxines I, II et III

de *Hololena curta* et les neurotoxines Tx3-1 et Tx3-2 de *Phoneutria nigriventer*.

Les toxines à 10 cystéines : les neurotoxines Tx2-1 et Tx2-6 de *Phoneutria nigriventer*.

Une toxine à 11 cystéines : la neurotoxine Tx2-5 de *Phoneutria nigriventer*.

Les toxines à 12 cystéines : les  $\omega$ -agatoxines III A et III B d'*Agelenopsis aperta*.

Une toxine à 14 cystéines : la neurotoxine Tx1 de *Phoneutria nigriventer* (il manque la partie N-terminale dans cette figure).



Figure 13 : Alignement de séquences de toxines dont l'appariement des cystéines a été déterminée (l'agélinine, les  $\mu$ -agatoxines, les  $\omega$ -agatoxines IVA et IVB et les curtatoxines) et leur comparaison avec les neurotoxines TX3 à 8 cystéines.

Cependant la glycine n'est pas conservée et elle est remplacée par des acides aminés dicarboxyliques dans les deux cas. Le degré d'homologie de ces 2 toxines avec les autres toxines à 8 cystéines est très faible. Les neurotoxines TX3 provoquent différents symptômes neurologiques chez la souris après injection intracérébroventriculaire (le mécanisme d'action n'est pas encore bien connu).

Les toxines d'araignée à huit cystéines ont été regroupées dans la figure 14. L'analyse de cette figure permet de distinguer trois familles selon l'alignement de leurs cystéines. La première famille contient les  $\mu$  et  $\omega$  agatoxines, les curtatoxines et les neurotoxines TX3. La seconde famille regroupe les toxines d'araignée à 8 cystéines dont les positions des cystéines ne s'alignent pas avec celles de la première : il s'agit de la robustotoxine d'*Atrax robustus* mâle (Sheumack et al., 1985) et de la versutoxine d'*Atrax versutus* (Brown et al., 1988) qui sont des neurotoxines létales. Il existe une forte homologie de séquence entre les deux toxines. La robustotoxine, dont le mécanisme d'action a été déterminé, agit comme activateur présynaptique au sein du système nerveux humain. La troisième famille contient les aptotoxines IV et VI d'*Aptostichus schlingeri*.



$\mu$ -Aga I	8C	36 AA
$\mu$ -Aga II	8C	37 AA
$\mu$ -Aga III	8C	38 AA
$\mu$ -Aga IV	8C	37 AA
$\mu$ -Aga V	8C	37 AA
$\mu$ -Aga VI	8C	37 AA
Curtatoxine 1	8C	36 AA
Curtatoxine 2	8C	38 AA
Curtatoxine 3	8C	38 AA
$\omega$ -Aga IVA	8C	48 AA
$\omega$ -Aga IVB	8C	48 AA
Ntx Tx3-1	8C	40 AA
Ntx Tx3-2	8C	34 AA

Famille 1

```

E C V P E N G H - C R D W Y D E - C C E G F Y C S C R Q P P K - C I C R N N N - NH2
E C A T K N K - R C A D W A G P W C C D G L Y C S C R S Y P G - C M C R P S S
A D C V G D G Q - R C A D W A G P Y C C S G Y Y C S C R S M P Y - C R C R S D S - NH2
A C V G E N Q Q - C A D W A G P H C C D G Y Y C T C R Y F P K - C I C R N N N - NH2
A C V G E N K Q - C A D W A G P H C C D G Y Y C T C R Y F P K - C I C R N N N - NH2
D C V G E S Q Q - C A D W A G P H C C D G Y Y C T C R Y F P K - C I C V N N N
S C V G E Y G - R C R S A Y E D - C C D G Y Y C N C S Q P P Y - C L C R N N N - NH2
A D C V G D G Q - R C A D W A G P Y C C S G Y Y C S C R S M P Y - C R C R S D S - NH2
A D C V G D G Q - K C A D W F G P Y C C S G Y Y C S C R S M P Y - C R C R S D S - NH2
K K K C I A K D Y G R C K - W G G T P C C R G R G C I C S I M G T N C E C K P R L I M E G L G L A - OH
E D N C I A E D Y G K C T - W G G T K C C R G R P C R C S M I G T N C E C T P R L I M E G L S F A
A E C A A V Y E - R C G K G Y K R - C C E E R P C K C N I V M D N C T C K K F I S E
A C A G L Y K - K C G K G A S P - C C E D R P C K C D L A M G N C I C K

```

Famille 2

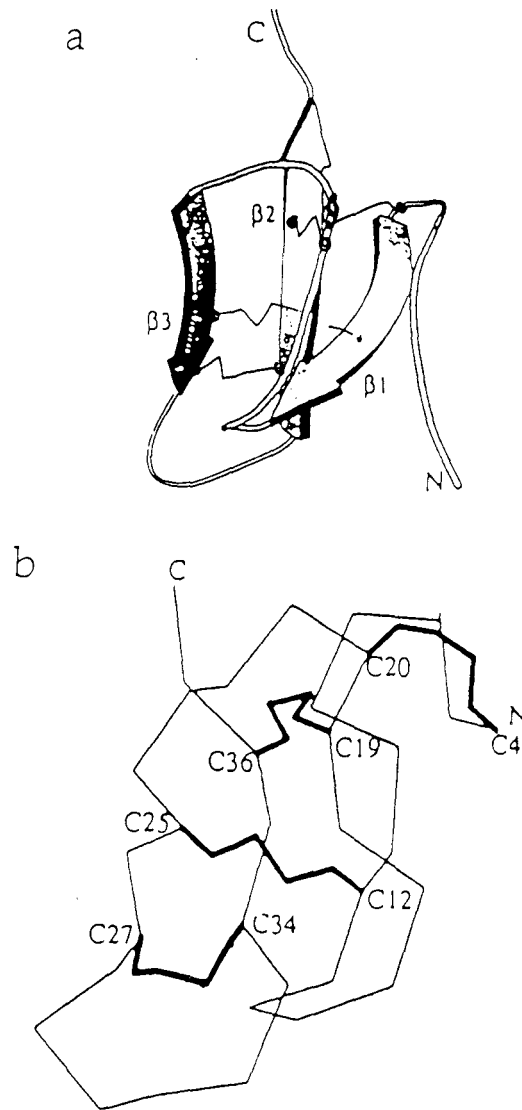
Aptotoxine IV	8C	76 AA	E I P Q N L G S G I P H D R I K L P N G Q W	C	K T P G D L -	C	S S S S E	C C	K A K H S N S V T Y A S F	C	S R E W S G Q Q G L F I N Q	C	R T	C	N V E S S M	C
Aptotoxine IX	8C	76 AA	E I P Q N L G S D I P H D I I K L P N G Q W	C	K T P G A L -	C	S S R S E	C C	K A K H S D S V T Y S S G	C	S R Q W S D Q Q G L F I N Q	C	R T	C	N V E S S M	C

Famille 3

Versutoxine	8C	42 AA	C	A K K R N W -	C	G K T E D	C C C	P M K	C	V Y A W Y N E Q G S	C	Q S T I S A L W K K	C
Robustoxine	8C	42 AA	C	A K K R N W -	C	G K T E D	C C C	P M K	C	I Y A W Y N Q Q G S	C	Q T T I T G L F K K	C

Figure 14 : les trois familles de toxines d'araignée à huit cystéines  
Famille 1 contient les  $\mu$ -agatoxines, les  $\omega$ -agatoxines IVA et IVB, les curtatoxines et les neurotoxines TX3  
Famille 2 contient les aptotoxines IV et IX.  
Famille 3 contient la versutoxine et robustotoxine

On s'aperçoit que les familles de toxines d'araignée sont très hétérogènes et elles ne sont pas encore aussi bien étudiées que les toxines de scorpion, en ce qui concerne leur mécanisme d'action et leur structure tridimensionnelle. Actuellement, il n'y a qu'une toxine, l' $\omega$ -Aga IV B dont la structure tridimensionnelle a été déterminée par spectroscopie RMN (Yu et al., 1993). De ce fait, on ne peut pas établir pour ces différentes familles de toxines des relations séquence-structure et structure-activité. La structure 3D de l' $\omega$ -agatoxine IVB, extraite du venin d'*Agelenopsis aperta*, montre l'absence de l'hélice  $\alpha$ . Elle comporte trois brins  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$  qui constituent le feuillet  $\beta$  antiparallèle (Figure 15). Les brins  $\beta_2$  et  $\beta_3$  sont interconnectés par le pont disulfure 27-34, alors que la boucle connectant les brins  $\beta_1$  et  $\beta_3$  est liée au feuillet  $\beta$  par les deux ponts disulfure 19-36 et 12-25. Le pont disulfure 4-20 et les résidus hydrophobes Ile5 et Tyr9 aident à stabiliser la région N-terminale de la protéine.



**Figure 15 :** a) Structure tertiaire de l'ω-Aga IVB. N et C désignent respectivement l'extrémité N et C terminale et les flèches désignent les trois brins β1, β2 et β3 du feuillet β. b) Squelette structural de l'ω-Aga IVB. Les 3 résidus N-terminaux et les 10 résidus C-terminaux ne sont pas montrés. Les ponts disulfure sont dessinés en gras. (Yu et al., 1993).

## Références

- Adams M. E., Bindokas V. P., Hasegawa L., Venema V. J.,  $\omega$ -Agatoxins: novel calcium channel antagonists of two subtypes from funnel web spider (*Agelenopsis aperta*) venom. *J. Biol. Chem.* (1990) **265**, 861-867.
- Almassy R.J., Fontecilla-Camps J.C., Suddath F.L., Kaiser I.I., Structure of variant-3 scorpion neurotoxin from *Centruroides sculpturatus*. Ewing, refined at 1.8Å resolution. *J. of Mol. Biol.* (1983) **170**, 497-527.
- Arseniev A.S., Kondakov K.I., Maiorov V.N., Bystrov V.F., NMR solution spatial structure of 'short' scorpion insectotoxin I<sub>5</sub>A. *FEBS Lett.* (1984) **165**, 57-62.
- Auguste P., Hugues M., Gravé B., Gesquière J.C., Maes P, Tartar A., Romey G., Schweitz H., Lazdunski M., Leiurotoxin I (Scyllatoxin), a peptide ligand for Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* (1990) **265**, 4753-4759.
- Bechis G., Sampeiri F., Yuan P.M., Brando T., Martin M.F., Dinitz C., Rochat H., Amino acid sequence of toxin VII, A B-Toxin from the venom of Scorpion *Tityus Serrulatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1984) **122**, 1146-1153.
- Bontems F., Roumestand C., Boyot P., Gilquin B., Doljanski Y., Ménez A., Toma F., Three-dimensional structure of natural charybdotoxin in aqueous solution by <sup>1</sup>H NMR. Charybdotoxin possess a structural motif found in other scorpion toxins. *Eur. J. Biochem.* (1991a) **196**, 19-28.
- Bontems F., Roumestand C., Gilquin B., Ménez A., Toma F., The refined structure of charybdotoxin reveals the presence of a common structural motif in scorpion toxins and insect defensins. *Science* (1991b) **254**, 1521-1523.

**-Brown M. R., Sheumack D. D., Tyler M. I., Howden M. E. H.,** Amino acid sequence of versutoxin, a lethal neurotoxin from the venom of the funnel-web spider *Atrax versutus*. *Biochem. J.* (1988) **250**, 401-405.

**-Chicchi G.G., Gimenez-Gallego G., Ber E., Garcia M.L., Winkvist R., Cascieri M.A.,** Purification and characterization of a unique, potent inhibitor of Apamin binding from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* venom. *J. Biol. Chem.* (1988) **263**, 10192-10197.

**-Cordeiro M. N., Diniz C. R., Valentim A. C., Von Eickstedt V. R. D., Gilroy J., Richardson M.,** The purification and amino acid sequences of four TX2 neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* *FEBS Lett.* (1992) **310**, 153-156.

**-Cordeiro M. do N., de Figueiredo S. G., Valentim A. do C., Diniz C. R., Von Eickstedt V. R., Gilroy J., Richards M.,** Purification and amino acid sequences of six TX3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *phoneutria nigriventer* (keys.). *Toxicon* (1993) **31**, 35-42.

**-Couraud F., Jover E., Dubois J.M., Rochat H.,** Two scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon* (1982) **20**, 9-16.

**-Crest M., Jacquet G., Gola M., Zerrouk H., Benslimane A., Rochat H., Mansuelle P., Martin-Euclaire M.F.,** Kaliotoxin, a novel peptidyl inhibitor of neuronal BK-type  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels characterized from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* venom. *J. Biol. Chem.* (1992) **267**, 1640-1647.

**-Darbon H., Zlotkin E., Kopeyan C., Van Rietschoten J., Rochat H.,** Covalent structure of the insect toxin of the North African scorpion *Androctonus australis* Hector. *Int. J. Pept. Prot. Res.* (1982) **20**, 320-330.

- Darbon H., Weber C., Braun W., Two-dimensional  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance study of AaH IT, an anti-insect toxin from the scorpion *Androctonus australis* Hector. Sequential resonance assignments and folding of the polypeptide chain. *Biochemistry* (1991) **30**, 1836-1845.
- Debin J.A., Maggio J.E., Strichartz G.R., Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am. J. Physiol. Soc.* (1993) **264**, C361-C369.
- Dill K.A., Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* (1990) **29**, 7133-7155.
- Diniz C. R., Cordeiro M. N., Rezende L. JR., Kelly P., Fischer S., Reimann F., Oliveira E. B., Richardson M., The purification and amino acid sequence of the lethal neurotoxin TX1 from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*. *FEBS Lett.* (1990) **263**, 251-253.
- Duchen L.W. & Gomez S., Pharmacology of spider venoms. *In insect poisons, allergens, and other vertebrate venoms. Handbook of Natural Toxins* (Edited by TU A. T.) (1984) **2**, 483-512. Marcel Dekker, New York.
- Ertel E. A., Warren V. A., Adams M. E., Griffin P. R., Cohen C. J., Smith M. M., Type III  $\omega$ -agatoxins: a family of probes for similar binding sites on L- and N-type calcium channels. *Biochemistry* (1994) **33**, 5098-5108.
- Fazal A., Beg O.U., Shafgat J., Zaidi Z.H., Jornvall H., Characterization of two different peptides from the venom of the scorpion *Buthus indicus*. *FEBS Lett.* (1989) **257**, 260-262.
- Fontecilla-Camps J.C., Almasy R.J., Suddath F.L., Watt D.D., Bugg C.E., Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: a new structural class of neurotoxins. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* (1980) **77**, 6496-6500.

-Fontecilla-Camps J.C, Habersetzer-Rochat C., Rochat H., Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* (1988) **85**, 7443-7447.

-Frontali N., Ceccarelli B., Gorio A., Mauro A., Siekewitz P., Tzeng M.C., Hurlbut W.P., Purification from black widow spider venom of a protein factor causing the depletion of synaptic vesicles at neuromuscular junctions. *J. Cell. Biol.* (1976) **68**, 462-479.

-Galvez A., Gimenez-Gallego G., Reuben J.P., Roy-Contancin L., Feigenbaum P., Kaczorowski G.J., Garcia M.L., Purification and Characterization of a Unique, Potent, Peptidyl Probe for the High Conductance Calcium-activated Potassium Channel from Venom of the Scorpion *Buthus Tamulus*. *J. Biol. Chem.* (1990) **265**, 11083-11090.

-Geren C. R. Neurotoxins and necrotoxins of spider venoms., *J. Toxicol. Toxin Rev.* (1986) **5**, 161-170.

-Geren C. R. & Odell G.V., The biochemistry of spider venoms. *In insects poisons, allergens, and other vertebrate venoms. Handbook of Natural Toxins* (Edited by TU A. T.) (1984) **2**, 441-481. Marcel Dekker, New York.

-Gimenez-Gallego G., Navia M.A., Reuben J., Katz G.M., Kaczorowski G.J., Garcia M.L., Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1988) **85**, 3329-3333.

-Gordon D., Jover E., Couraud F., Zlotkin E., The binding of teh insect selective neurotoxin (AaIT) from scorpion venom to locust synaptosomal membranes. *Biochem. Biophys. Acta* (1984) **778**, 349-358.

-Grasso A., Preparation and properties of a neurotoxin purified from the venom of black widow spider (*latrodectus mactans tredecimguttatus*) *Biochim. Biophys. Acta* (1976) **439**, 406-412.

-**Gunther K.**, Conversion of L- to D-amino acids: a posttranslational reaction. *Science* (1994) **266**, 996-997.

-**Hagiwara K., Sakai T., Miwa A., Kawai N., Nakajima T.**, Complete amino-acid sequence of a new type of neurotoxin from the venom of the spider, *Agelena opulenta*. *Biomed. Res.* (1990) **1**, 181-186.

-**Heck S. D., Kelbaugh P.R., Kelly M. E., Thadeio P. F., Saccomano N. A., Stroh J. G., Volkman R., A.** Disulfide bond assignment of  $\omega$ -agatoxins IVB and IVC: discovery of a D-serine residue in  $\omega$ -agatoxin IVB. *J. Am. Chem. Soc.* (1994a) **116**, 10426-10436.

-**Heck S. D., Siok C. J., Krapcho K. J., Kelbaugh P. R., Thadeio P. F., Welch M. J., Williams R. D., Ganong A. H., Kelly M. E., Lanzetti A. J., Gray W. R., Phillips D., Parks T. N., Jackson H., Ahlijanian M. K., Saccomano N. A., Volkman R. A.**, Functional consequences of posttranslational isomerisation of Ser<sup>46</sup> in a calcium channel toxin. *Science* (1994b) **266**, 1065-1068.

-**Inui T., Hagiwara K., Nakajima K., Kimura T., Nakajima T., Sakakibara S.**, Synthesis and disulfide structure determination of Agelenin: identification of the Carboxy-terminus as an amide form. *Peptide Res.* (1992) **5**, 140-144.

-**Johnson B.A., Sugg E.E.**, Determination of the three-dimensional structure of Iberiotoxin in solution by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* (1992) **31**, 8151-8159.

-**Jover E., Couraud F., Rochat H.**, Type of Scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res Commun* (1980) **95**, 1607-1614.



**-Kiyatkin N.I., Dulubova I.E., Chekhovskaya I.A., Grishin E.V.,** Cloning and structure of a cDNA encoding  $\alpha$ -latrotoxin from window spider venom. *FEBS Lett.* (1990) **270**, 127-131.

**-Kiyatkin N.I., Dulubova I.E., Chekhovskaya I.A., Lipkin A.V., Grishin E.V.,** Structure of the low molecular weight protein copurified with  $\alpha$ -latrotoxin. *Toxicon* (1992a) **30**, 771-774.

**-Kiyatkin N., Dulubova I., Grishin E.,** Cloning and structural analysis of  $\alpha$ -latroinsectotoxin cDNA. Abundance of ankyrin-like repeats. *Eur. J. Biochem.* (1993) **213**, 121-127.

**-Kobayashi Y., Takashima H., Tamaoki H., Kyogoku Y., Lambert P., Kuroda H., Chino N., Watanabe T.X., Kimura T., Sakakibara S., Moroder L.,** The cystine-stabilized  $\alpha$ -helix: a common structural motif of ion-channel blocking neurotoxic peptides. *Biopolymers* (1991) **31**, 1213-1220.

**-Kopeyan C., Mansuelle P., Sampeiri F., Brando Th., Bahraoui El M., Rochat H., Granier C.,** Primary structure of scorpion anti-insect toxins isolated from the venom of *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *FEBS Lett.* (1990) **261**, 423-426.

**-Kopeyan C., Martinez G., Lissitzky S., Miranda F., Rochat H.,** Disulfide bonds of toxin II of the scorpion *Androctonus australis* Hector *Eur. Jour. Biochem.* (1974) **47**, 483-489.

**-Kopeyan C., Martinez G., Rochat H.,** Amino acid sequence of neurotoxin V from the Scorpion *Leiurus Quiquestriatus Quinquestriatus*. *FEBS Lett.* (1978) **89**, 54-58.

**-Kopeyan C., Martinez G., Rochat H.,** Primary structure of toxin IV of *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* *FEBS Lett.* (1985) **181**, 211-217.

-Lippens G., Najib J., Wodak S.J., Tartar A., NMR sequential assignments and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels. *Biochemistry* (1995) **34**, 13-21.

-Martins J.C., Zhang W., Tartar A., Lazdunski M., Borremans F.A.M., Solution conformation of Leiurotoxin I (Scyllatoxin) by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance *FEBS Lett.* (1990) **260**, 249-253.

-Ménez A., Bontems F., Roumestand C., Gilquin B., Toma F., Structural basis for functional diversity of animal toxins. *Proc. Roy. Soc. of Edinburgh.* (1992) **99B**, 83-103.

-Meunier S., Bernassau J.M., Martin-Eauclaire M.F., Van Rietschoten J., Cambillau C., Darbon H., Solution structure of PO5-NH<sub>2</sub>, a Scorpion toxin Analog with high affinity for the apamin-sensitive potassium channel. *Biochemistry* (1993) **32**, 11969.

-Mintz I. M., Venema V. J., Adams M. E., Bean B. P., Inhibition of N- and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by the spider venom toxin  $\omega$ -Ag-IIIa. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* (1991) **88**, 6628-6631.

-Mintz I. M., Venema V. J., Swiderek K. M., Lee T. D., Bean B. P., Adams M.E., P-type calcium channels blocked by the spider toxin  $\omega$ -Aga-IVA. *Nature* (1992) **355**, 827-829.

-Pashkov V.S., Maiorov V.N., Bystrov V.F., Hoang A.N., Volkova T.M., Grishin E.V., Solution spatial structure of 'long' neurotoxin M<sub>9</sub> from the scorpion *Buthus eupeus* by  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy. *Biophys. Chem.* (1988) **31**, 121-131.

- Possani L.D., Martin M.B., Svendsen I.B.,** The primary structure of noxiustoxin: a K<sup>+</sup> channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *Carlsberg Res. Commun* (1982) **47**, 285-289.
- Quistad G. B., Suwanrumpha S., Jarema M.A., Shapiro M.J., Skinner W.S., Jamieson G.C., Lui A., Fu E.W.,** Structure of paralytic acylpolyamines from the spider *agelenopsis aperta*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* (1990) **169**, 51-56.
- Rochat H., Bernard P., Couraud F.,** Scorpion toxins: chemistry and mode of action. In *Adv. Cytopharmacol.* (Ceccarelli B., Clementi F., Eds) *Raven, New York* (1979) **3**, 325-334.
- Rochat H., Rochat C., Sampeiri F., Miranda F., Lissitsky S.,** The amino-acid sequence of neurotoxin II of *Androctonus australis* Hector. *Eur. J; Biochem.* (1972) **28**, 381-388.
- Sabatier J.M, Zerrouk H., Darbon H., Mabrouk K., Benslimane A., Rochat H., Martin-Eauclaire M.F., Van Rietschoten J.,** PO5, a new Leiurotoxin I-like scorpion toxin: synthesis and structure-activity relationships of the  $\alpha$ -amidated analog, a ligand of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels with increased affinity. *Biochemistry* (1993) **32**, 2763-2770.
- Santos A. D., Imperial J. S., Chaudhary T., Beavis R. C., Chait B. T., Hunsperger J. P., Olivera B. M., Adams M. E., Hillyard D. R.,** Heterodimeric structure of the spider toxin  $\omega$ -agatoxin IA revealed by precursor analysis and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* (1992) **267**, 20701-20705.
- Sheumack D. D., Claassens R., Whitely N. M., Howden M. E. H.,** Complete amino acid sequence of a new type of lethal neurotoxin from the venom of the funnel-web spider *Atrax robustus*. *FEBS Lett.* (1985) **181**, 154-156.

- Simard J.M., Watt D.D., Venoms and toxins. In *The biology of scorpions* (Gary A. Polis ed.) Stanford University Press, Stanford, California. (1990).
- Skinner W. S., Adams M. E., Quistad G. B., Kataoka H., Cesarin B. J., Ederlin F. E., Schooley D. A., Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *J. Biol. Chem.* (1989) **264**, 2150-2155.
- Skinner W. S., Dennis P. A., Li J. P., Quistad G. B., Identification of insecticidal peptides from venom of the trap-door spider, *Aptostichus schlingeri* (ctenizidae) *Toxicon* (1992) **30**, 1043-1050.
- Stapleton A., Blankenship D. T., Ackermann D. L., Chen T.-M, Gorder G. W., Manley G. D., Palfreyman M. G., Coutant J. E., Cardin A. D., Curtatoxins: neurotoxic insecticidal polypeptides isolated from the funnel web spider *Hololena curta*. *J. Biol. Chem.* (1990) **265**, 2054-2059.
- Teramoto T., Kuwada M., Niidome T., Sawada K., Nishizawa Y., Katayama K., A novel peptide from funnel web spider venom,  $\omega$ -Aga TK, selectively blocks P-type calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1993) **196**, 134-140.
- Turner T. J., Adams M.E., Dunlap K., calcium channels coupled to glutamate release identified by  $\omega$ -Aga-IVA. *Science* (1992) **258**, 310-313.
- Yu H., Rosen M. K., Saccomano N. A., Phillips D., Volkman R. A., Schreiber S. L., Sequential assignment and structure determination of spider toxin  $\omega$ -Aga IVB. *Biochemistry* (1993) **32**, 13123-13129.
- Zerrouk H., Mansuelle P., Benslimane A., Rochat H., Martin-Euclaire M.F., Characterization of new leurotoxin I-like scorpion toxin PO5 from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* *FEBS Lett.* (1993) **320**, 189-1992.

-Zlotkin E., Eitan M., Bindokas V.P., Adams M.E., Moyer M., Burkhart W., Fowler E., Functional duality and structural uniqueness of depressant insect-selective neurotoxins. *Biochemistry* (1991) **30**, 4814-4821.

-Zlotkin E., Kadouri D., Gordon D., Pelhate M., Martin M.F., Rochat H., An excitatory and depressant insect toxin from scorpion venom both affect sodium conductance and possess a common binding site. *Arch. Biochem. Biophys.* (1985) **240**, 877-887.

**III-LA FONCTION THIOL ET LE  
REPLIEMENT OXYDATIF DES  
POLYPEPTIDES**

# REACTIVITE ET PROTECTION DE LA FONCTION THIOL

## I- INTRODUCTION

Les protéines sont organisées par formation de structures secondaires, les plus fréquentes étant les hélices, coudes et les feuillets plissés, qui sont stabilisées essentiellement par des liaisons non covalentes. Ces structures vont ensuite s'associer entre elles pour conduire à une structuration tertiaire, par interactions de type Van der Waals, par interactions ioniques ou par liaisons hydrogène pour lesquelles les énergies mises en jeu sont faibles, mais cumulatives. Dans le cas des peptides et des protéines de petite taille, le cumul de ces interactions peut ne pas être suffisant et la structure spatiale devra sa stabilité à l'existence de liaisons covalentes entre les chaînes latérales de certains acides aminés, généralement sous forme de pont disulfure entre deux cystéines. C'est notamment le cas des toxines animales qui font l'objet de ce travail ; elles possèdent plusieurs cystéines dont le rôle sera très important pour la stabilité de leur structure tridimensionnelle et, d'une manière plus générale, dans leur stabilité biologique. En synthèse peptidique, les cystéines sont généralement introduites sous forme protégées, et c'est sur le peptide terminé, et déprotégé, qu'il faudra ensuite effectuer des réactions d'oxydations de façon à reformer les ponts disulfures. L'introduction directe d'une cystéine en utilisant le pont disulfure comme protection n'est utilisée que de manière exceptionnelle. Il a été récemment montré au laboratoire (Parmentier et al., 1994), que la présence de disulfures au cours des étapes de synthèse du peptide conduit à la formation, en quantité non négligeable, de trisulfures et de polysulfures.

Cette réaction secondaire est à prendre en compte lors des stratégies passant par la déprotection sélective de cystéines et la formation de disulfures sur la résine, au cours de la synthèse.

Si la réoxydation est relativement facile lorsque le peptide ne comporte que deux résidus cystéine, un seul pont disulfure étant alors possible, la complexité du problème croît de manière exponentielle avec le nombre de cystéines. Il est donc important de pouvoir mettre au point des méthodes de formation régiosélective

des ponts disulfure, non seulement pour déterminer la séquence exacte d'un peptide naturel en réalisant une synthèse spécifique et en comparant les activités biologiques, mais aussi pour synthétiser des isomères afin de moduler les propriétés.

Dans les cas où l'arrangement des ponts disulfure n'est pas connu, une autre stratégie consiste à effectuer l'oxydation dans des conditions d'équilibre permettant des échanges de ponts disulfure, ce qui permet à la réaction d'évoluer vers la structure thermodynamiquement la plus stable. Néanmoins cela ne permet pas toujours d'obtenir le produit biologiquement actif. C'est ainsi que lors de la synthèse des conotoxines on se trouve confronté à des problèmes d'isomérisation des ponts disulfure (Kubo et al., 1993). Un autre exemple bien connu est celui de l'assemblage des deux chaînes de l'insuline qui ne se fait avec le bon appariement que lorsque les deux fragments sont réunis par le peptide C.

## **II -PROTECTION DE LA FONCTION THIOL DE LA CYSTEINE EN SYNTHÈSE PEPTIDIQUE.**

L'incorporation des cystéines en synthèse peptidique présente deux grands problèmes. La fonction thiol de leur chaîne latérale est à la fois une fonction facilement oxydable et une fonction très réactive en tant que nucléophile. La faible basicité des doublets non liants de l'atome de soufre lui permet de rester réactive même dans des conditions très acides. Elle devra être protégée en conséquence afin de ne pas interagir en tant que nucléophile, d'une part avec les carbocations formés lors des étapes de déprotection et, d'autre part, avec les réactifs d'acylation lors des étapes de couplage .

Les protections utilisées en synthèse peptidique sont nombreuses (Hiskey et al., 1981). Elles seront fonction de la stratégie de synthèse, deux grandes voies étant actuellement utilisées. Une étude critique de leur utilisation a été présentée par Cavelier (Cavelier et al., 1989).

La stratégie Boc/Benzyle utilise des protections permanentes de type Benzyle, stables en milieu acide, qui nécessiteront une déprotection par des acides très forts tels que l'acide fluorhydrique anhydre. La protection temporaire des fonctions



amines  $\alpha$  étant effectuée par le groupement *t*-butyloxycarbonyle ou Boc déprotégé par de l'acide trifluoroacétique, étape au cours de laquelle seront libérés des carbocations tertibutyliques susceptibles de réagir avec les nucléophiles.

La stratégie Fmoc/*t*-Butyle utilise des protections permanentes de type *t*-Butyle qui seront déprotégées en fin de synthèse par de l'acide trifluoroacétique. Les fonctions amines  $\alpha$  sont alors protégées par des groupements fluorénylméthyloxycarbonyles et libérées en milieu basique, généralement par des amines secondaires telles que la pipéridine.

En synthèse peptidique, il existe une grande variété de groupes protecteurs de la fonction thiol des cystéines (Hiskey et al., 1981), qui seront adaptés à l'une ou l'autre de ces deux stratégies (Cavelier et al., 1989).

Les groupes protecteurs de la fonction thiol doivent être :

- faciles à introduire, avec de bons rendements.
- stables dans les conditions de la synthèse
- clivables facilement et sélectivement.

## **A- Les groupes protecteurs de type alkylthio et alcythio**

Ce sont des protections dans lesquelles l'atome de soufre de la cystéine sera lié à un atome de carbone pouvant appartenir à différents groupements de types alkyles, aryles, acyles ou carbonyles

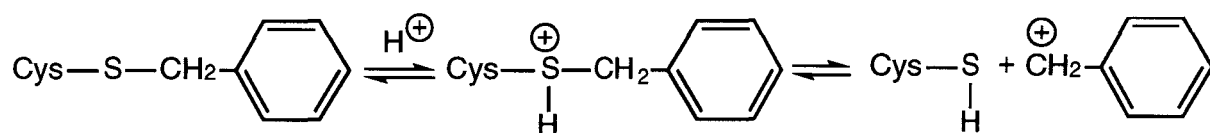
### ***1-Les groupes protecteurs de type sulfure (thioether)***

Selon la nature du substituant, on pourra moduler la sensibilité aux réactifs acides ou basiques. À la différence des éthers et des esters benzyliques, la benzyl cystéine est stable vis à vis de l'hydrogénation catalytique. Cependant l'introduction de substituants tels que le groupe nitro permet de retrouver cette possibilité de clivage (Nishimura et al., 1978).

### a ) Labiles en milieu acide

Leur déprotection se fera généralement par protonation au niveau de l'hétéroatome, suivi par un clivage libérant un carbocation. La facilité de déprotection sera fonction de la stabilité du carbocation généré.

Le groupement de référence, le groupe benzyle lui même (Frankel et al., 1960 et Yajima et al., 1983), a rapidement été abandonné du fait de la trop grande stabilité des sulfures de benzyle, qui ne sont pas clivés quantitativement, y compris dans l'acide fluorhydrique anhydre. Cela est dû notamment à la faible basicité de l'atome de soufre qui, faiblement protoné n'aura qu'une faible propension à la formation du carbocation benzylique.



Afin d'augmenter la stabilité du carbocation ainsi que, dans une moindre mesure, la basicité de la fonction sulfure, on peut substituer le noyau benzénique par des groupements donneurs d'électrons qui peuvent intervenir par effet inducteur ou par effet mésomère.

#### *Labilité due à un effet inducteur.*

L'introduction d'un groupement méthyle en para donne le groupement p-méthyl benzyle (Erickson et al., 1973, Fuji et al., 1980) ou pMeBzl. Son clivage, bien que plus facile que le groupement benzyle, nécessite encore des conditions drastiques, HF anhydre en présence de 5% d'anisole (Heath, 1986), de p-crésol ou du mélange 5% p-crésol / 5% p-thiocrésol. Il est relativement stable dans les conditions de réaction  $\text{S}_\text{N}2$  (Low HF), en présence du mélange HF 30%, sulfure de méthyle 70%. De nombreuses réactions secondaires ont été signalées (Tam et al., 1987).

Au groupement t-butyle correspond la formation de carbocations théoriquement moins stables que le carbocation benzylique, mais la possibilité de réaction d'élimination avec formation d'isobutène augmente fortement la labilité de ce groupement. Cependant lorsqu'il est lié à un atome de soufre, le groupement t-butyle se montre stable aux différents agents de déprotection et il fut longtemps considéré comme non utilisable en synthèse peptidique (Photaki et al., 1970, Nishimura et al., 1978 et Fujii et al., 1986). Il pourra être clivé, par l'acide fluorhydrique, en opérant avec un large excès d'anisole, de thiol ou de thioéther (Sakakibara et al., 1980). On pourra également libérer la fonction thiol par action de sels mercuriques sous forme des mélanges  $\text{Hg}(\text{OAc})_2/\text{TFA}/\text{anisole}$  ou  $\text{Hg}(\text{OCOCF}_3)_2$  dans l'acide acétique aqueux puis traitement par  $\text{H}_2\text{S}$ .

*Labilité due à des effets mésomères.*

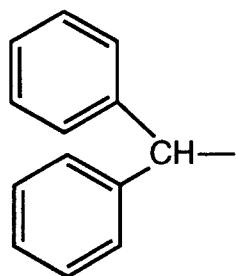
L'introduction de groupements méthoxy, classique en stratégie de groupements protecteurs, conduit à un dérivé qui sera totalement clivé par l'acide fluorhydrique mais qui ne sera plus suffisamment stable vis à vis du TFA lors de la synthèse de longs peptides.

On a donc recours à des effets mésomères dus à des substituants aromatiques.

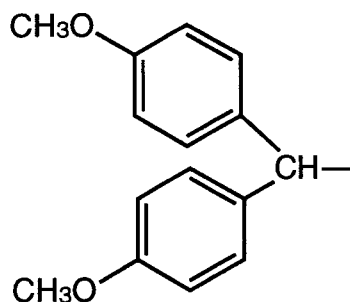
- L'introduction d'un second noyau aromatique fournit le groupement diphenylméthyle (Dpm) ou benzhydryle (Zervas, et al. 1962).

Ce groupe protecteur est clivé par du TFA, ou par réduction par le sodium dans l'ammoniac liquide. Par contre 10 équivalents d'acide bromhydrique ne libèrent que 9% de cystéine.

Comme dans le cas du benzyle, la substitution des noyaux par des groupements méthoxy n'est guère favorable : le di-(4-méthoxyphényl)méthyle est clivé partiellement (Hanson et al., 1965) (60%) par  $\text{HBr}/\text{AcOH}$  à une température de  $60^\circ\text{C}$ . Ces conditions très énergétiques sont susceptibles de dégrader le peptide préparé. Ces deux groupements ne sont pas clivés (Hiskey et al., 1966) par les ions métalliques tels que  $\text{Hg}^{2+}$  et  $\text{Ag}^+$ .



benzhydryle



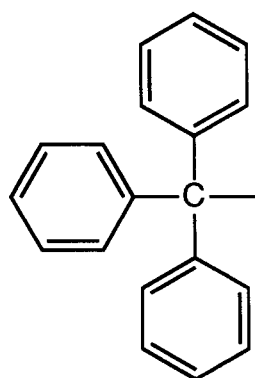
di-(4-méthoxy-phényl)méthyle

-L'introduction d'un troisième cycle benzénique donne le groupe triphénylméthyle ou trityle. Cette protection est susceptible de générer un carbocation fortement stabilisé qui ne nécessite plus des conditions aussi acides. De ce fait, le groupe trityle (Trt), clivé par le TFA (Zervas et al., 1962), n'est pas compatible avec les groupes protecteurs usuels tels que le Boc, labiles en milieu acides, et il sera utilisé en stratégie Fmoc.

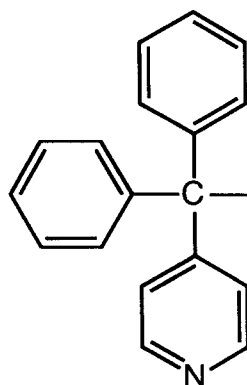
D'autre part, ce groupe trityle s'avère très hydrophobe ce qui a tendance à former des agrégats. L'accumulation de tels groupes apolaires conduit à des interactions nuisibles au bon déroulement de la synthèse notamment lorsque le peptide est ancré sur des supports polaires comme les polyacrylamides (Atherton et al., 1980, 1985).

- Le groupe [diphényl-4-(pyridyl)]-méthyle (Dppm) a été proposé par Coyle et al. (1981). Ce groupe protecteur est clivé à 90% en milieu acide fort (HBr 45% dans AcOH pendant 48h à 25°C) alors que dans ce même milieu, la cinétique de clivage du Trt est plus lente et il n'est clivé qu'à 50%.

Alors que le groupe trityle est clivé par les ions métalliques tels que  $\text{Hg}^{2+}$  et  $\text{Ag}^+$  (Hiskey et al., 1966), le Dppm reste stable dans ces conditions.



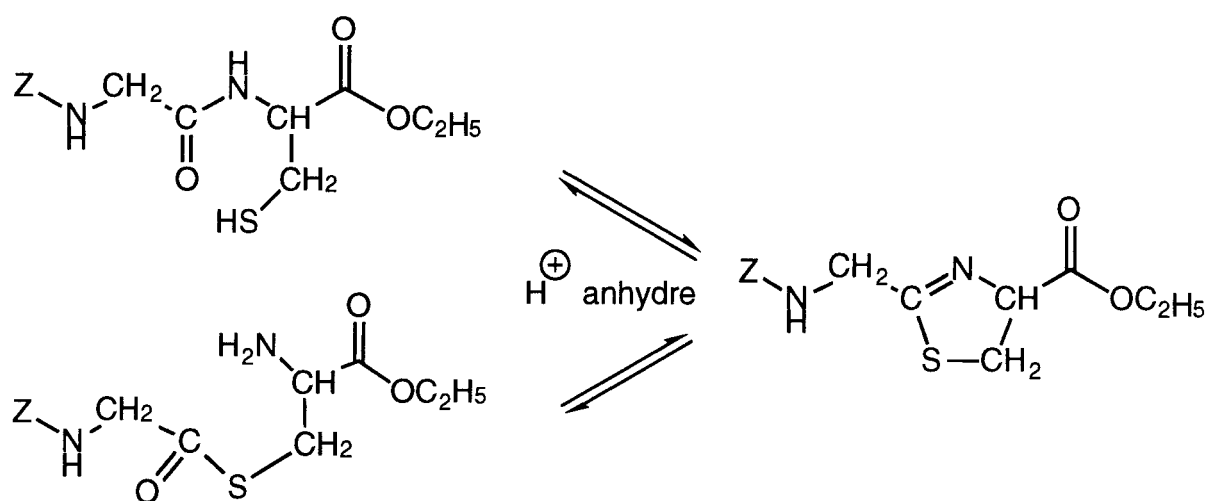
trityle



diphényl-4-(pyridyl)]-méthyle

Il est toujours possible de faciliter la déprotection en milieu acide en incorporant un nucléophile qui agira en tant qu'accepteur de carbocations. C'est ainsi que la liaison S-Trt, est clivée plus facilement en présence de 2 éthyl-phénol (Zahn et al., 1969) ou d'un thiol (Koenig et al., 1979).

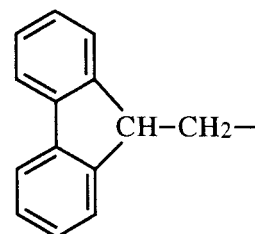
L'acidolyse présente un inconvénient supplémentaire puisqu'en milieu fortement acide anhydre, des peptides contenant un résidu cystéine peuvent être facilement transformés en thiazolines (Photaki et al., 1970) dont la réouverture correspond au clivage de la liaison amide et à la formation d'un thioester (glissement N→S). Cette réaction secondaire a été notamment décrite en milieu HCl/CHCl<sub>3</sub> (Hirotzu et al., 1967) ou HCl/CH<sub>3</sub>OH (Stoffel et al., 1961).



glissement N→S par l'intermédiaire d'une thiazoline

### b) Groupes labiles en milieu basique.

L'introduction d'un groupement fluorénylméthyle (Fm) (Bodansky et al., 1982, Ruiz-Gayo et al., 1986) conduit à une structure ne pouvant plus générer de carbocation stabilisé. Cette protection s'avère stable en milieu acide, même très fort. Par contre, l'action des bases peut générer des carbanions stabilisés par mésomérie, faisant apparaître un caractère aromatique dans le cycle central du fluorène. Sa déprotection est généralement effectuée par des amines secondaires, selon des mécanismes de β-élimination.



Cette protection est intéressante à double titre : elle permet d'obtenir directement un disulfure dans des conditions douces, partiellement (85%) par la benzylamine (Bodansky et al., 1982) et quantitativement par la pipéridine (Ruiz-Gayo et al., 1986). La déprotection en présence de mercaptoéthanol comme donneur de proton régénère les fonctions thiol, mais dans ce cas, le groupe Fm est inutilisable en présence de Nps et vice versa (Ruiz-Gayo et al., 1988). Ces conditions sont aussi totalement incompatibles avec la stratégie de type Fmoc en synthèse peptidique.

## **2-Les thioesters**

De par le caractère d'excellent nucléofuge des ions sulfures, les esters de thiol sont en fait des "esters activés", très sensibles à l'action des nucléophiles, mais aussi à celle des bases susceptibles de donner lieu à des réactions de  $\beta$ -élimination (Photaki, 1966 et Hiskey et al., 1988). Ces dérivés de la cystéine sont peu utilisés en synthèse peptidique, car ils sont très fragiles. Ils sont classés en deux catégories : les dérivés acylés et les dérivés carbamoylés.

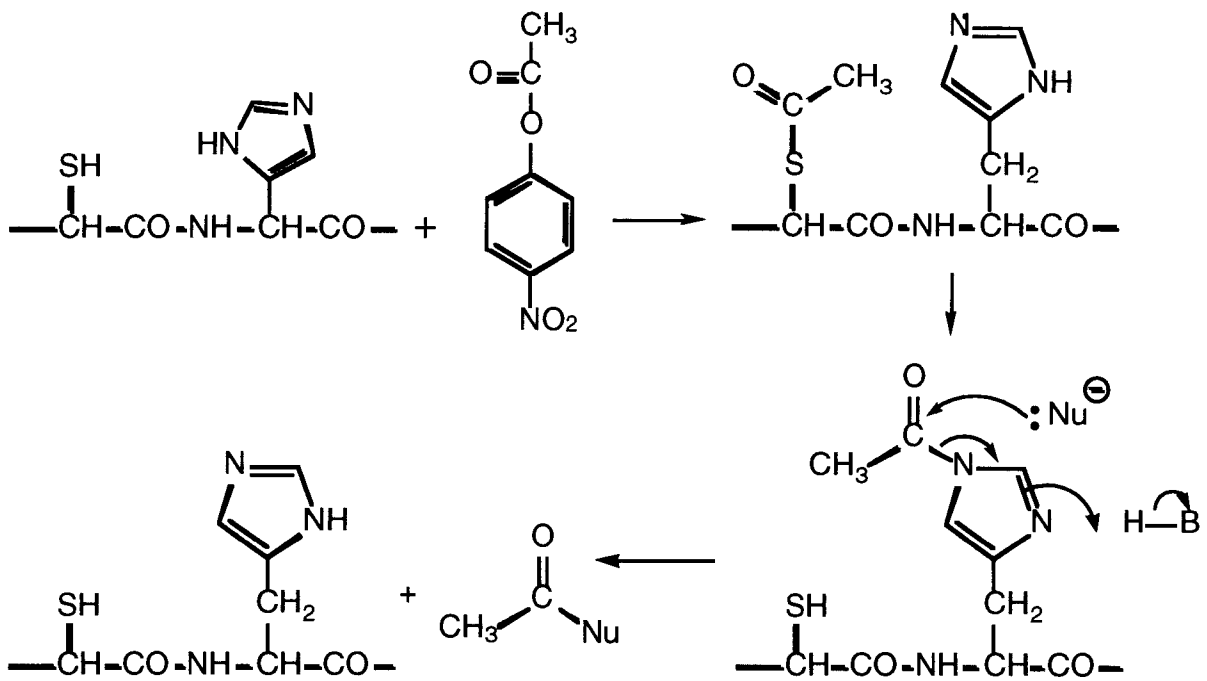
### **a ) Les dérivés S-acétylés et S-benzoylés**

Les acyl- et benzoyl- thioesters sont stables en milieu aqueux et dans le TFA et peuvent donc être utilisés simultanément avec des groupes protecteurs temporaires acido-labiles des amines terminales (Zervas et al., 1965) (Trt, Nps, Boc...).

Mais ces thioesters sont très sensibles aux bases, même diluées, qui peuvent provoquer une  $\beta$ -élimination. Dans le cas de peptides de masse moléculaire faible, cette réaction secondaire paraît liée à la polarité du solvant (Photaki et al., 1966). Par contre, dans le cas de longs peptides uniquement solubles dans des solvants très polaires, même la méthanolyse provoque la réaction partielle de  $\beta$ -élimination (Hiskey et al., 1970).

L'attaque, facile, par les nucléophiles, qui conduit généralement à une migration S $\rightarrow$ N de l'acétyle, en réduit l'utilisation. Cette réaction explique l'obtention délicate de ces dérivés car la réaction de protection de la fonction amine d'une cystéine qui a préalablement été protégée sous forme S-acétyle ou S-benzoylé a

lieu généralement en présence de soude, ce qui favorise la migration du groupe protecteur du soufre vers l'atome d'azote. Pour éviter cela, Stelakatos et al. (Stelakatos et al., 1980) ont proposé de remplacer la soude par une amine tertiaire, mais la migration peut alors mettre en jeu l'atome d'azote d'un autre aminoacide de la chaîne peptidique. La même réactivité se manifeste lors de l'action de l'acétate de p-nitrophényle sur un résidu cystéine inclus dans une chaîne peptidique, contenant un résidu histidine, qui conduit au transfert rapide du groupe protecteur du soufre vers un atome d'azote du cycle imidazole (Heller et al., 1977). On forme alors un acylimidazole, qui est lui-même un agent d'acylation très actif, ce qui peut conduire à des acylations aléatoires lors des étapes suivantes. La migration du groupement acétyle est aisément mise en évidence par le réactif d'Ellman, spécifique des fonctions thiols libres.

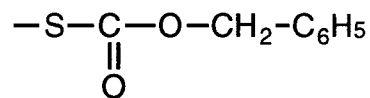


Ces esters peuvent également être clivés par les sels mercuriques (Fujino et al., 1976).

### b ) Les dérivés alkyloxycarbonylés ou carbamoylés

Ils ont l'avantage de ne pas subir cette réaction secondaire, grâce à la mésomérie du doublet de l'atome d'oxygène supplémentaire, qui diminue la réactivité du carbonyle, vis à vis des nucléophiles. C'est ainsi que le groupement S-benzyloxycarbonyl,

contrairement aux dérivés N- benzyloxycarbonylés, est stable dans des solutions de HCl ou HBr dans l'acide acétique (Muraki et al., 1971) , mais il ne résiste pas au TFA à la température d'ébullition



(Zervas et al., 1965). Ils sont déprotégés par ammonolyse (Zervas et al., 1965)) ou par méthanolyse (Photaki I., 1970).

### ***3-Les thioacetals et fonctions dérivées***

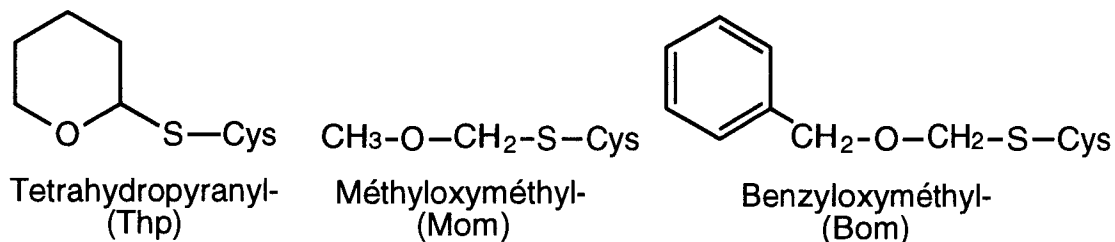
Ils sont relativement peu utilisés. Comme les acétals ils pourront être clivés en milieu acide. Cependant à la différence des acétals, stables en milieu basique ou neutre, certains d'entre eux seront peu stables et pourront être clivés en milieu basique, en présence de métaux accepteurs de doublets.

#### **a ) Les monothioacétals**

Le dérivé tétrahydropyranyle (Thp), est plus courant; il est clivé par les acides dilués ou par le nitrate d'argent en solution aqueuse (Holland, 1958), la cystéine étant alors récupérée sous forme de son sulfure d'argent. Ce composé possède cependant le désavantage de posséder un centre de chiralité et se présente sous forme racémique. Il va donc induire la formation de diastéréoisomères, phénomène qui pourra compliquer les étapes de purification, notamment lors de synthèses en phase homogène.

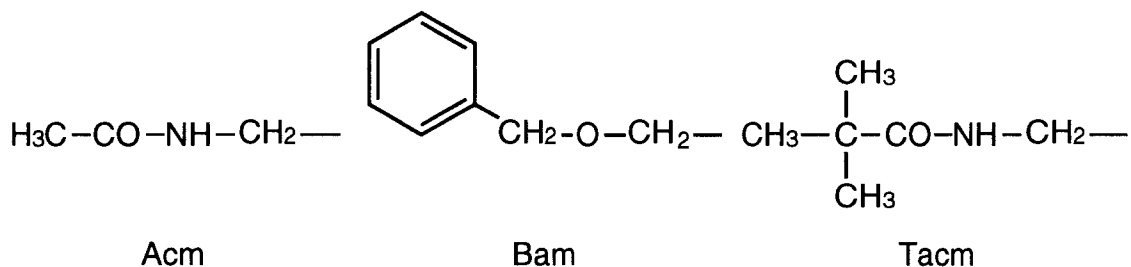
Plusieurs dérivés du formaldéhyde sont également utilisés, tels que le groupement méthyloxyméthyle (Mom) et le Benzyloxyméthyle (Bom). Le Bom est stable dans le TFA mais il est facilement clivé par le trifluorométhanesulfonate d'argent dans le TFA ou par le mélange trifluorométhanesulfonate de trifluorométhylsilyle/thioanisole/TFA. Le traitement de Cys(Bom) par le trifluoroacétate de Thallium (III) fournit directement la cystine. (Otaka et al., 1989). Cependant la libération de formaldéhyde lors de la déprotection des groupes Mom et Bom sera susceptible d'induire des réactions secondaires (Gesquière et al., 1990, Kumagaye et al., 1991)



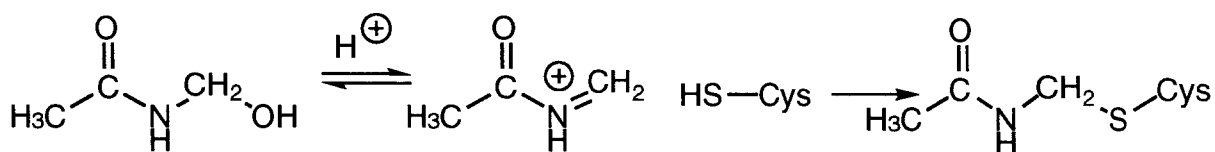


### b ) Les aminothioacétals (thioaminals)

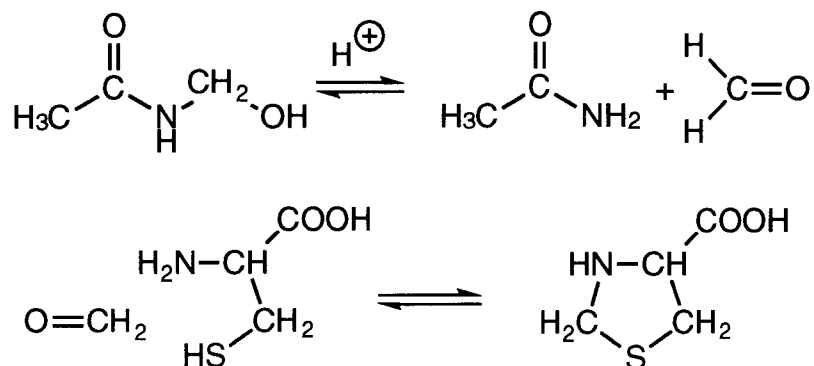
Le plus utilisé est le groupement acétamidométhyle (Acm) ( Veber, 1968 et 1972), qui est préparé à partir de l'hydroxyméthylacétamide en présence d'acide chlorhydrique concentré ou de TFA. Deux analogues sont également utilisés en synthèse peptidique, les groupements Benzamidométhyle (Bam) (Chakravarty et al., 1978) et triméthylacétamidométhyle (Tacm) (Kiso et al., 1989).



Ces analogues ont été proposés car leur synthèse, qui se fait par une réaction de type Mannich, entre le thiol et l'imonium formé en milieu acide, ne donne pas lieu à la formation d'une quantité importante d'acide thiazoline carboxylique par réaction de la cystéine avec le formaldéhyde libéré dans le milieu réactionnel au cours de la réaction.



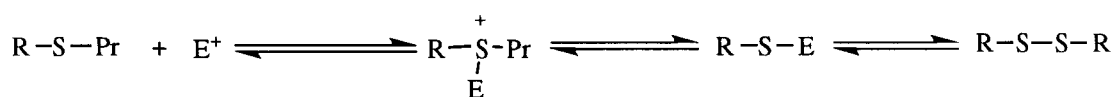
En milieu acide, l'hydroxyméthylacétamide, qui est un héli-aminal, est également en équilibre avec la forme carbonylée libre ; on a alors la réaction :



Ces groupements peuvent être clivés par des ions métalliques,  $\text{Ag}^+$  (Fontana, 1966 et 1975, Scoffone et al., 1968) ou  $\text{Hg}^{2+}$  (Kamber, 1980, Coyle, 1981 et Hiskey, 1966), les ions métalliques étant ensuite éliminés par précipitation sous forme de sulfures par le thioacétamide,  $\text{H}_2\text{S}$  ou le  $\beta$ -mercaptoethanol.

Mais ce procédé n'est pas général et ne pourra pas être utilisé si un résidu tryptophane est présent dans la chaîne peptidique en raison d'une réaction préférentielle avec la position 2 d'un noyau indolique, qui conduit à un dérivé thioéther de manière irréversible (Nishio et al., 1994). Dans le cas de la déprotection par des sels de thallium, on peut observer une réaction secondaire conduisant à la migration du groupe AcM sur la chaîne latérale de la sérine (Lamthanh et al., 1993).

Ces dérivés peuvent également conduire directement à la formation de ponts disulfure entre deux résidus cystéine (Kamber, 1980). Cette approche nécessite l'utilisation d'un groupe protecteur (Pr) donnant un cation très stable lors de l'attaque de l'électrophile ( $\text{E}^+$ ) sur l'atome de soufre. L'intermédiaire sulfényle peut ensuite réagir avec un thiol pour conduire à un disulfure.



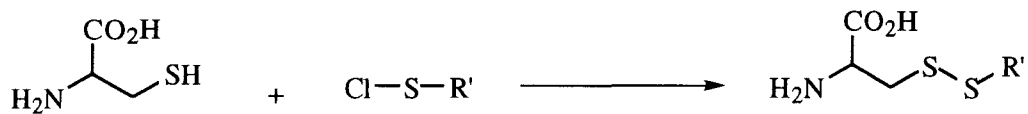
Ceci correspond à la méthode d'oxydation qui est très utilisée et qui consiste à traiter le peptide par l'iode (Papsuevich et al., 1975, Kamber et al., 1980, Kiso et al., 1989).

## B- Les protections sous formes de disulfures

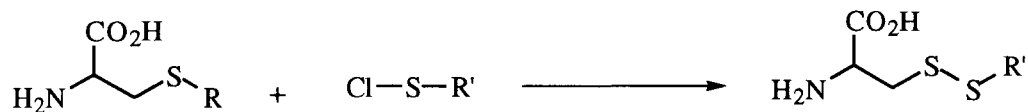
La protection de la fonction thiol de la cystéine sous forme de disulfure dissymétrique est de plus en plus utilisée en synthèse peptidique. Elle offre l'avantage de permettre la régénération quantitative de la fonction thiol initiale de la cystéine dans des conditions douces en fin de synthèse du peptide, ainsi que la possibilité de former *in situ* un pont disulfure. Parmi eux les groupes les plus courants sont les phénylthio substitués et le *tert*-butylthio.

On distingue deux voies de préparation de ces dérivés :

- soit par substitution de la fonction thiol libre de la cystéine avec un chlorure de sulfényle :

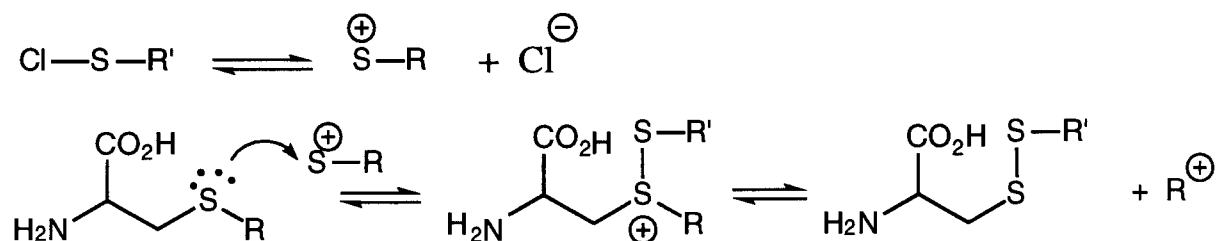


- soit par échange à partir d'une molécule de cystéine préalablement protégée sous forme de thioéther :



Selon les conditions opératoires, le mécanisme peut être radicalaire ou électrophile.

Le mécanisme ionique proposé généralement est le suivant :



Cette deuxième méthode constitue une voie de clivage d'un grand nombre de groupes protecteurs comme les sulfures de Trt, Acn ou *t*-Bu, qui possèdent une partie carbonée au comportement de nucléofuge de par la stabilité du carbocation formé.

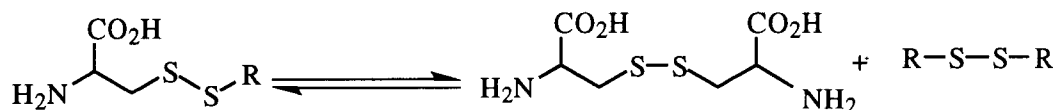
Si les thioéthers peuvent voir l'atome de soufre réagir avec les électrophiles de par la présence de ses deux doublets non liants, l'accès aux orbitales d vacantes va lui permettre de réagir également avec les nucléophiles. C'est ainsi que la S-*t*-butylthio cystéine est obtenue avec de bons rendements par réaction de la cystéine avec le *t*-butylthiol en milieu alcalin (Wuensch et al., 1971), ou par transfert du groupe *t*-butylthio de l'acide 1, 2-di-(*t*-butylthio) hydrazine-1, 2-dicarboxylique sur la fonction thiol de la cystéine (Wuensch et al., 1982).

La réduction du dérivé *t*-butylthio cystéine par un thiol en milieu alcalin, par NaBH<sub>4</sub> ou par des phosphines (Moroder et al., 1980 et 1981, Romani et al., 1987) permet de récupérer quantitativement la cystéine non protégée. La réaction de réduction par les phosphines a été particulièrement étudiée; il est préférable d'utiliser une trialkylphosphine dans le trifluoroéthanol aqueux pour solubiliser les polypeptides protégés (Moroder et al., 1980 et 1981).

La grande stabilité du groupe *t*-butylthio dans les conditions de la synthèse peptidique a été confirmée par la synthèse de la somatostatine-14 utilisant le 2-nitro benzènesulfényle comme protection temporaire des fonctions amine- $\alpha$ , en combinaison avec des protections acido-labiles sur les autres chaînes latérales (Moroder et al., 1980 et 1981). Lors de la déprotection des fonctions amine, pour éviter une réaction de l'halogénure de sulfényle libéré avec le disulfure S-*t*-butylthio cystéine, on utilise le 2-méthyl indole pour capturer ces intermédiaires très réactifs (Moroder L., et al., 1980 et 1981). Le groupe S-*t*-butyle a également été

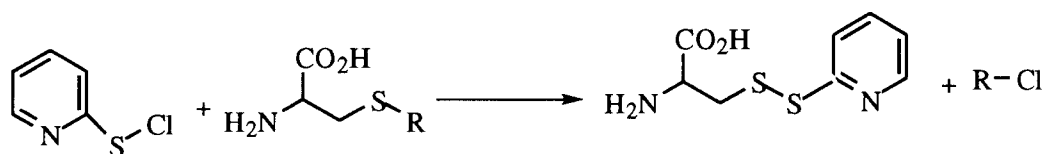
utilisé dans la synthèse de l'insuline (Gielen et al., 1979) et d'un fragment de trypsine (Romani et al., 1987).

Weber et Harter (Weber et al., 1970) ont étudié une série d'alkylthio cystéines et observé que les effets inductifs attracteurs du groupe R favorisent l'échange des disulfures, alors que les effets inductifs donneurs le minimisent :

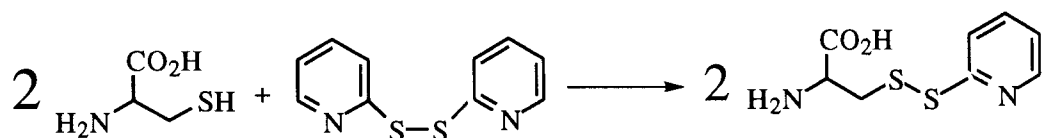


- Les dérivés *o*-nitrobenzènesulfényle (Nps) ou *m*-nitropyridinesulfényle (Npys) sont les disulfures activés les plus utilisés.

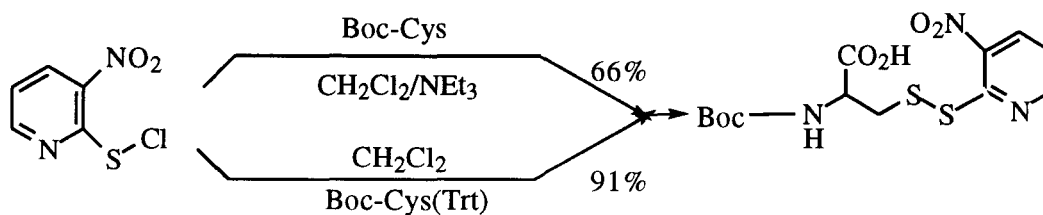
Le groupe pyridinyl-2-sulfényle peut être introduit sur la cystéine par déplacement d'un groupe protecteur de type thioéther avec le chlorure correspondant (Castell et al., 1979) :



Il est préférable d'utiliser directement la dithiodipyridine comme réactif (Chong et al., 1981).



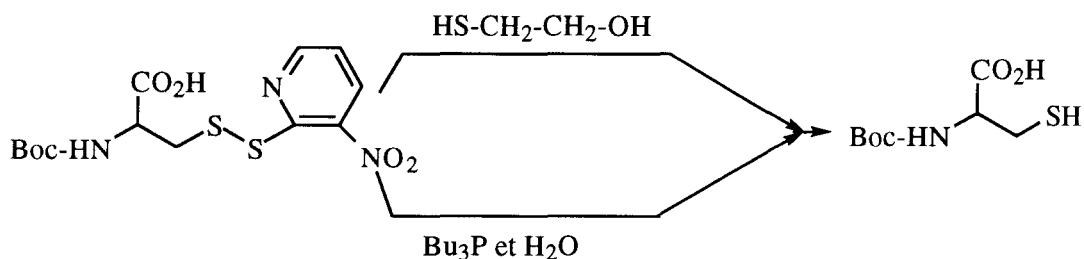
- En substituant le noyau aromatique par traitement par un groupe nitro, on obtient un disulfure dissymétrique plus activé avec de meilleurs rendements d'introduction. Matsueda R. et al., (1982) ont utilisé le chlorure de 3-nitropyridinyl-2-sulfényle selon deux méthodes :



Dans le dichlorométhane, les rendements sont meilleurs par substitution d'un thioéther plutôt que du thiol libre.

Ces composés peuvent être déprotégés suivant deux méthodes :

- soit par un thiol en excès (Chong et al., 1981), généralement le mercaptoéthanol.
- soit par action d'une phosphine (Matsueda R. et al., 1982) en présence d'un donneur de protons :



## Références

- Atherton E., Pinori M., Sheppard R. C., Peptide synthesis. Part.6. Protection of the sulfhydryl group of cysteine in solid-phase synthesis using Na-fluorenylmethoxycarbonyl aminoacids. Linear oxytocin derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* (1985) 2057-2064.
- Atherton E., Wooley V., Sheppard R. C., Sheppard R. C., internal association in solid phase peptide synthesis. Synthesis of cytochrome C residues 66-104 on polyamide supports. *J. Chem. Soc. Chem. Commun* (1980) 970-975.
- Bodansky M., Bednarek M. A., Experiments on the protection of the thioether in methionine. *Int. J. Peptide Protein Res.* (1982) **20**, 434-437.
- Castell J. V., Tun-Kyi A. The removal of S-cysteine protection by means of 2-pyridine sulfenyl chloride and the subsequent formation of disulfide bonds. *Helv. Chim. Acta* (1979) **62**, 2507-2510.
- Cavelier F., Daunis J., Jacquier R., Les réactions régiosélectives de formation de ponts disulfures en synthèse de peptides contenant des cystéines. *Bull.Soc. Chim.Fr* (1989) 788-798.
- Chakravarty P. K et Olsen R. K. Benzamidomethyl group as a thiol protecting group for cystein, N-methylcystein and corresponding N-tert-butyloxycarbonyl derivatives. *J. Org. Chem.* (1978) **43**, 1270-1271.
- Chong P. CS., Hodges R. S. A new heterobifunctional Cross-linking reagent for the study of biological interactions between proteins. *J. Biol. Chem.* (1981) **256**, 5064-5070.
- Coyle S. , Hallet A., Munns M. S., Young G. T. Amino acids and peptides. Part 45. The protection of the thiol function of cysteine and the imidazole-N of histidine by the diphenyl-4-pyridylmethyl group. *J. Chem. Soc. Perkin I* (1981) 522-528.

**-Erickson B. W., Merrifield R. B.** Acid stability of several benzylic protecting groups used in solid phase peptide synthesis. Rearrangement of O-benzyltyrosine to 3-benzyltyrosine. *J. Am. Chem. Soc.* (1973) **95**, 11, 3750-3756.

**-Fujii N., Otaka A., Funakoshi S., Yajima H., Nishimura O., Fujino M.**, Studies on peptides. CXXXIV. Evaluation of S-1-adamantylcysteine for peptide synthesis. *Chem. Pharm. Bull.* (1986) **34**, 869-872.

**-Fuji N., Watanabe T., Otake T., Otaka A., Yamamoto I., Konoshi J., Yajima H.**, Studies on peptides . CLXII. Synthesis of chicken calcitonin-gene-related peptide (cCGRP) by application of sulfoxide directed disulfide-bond-forming reaction. *Chem. Pharm. Bull.* (1988) **36**, 3304-3311..

**-Fontana A.**, Selective removal of sulfur protecting groups of cysteine residues by sulphenyl halides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun* (1975) 976-977.

**-Fontana A., Marchiori F., Moroder L., Scoffone E.**, New removal conditions of sulfenyl groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* (1966) 2985-2987.

**-Frankel M., Gertner D., Jacobson H., Zilkha A.**, Synthesis of poly (S-alkyl-L-cysteines). *J. Chem. Soc.* (1960) 1390-1393.

**-Fujino M., Nishimura O.**, New method for the cleavage of the S-p-methoxybenzyl and S-tert-butyl groups of cysteine residues with mercury (II) trifluoroacetate. *J. Chem. Soc. Chem. Commun* (1976) 998.

**-Gesquiere J.C., Diesis E., Tartar A.**, Conversion of N-terminal cystein to thiazolidine carboxylic acid during hydrogen fluoride deprotection of peptides containing NpBom-protected Histidine. *Journal of Chemical Society Chem. Commun.*, 1402 (1990).



**-Gielen H. G., Wolf G., Berndt H.** Studies on peptides. 115. Synthesis of the fragments A1-8, A9-15 and A16-21 of ovine insulin A chain using the S-tert-butylmercapto residue for thiol protection. *Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem.* (1979) **360**, 1535-1548.

**-Hanson R. W., Law H. D.** Substituted diphenylmethyl protecting groups in peptide synthesis. *J. Chem. Soc.* (1965) 7285-7296.

**-Heath W. F., Tam J. P., Merrifield R. B.,** Improved deprotection of cysteine-containing peptides in HF. *Int J. Peptide Protein Res.* (1986) **28**, 498-507.

**-Heller M. J., Walder J., Klotz I.,** Intramolecular catalysis of acylation and deacylation in peptides containing cysteine and histidine. *J. Am. Chem. Soc.* (1977) **99**, 2780-2785.

**-Hirotsu Y., Shiba T., Kaneko T.,** Synthetic studies of bacitracin. IV. Synthesis of thiazoline peptides by an iminoether coupling method. *Bull. Chem. Soc. Jpn* (1967) **40**, 2945-2949.

**-Hiskey R. G., Mizoguchi T., Igeta H.,** Sulfur-containing polypeptides. (II). Selective removal of S-protective groups from some L-cysteinyl-L-cysteine derivatives. *J. Org. Chem.* (1966) **31**, 1188-1192.

**-Hiskey R. G., Upham R. Beverly G., Jones W.C.,** Sulfur-containing polypeptides X. b-elimination of mercaptides from cysteine peptides. *J. Org. Chem.* (1970) **35**, 513.

**-Hiskey R.G.,** Sulfhydryl group protection in peptide synthesis. *The peptide vol 3, Gross E. et Meinhofer J., Academic Press New York* (1981) p 137-140.

**-Holland G. F., Cohen L. A.,** Studies on the synthesis of insulin peptides. *J. Am. Chem. Soc.* (1958) **80**, 3765-3769.

**-Kamber B., Hatmann A., Eisler K., Riniker B., Rink H., Sieber P., Rittel W.,** The synthesis of Cystine peptides by Iodine Oxydation of S-Trytyl-cysteine and S-Acetamidomethyl-cysteine peptides *Helv. Chim. Acta* (1980) **63**, 899-915.

**-Kiso Y., Yoshida M., Kimura T., Fujiwara Y., Shimokura M.,** A new thiol protecting trimethylacetamidomethyl group. Synthesis of a new porcine brain natriuretic peptide using the S-trimethylacetamidomethyl-cysteine. *Tetrahedron Lett.* (1989) **30**, 1979.

**-Koenig W., Kernebeck K.,** acidic removed of S-trityl groups as demonstrated for synthesis insulin fragments. *Liebigs Ann. Chem.* (1979) 227-247.

**-Kubo, S., Chino N., Watanabe, T.X., Kimura T., Sakakibara S.,** Solution synthesis of m-conotoxin GIIB: optimisation of the oxidative folding reaction. *Peptide Research* (1993) 66-72.

**-Kumagaye K. Y., Inui T., Nakajima K., Kimura T., Sakakibara S.** Suppression of a side reaction associated with N<sup>im</sup>-Benzyloxymethyl group during synthesis of peptides containing cysteinyl residue at the N-terminus. *Peptide Research* (1980), 84-87.

**-Lamthanh H., Roumestand C., Deprun C., Menez A.** Side reaction during the deprotection of (S-acetamidomethyl) cysteine in a peptide with a high serine and threonine content. *Int J. Peptide Protein Res* (1993) **41**, 85-95.

**-Matsueda R., Higashida S., Ridge R. J., Matsueda G. R.** 3-tertio-2-pyridinesulfenyl (Npys) protecting group: protection and activation of the thiol fonction. *Pept. Chem.* (1981) 31-36; Activation of conventional S-protecting groups of cysteine by conversion into the 3-nitro-2-pyridinesulfenyl (Npys) group. *Chem. Lett.* (1982) 921-924.

**-Moroder L., Gemeiner M., Goehring W., Jaeger E., Wuensch E.** The use of S-tert-butylthiocysteine in the total synthesis of somatostatin-28. *Pro. Eur. Pept. Symp. 16th* (1980) p 121-126.

**-Moroder L., Gemeiner M., Goehring W., Jaeger E., Thamm P., Wuensch E.** New synthesis of somatostatin according to the S-tert-butylthiocysteine procedure. *Biopolymers* (1981) **20**, 17-37.

**-Muraki M., Mizoguchi T.** Use of N,S-bis(tert-butoxycarbonyl)-L-cysteine for synthesis of glutathione. *Chem. Pharm. Bull* (1971) **19**, 1708-1713.

**-Nakagawa Y., Nishiuchi Y., Emura J., Sakakibara S.** Formation of S-tert-butylcysteinyl residues during the deprotection of Boc-groups from S-protected cysteinyl peptides. *Peptide chemistry* (1980), 41-46.

**-Nishimura O., Kitada C., Fujino M.** New method for removing the S-p-methoxybenzyl and S-t-butyl groups of cysteine residues with mercuric trifluoroacetate. *Chem. Pharm. Bull.* (1978) **26**, 1576-1585.

**-Nishio H., Kimura T., Sakakibara S.** Side reaction in peptide synthesis: Modification of tryptophane during treatment with mercury(II) acetate/2-mercaptoethanol in aqueous acetic acid. *Tetrahedron Lett.* (1994) 1239-1242.

**-Otaka A., Morimoto H., Fujii N., Funakoshi S., Yajima H.** S-Benzyloxymethylcysteine, its properties and application in the synthesis of porcine brain natriuretic peptide (pBNP). *Chem. Pharm. Bull* (1989) **37** (2) 526-528.

**-Parmentier B., Moutier M., Tartar A., Sergheraert C.** Preparation of trisulfides derivatives of cystine and their formation as by products during peptide synthesis. *Tetraedron Lett.* (1994) **35** (10) 3531-3534

- Papsuevich O. S., Arch G. Sh., Miksta S. Ya.**, S-benzamidomethyl derivatives of L-cysteine and  $\beta$ -mercaptopropionic acid. *J. Gen. Chem. (URSS)* (1975) **45**, 1384-1388.
- Photaki I.**, A new synthesis of oxytocin using S-acyl cysteines as intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* (1966) **88**, 2292-2299.
- Photaki I.**, Cysteine and cystine peptides. VI. S-acylcysteines in peptides synthesis. *J. Chem. Soc. (C)* (1970) p 2687-2689.
- Romani S., Moroder L., Göhring W., Scharf R. Wunsch E., Barde Y. A., Thoenen H.**, Synthesis of the trypsin fragment 10-25/75-88 of mouse nerve growth factor. *Int. J. Peptide Protein Res.* (1987) **29**, 107-117.
- Ruiz-Gayo M., Albericio F., Pedroso E., Giralt E.**, (S)-9-Fluorenylmethyl-L-cysteine, a useful HF-stable derivative for peptide synthesis. *J. Chem. Soc. Chem. Commun* (1986) 1501-1502.
- Ruiz-Gayo M., Albericio F., Pons M., Royo M., Pedroso E., Giralt E.** Uteroglobulin-like peptide cavities. I. Synthesis of antiparallel dimers of bis-cystine peptides. *Tetrahedron Lett.* (1988) **29**, 3845-3848.
- Scoffone E., Fontana A., Rocchi R.**, Sulfenyl halides as modifying reagents for polypeptides and proteins. I. Modification of tryptophan residues. *Biochemistry* (1968) **7**, 971-979.
- Stelakatos G., Solomosaravidis C., Karayannakis P., Kolovos M., Photaki I.**, Contribution to method of protection and deprotection in peptide synthesis. *Pept. Pro. Eur. Pept. Symp. 16th* (1980) 133-138.
- Stoffel W., Graig L.**, Synthesis of structures related to Bacitracin A. *J. Chem. Soc.* (1961) **83**, 145-149.

**-Tam J.P., Merrifield R.B.,** Strong acid deprotection of synthetic peptides : mechanisms and methods. *The peptides* vol. 9, Udenfried S et Meienhofer J. Eds. Academic Press New York (1987) 185-248.

**-Veber D., Milkowski J., Denkewalter R., Hirschmann R.,** The synthesis of peptides in aqueous medium. IV. A novel protecting group for cysteine. *Tetrahedron Lett.* (1968) 3057-3058.

**-Veber D., Milkowski J., Verga S., Denkewalter R., Hirschmann R.,** Acetamidomethyl. A novel thiol protecting group for cysteine. *J. Am. Chem. Soc.* (1972) **94**, 5456-5468.

**-Weber U., Hartter P.,** S-alkylthio groups for the SH-function protection of cysteine. I. Synthesis and stability of some S-(alkylmercapto) cysteines. *Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem.* (1970) **351**, 1384-1389.

**-Weber U., Hartter P., Flohe L.,** S-alkylthio groups for the SH-function protection of cysteine. II. Thiol disulfide exchange reaction of asymmetric cysteine disulfide. *Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem.* (1970) **351**, 1389-1394.

**-Wuensch E., Spangenberg R.,** Deacylation of N-sulfenylpeptides by thiocyanate ions. In E Scoffone (Ed.), *Peptides* 1969 North-Holland Publ Co, Amsterdam (1971) p 30-34.

**-Wuensch E., Moroder L., Romani S.,** 1-(tert-butylthio)-1,2-hydrazinedicarboxylic acid derivatives. New reagents for the introduction of the S-terbutylthio group into cysteine and cysteine derivatives. *Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem.* (1982) **363**, 1461-1464.

**-Yajima H., Jujii N.,** Acidolytic deprotecting procedures in peptide synthesis. *The Peptides* Vol. 5, Gross et Meienhofer J. Eds. Academic Press New York (1983) p 92.

**-Zahn H., Danho W., Klostermeyer H., Gattner H., Repin U.,** Peptides. LXXIII. Synthesis of the A chain of sheep insulin with exclusive use of acid labile protecting group. *Z Naturforsch* (1969) **24b**, 1127-1139.

**-Zervas L., Photaki I.,** Cysteine and cysteine peptides. I. New S-protecting groups for cysteine. *J. Chem. Soc.* (1962) **84**, 3887-3897.

**-Zervas L., Photaki I., Cosmatos A., Borovas D.,** On cysteine and cystine peptides. III. Synthesis of a fragment of insulin containing the intrachain disulfide bridge. *J. Am. Chem. Soc.* (1965) **87**, 4922-4933.

# REPLIEMENT OXYDATIF DES POLYPEPTIDES RICHES EN CYSTÉINES

## I-INTRODUCTION

Une des difficultés majeures de la réorganisation spatiale des protéines contenant des cystéines sera d'éviter la polymérisation due à la formation de ponts disulfures interchaînes. Pour cette raison, les réactions de repliement des peptides sont généralement réalisées à de hautes dilutions ( $\leq 10^{-5}$  M), de façon à défavoriser les réactions intermoléculaires. A cette difficulté s'ajoute le problème lié à la forte tendance des chaînes peptidiques dénaturées à former des agrégats. Durant le processus de repliement des protéines, les chaînes latérales des acides aminés non polaires, faute de pouvoir instaurer des interactions favorables avec le milieu aqueux, se regroupent au coeur des macromolécules ou elles s'associent par différents types de relations que l'on regroupe sous le terme d'interactions hydrophobes (Kauzmann et al., 1959). Le même processus a lieu dans l'auto-assemblage des peptides où les chaînes latérales des acides aminés non polaires s'associent pour constituer des agrégats.

Les interactions moléculaires qui sont responsable de l'agrégation des peptides peuvent être divisées en 2 composantes (Varadarajan et al., 1992, Dill et al., 1990):

- 1) - La composante d'hydratation, ici défavorable, relative aux interactions des groupes non polaires avec le solvant eau.
- 2) - La composante d'assemblage, relative aux interactions entre les groupes non polaires à l'intérieur des agrégats.

Des tétrapeptides modèles ont été utilisés pour comprendre ces phénomènes d'agrégation. Les peptides Tyr-Gly-Phe-Ala-OBz (Mandel et al., 1993) et Val-Leu-Pro-Phe (Jayakumar et al., 1995), choisis pour leurs séquences riches en acides aminés hydrophobes, peuvent effectivement s'auto-assembler en solution en

donnant des agrégats. Le second de ces tétrapeptides a été utilisé très récemment pour une étude détaillée de la formation d'agrégats. Les acides aminés hydrophobes Val, Leu et Phe ont été choisis pour leur probabilité maximale de se trouver dans la région interface des feuillettes  $\beta$  (Chotia et al., 1984), la Proline ayant été introduite pour augmenter la tendance à former un coude. La mise en évidence de la formation d'agrégats a été réalisée par conductimétrie, pH métrie, UV et techniques de fluorescence. Les études de fixation de ce peptide avec l'acide 8-anilino-naphthylsulfonique (ANS) et le pyrène ont démontré que l'intérieur des agrégats est non polaire. La formation des agrégats organisés est favorisée par une augmentation de la température.

Les structures natives, fonctionnelles, des protéines ne se différencient généralement des autres structures possibles que par de faibles différences énergétiques, de l'ordre du KiloJoule par mole. Les interactions mises en jeu étant pour la plupart non covalentes, de légères modifications de la nature du solvant, pH, force ionique ou température par exemple, peuvent conduire à une désorganisation spatiale de la protéine. Les protéines intracellulaires ne sont pas concernées par ce problème, de par la nature très stable du milieu intracellulaire (pH, potentiel redox, force ionique...). Au contraire, les protéines excrétées dans le milieu extracellulaire, comme le plasma ou le suc gastro-intestinal, ou introduites dans l'espace intercellulaire d'autres espèces (les protéines du venin, les protéines salivaires), y seront très sensibles. Pour cette raison, plusieurs protéines sécrétées telles que les hormones, les enzymes, les immunoglobulines, les inhibiteurs enzymatiques et les toxines sont verrouillées par des liaisons covalentes au niveau de ponts disulfure.

L'obtention, par synthèse chimique totale, d'une protéine dans sa conformation spatiale active constitue un challenge très délicat à réaliser. Il faut permettre à la protéine, qui se trouve initialement dans un état désordonné, de se retrouver dans la conformation active, et il faut reformer les ponts disulfures entre les cystéines adéquates. Le nombre de combinaisons possibles de ponts disulfure augmente exponentiellement avec le nombre de résidus cystéines (Anfinsen et al., 1975).



On a, en se limitant uniquement aux réactions intramoléculaires :

nombre de cystéines	nombre de combinaisons	exemples
2	1	oxytocine
4	3	endotheline, apamine
6	15	scyllatoxine, charybdotoxine
8	105	chlorotoxine, $\omega$ -agatoxine IV A
10	945	$\alpha$ -neurotoxines
12	10395	$\omega$ -agatoxines IIIA et IIIB
14	$1.3 \times 10^5$	neurotoxin TX1, phospholipase A2
16	$2 \times 10^6$	
18	$3,5 \times 10^7$	
20	$6.5 \times 10^8$	
22	$1,3 \times 10^{10}$	
24	$3,1 \times 10^{11}$	
26	$7,9 \times 10^{12}$	
28	$2,1 \times 10^{14}$	
30	$6.2 \times 10^{15}$	
34	$6,3 \times 10^{18}$	albumine
46	$2,5 \times 10^{28}$	IgG

Ceci rend très difficile l'organisation en structure native dans des conditions *in vitro*. L'établissement possible de ponts disulfure entre cystéines non correspondantes, alors que la protéine se trouve dans des états de repliement intermédiaires, nécessite l'utilisation d'un système redox (glutathion réduit et glutathion oxydé par exemple) permettant l'échange entre cystéines libres et cystéines oxydées.

Le passage par ces différents états intermédiaires dans lesquels les cystéines ne sont pas correctement appariées est une des raisons du temps important nécessaire à la renaturation des protéines comportant plusieurs ponts disulfure. C'est ainsi que dans le cas de la renaturation de l'hormone  $\beta$ -gonadotropine humaine ( $\beta$ hCG), Huth et col. (Huth et al., 1993) ont montré qu'il y a passage par différents arrangements, suivis d'échanges, avant d'arriver à la structure possédant les 6 ponts disulfures corrects. Le cheminement est identique *in vitro* et *in vivo* mais les vitesses sont cependant différentes, dans le milieu intracellulaires les différents processus étant pris en charge par différents systèmes enzymatiques tels que les chaperonines, cis-trans peptidyl proline isomérases et protéines disulfure isomérases (PDI). C'est ainsi que si  $t_{1/2}$  pour la

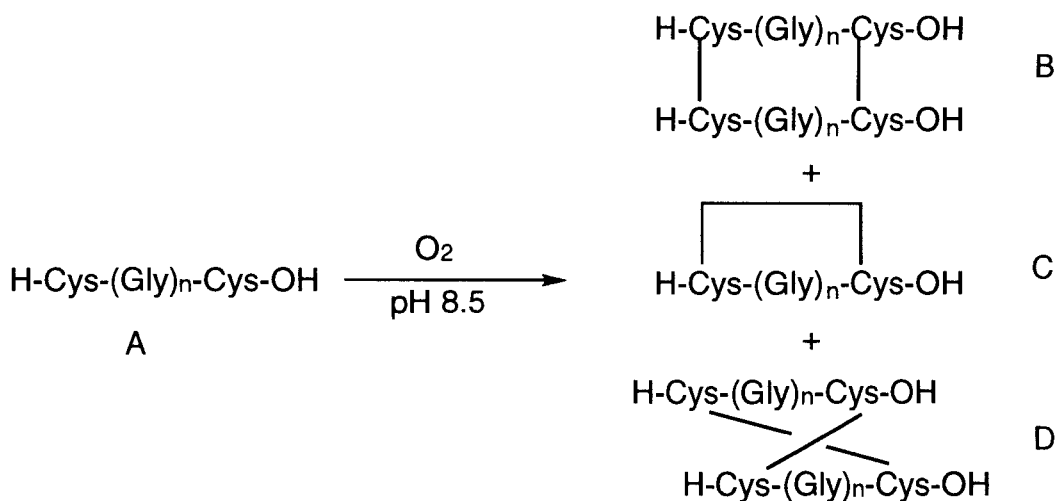
renaturation *in vivo* est de 4 minutes alors qu'elle est de 80 minutes *in vitro*, l'ajout de PDI qui catalyse les échanges de disulfures accélère la renaturation *in vitro*, et ramène  $t_{1/2}$  à 25 min.

Il existe plusieurs possibilités de réactions permettant la formation de ponts disulfure. On pourra utiliser des oxydants plus ou moins forts, certains pouvant également libérer les cystéines de leurs groupes protecteurs. Ces oxydants pourront être l'oxygène de l'air, des sels métalliques, l'iode, des dérivés halogénés des sulfoxydes ou encore des disulfures activés.

## II-OXYDATION PAR L'AIR ET ECHANGE DE DISULFURES MIXTES

L'une des méthodes anciennes et les plus utilisées est l'oxydation par l'air des fonctions thiol non protégées des résidus cystéine de la chaîne peptidique, mais la formation des ponts disulfure n'est pas régiosélective.

Par exemple, l'oxydation par l'air de L-cystéinyl-polyglycyl-L-cystéines (A) conduit à une série de produits (B, C, D) dont les proportions dépendent du nombre de résidus glycine séparant les deux cystéines (Hiskey et al., 1970).



L'isomère antiparallèle D et le monomère cyclique C sont toujours les produits majoritaires; Rydon a montré (Heaton et al., 1956, Jarvis et al., 1961 et Large et al., 1961) que si n est supérieur à 4, le monomère cyclique C est le produit



### III-OXYDATION EN UTILISANT DES SELS METALLIQUES

Des réactions d'oxydation par des complexes métalliques sont parfois utilisées pour créer les ponts disulfure.

- Le chlorure ou l'acétate mercurique, suivi de l'action de H<sub>2</sub>S, sont souvent utilisés pour régénérer le thiol à partir du dérivé Cys(Acm) (Marbach et al., 1974, Nakata et al., 1981 et Veber et al., 1958, 1972) ou Cys(Bam) (Chakravarty et al., 1978); les ponts disulfure sont obtenus en milieu aqueux.



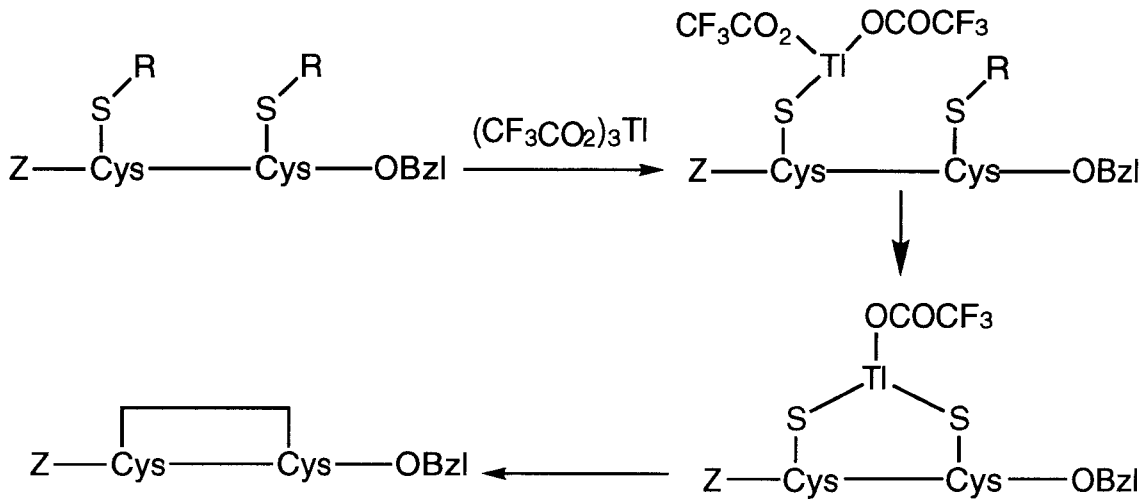
- D'excellents résultats ont aussi été obtenus par utilisation du trifluorométhanesulfonate d'argent (Fujii et al., 1989).

- Le trifluoroacétate de thallium III, connu pour son affinité vis à vis de l'atome de soufre, peut conduire directement à des cystines (Fujii et al., 1987) à partir des cystéines S-protégées.

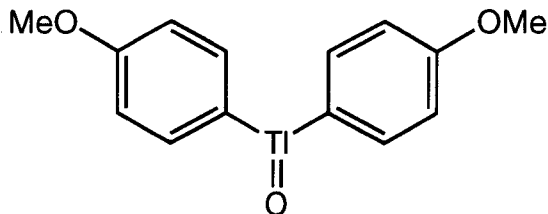
dérivés	cystine
Cys(MBzl)	86.7%
Cys(t-Bu)	80.5%
Cys(Ad)	83.0%
Cys(Acm)	81.0%
Cys(Trt)	80.2%
Cys(4-MeBzl)	74.3%
Cys(Bzl)	0%

Les sels du thallium présentent l'avantage d'être facilement éliminés en fin de réaction car ils sont solubles dans l'éther. Mais cet agent oxydant peut provoquer des réactions avec certains aminoacides : le tryptophane non protégé sur la chaîne latérale se dégrade (60% environ); la méthionine est partiellement oxydée en sulfoxyde (34%). Les ponts déjà créés sont stables en présence de (CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>3</sub> Tl, mais une petite quantité d'acide cystéique est formée quand la cystéine est exposée au (CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>3</sub> Tl en milieu aqueux.

Le trifluoroacétate de thallium III en solution dans le TFA agit comme un acide faible, puis comme un oxydant, selon le mécanisme suivant :



- Le telluroxyde de *p*-méthoxyphényle est également un agent oxydant doux, cependant son utilisation est moins intéressante car il n'est pas réactif de déprotection et le substrat doit être la cystéine elle-même et non pas ses dérivés (Barton et al., 1979).

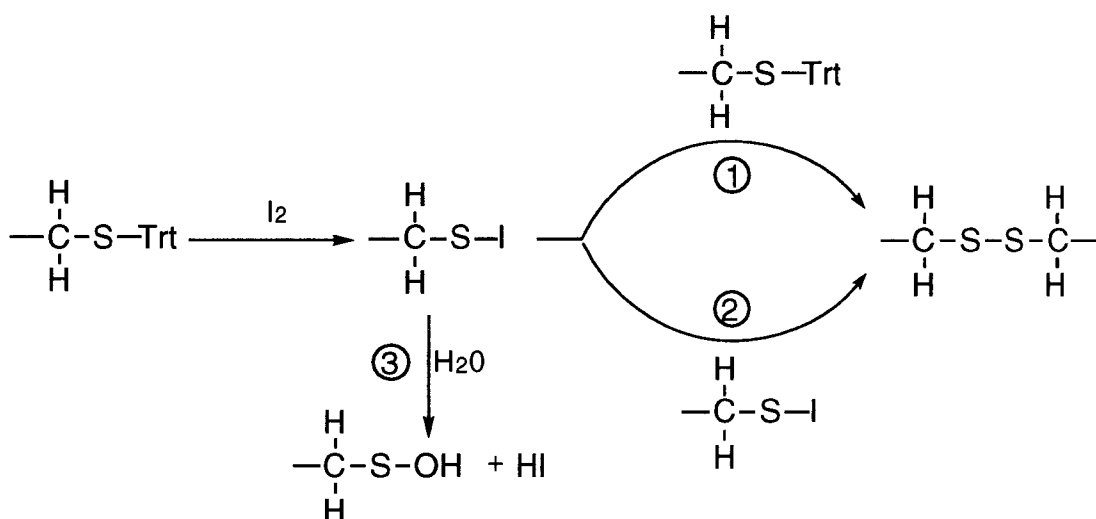


- Le ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  est utilisé depuis longtemps en phase homogène pour oxyder les thiols. Il a été employé (Eritja et al., 1987, Kishore et al., 1987) pour préparer, sur un support solide, avec un bon rendement, un peptide contenant un pont disulfure intramoléculaire. Cependant la formation du pont doit également se faire sur des cystéines libres et nécessite une étape préalable de déprotection.

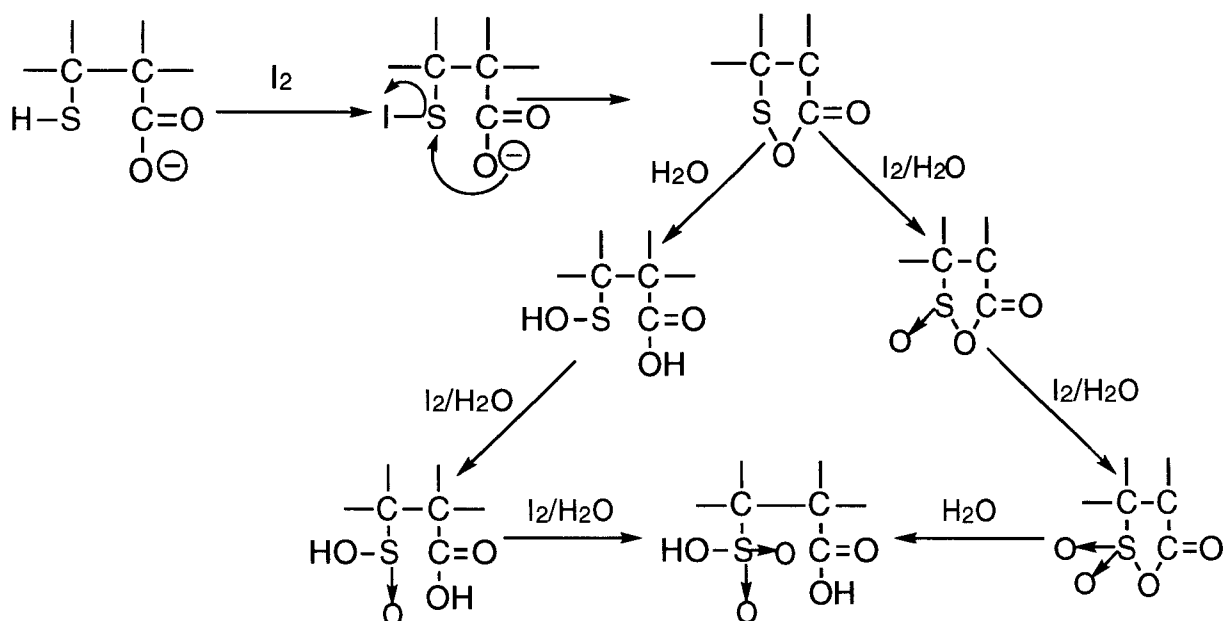
#### IV-OXYDATION PAR L'IODE

Les dérivés thioéthers de la cystéine ont la propriété de réagir avec l'iode pour donner naissance à un pont disulfure. Cette méthode permet une transformation

directe des cystéines S-protégées en cystine; Cys(Trt) et Cys(Acm) sont les plus utilisés. Le mécanisme proposé par Kamber (Kamber et al., 1980) suggère la formation intermédiaire d'un dérivé S-iodo-cystéine qui peut réagir soit avec le thioéther initial, soit avec un autre dérivé intermédiaire iodé.

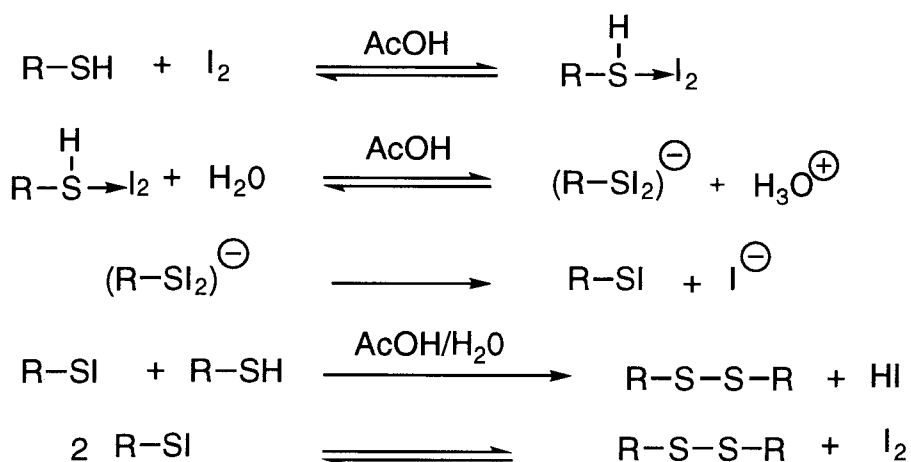


La présence d'eau (voie 3) peut conduire à la formation compétitive d'acide sulfénique qui peut à son tour être oxydé en acide sulfonique grâce à l'assistance de la fonction acide carboxylique situé en position  $\beta$ , selon deux voies (Danehy et al., 1971).

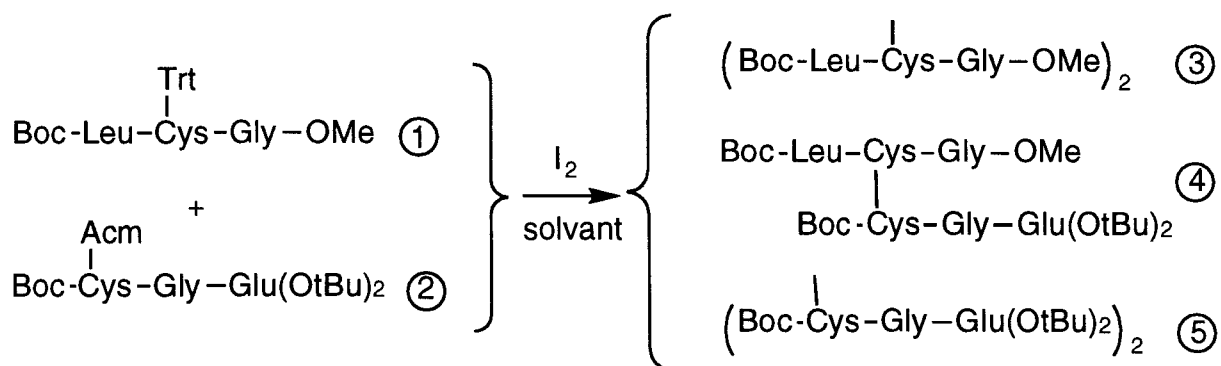


Ce mécanisme est en accord avec les observations de Larrouquère (Larrouquere et al., 1961) : une solution de cystéine consomme, selon sa concentration, un ou quatre équivalents d'iode lors d'une titration.

Lorsque les expériences sont réalisées dans l'acide acétique glacial avec des quantités d'eau différentes, on constate que la consommation d'eau n'est pas stoechiométrique, ce qui signifie que la réaction procède par un mécanisme différent. Le thiol et l'iode forment un complexe de transfert de charge et l'eau a un double rôle (Higuchi et al., 1966) : déprotoner le complexe et inhiber la protonation de l'ion  $RSI_2^-$ .



Différentes études ont montré que la vitesse d'oxydation en cystine dépend de la nature du solvant ainsi que de celle du groupe protecteur du soufre (Kamber et al., 1968).



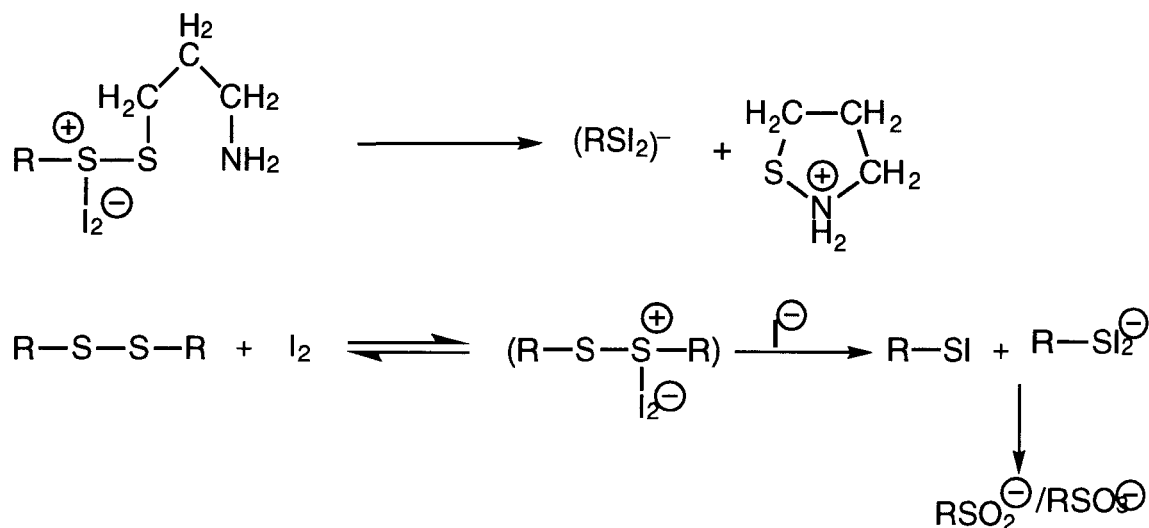
Solvants	③	④	⑤	②
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ou CHCl <sub>3</sub>	94-96	4-6	0	94
CHCl <sub>3</sub> / HFIP (1/3)	>98	<2	0	>98
CHCl <sub>3</sub> / TFE (1/3)	95-97	3-5	0	95-97
MeOH	20-30	70-80	10-20	5-15
MeOH / CHCl <sub>3</sub> (1/1)	20-30	70-80	10-20	5-15
MeOH / H <sub>2</sub> O (8/2)	25-35	65-75	10-25	5-10
AcOH / H <sub>2</sub> O (8/2)	40-50	50-60	15-25	20-30
DMF	5-15	15-25	75-85	0

Kamber a montré que certains aminoacides tels que la tyrosine, l'histidine et le tryptophane, non protégés sur leur chaîne latérale, pouvaient en présence d'iode, conduire à des réactions secondaires importantes (Kamber et al., 1960). D'autres auteurs (Higushi et al., 1966) ont observé une oxydation des méthionines.

Les esters *tertiobutyliques* ne sont pas altérés lors de la réaction avec l'iode; par contre les groupes acido-labiles temporaires usuels (Trt, Boc, Bpoc....) sont partiellement ou totalement clivés par l'acide iodhydrique libéré dans la réaction d'oxydation, ce qui conduit à des mélanges de peptides (Kamber et al., 1980).

L'utilisation du méthanol comme solvant de la réaction provoque l'estérification de la fonction acide. Les fonctions amines libres ne réagissent pas directement avec l'iode mais des produits réactionnels, surtout des peptides à chaîne ouverte contenant un résidu cystine, sont instables s'ils possèdent une amine non protégée (Kamber et al., 1971); il vaut donc mieux déprotéger les fonctions amine après formation du pont disulfure. En outre la présence d'amine libre peut provoquer la formation de sulfénamides par ouverture du pont disulfure en présence de l'excès d'iode (Doi et al., 1984), et même des sulfonamides (Doi et al., 1985).





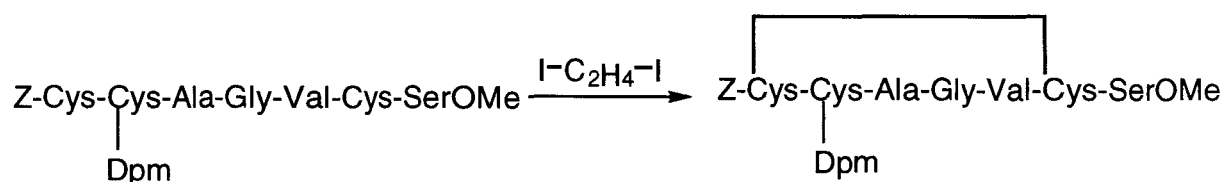
La présence d'un pont disulfure interdit donc l'utilisation de l'iode pour la création d'un second pont disulfure, résultats confirmés par Kamber (Kamber et al., 1980) qui constate que la présence d'iode provoque une réaction d'échange équilibrée conduisant aux 2 disulfures symétriques.

Cependant Birr a utilisé avec succès cette méthode pour synthétiser le peptide MCD (mast cell degranulating peptide) ayant 22 aminoacides dont 4 cystéines (Birr et al., 1979).

## V- OXYDATION EN UTILISANT DES DERIVES HALOGENES

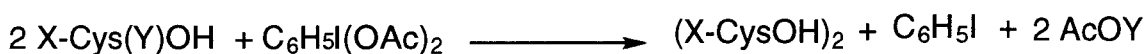
Pour éviter les inconvénients de la réaction d'oxydation par l'iode, (passage à des degrés d'oxydation supérieurs, réactions secondaires avec certains aminoacides...), d'autres réactifs ont été proposés dans la littérature.

- Le 1,2-diiodoéthane oxyde sélectivement toute fonction thiol non protégée, ce qui nécessite une déprotection préalable, étape qui est souvent incomplète (Zervas et al., 1965).



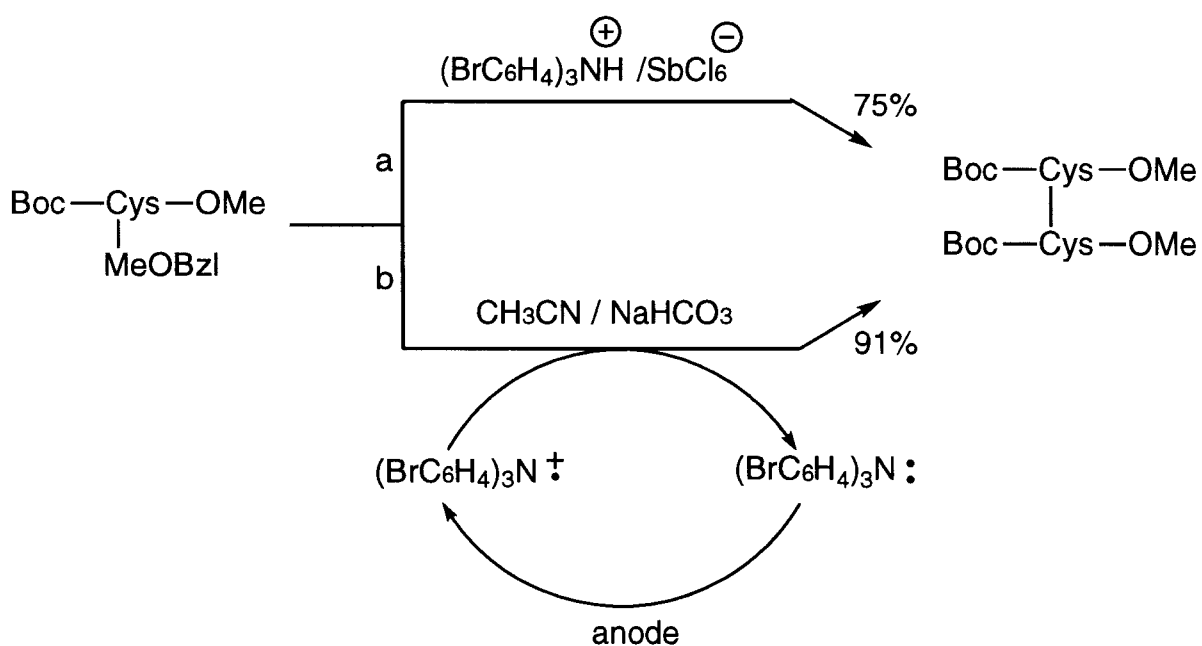
La réaction doit être réalisée dans des conditions de haute dilution pour favoriser la formation du produit cyclique désiré en minimisant celle des produits de dimérisation ou de polymérisation.

- Par contre l'oxydation directe de la S-Trt, S-Dpm ou S-Acm cystéine peut être réalisée généralement dans de bonnes conditions avec le [bis(acétoxy)Iodo]benzène (Kolovos et al., 1984).



Cette méthode d'oxydation ne peut pas être appliquée en présence d'un groupe amide primaire qui est facilement oxydé dans ces conditions.

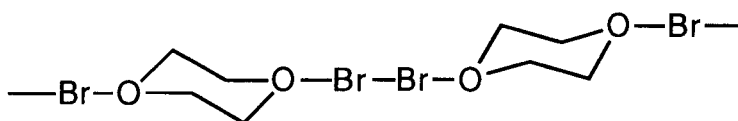
Des dérivés bromés ont également été utilisés comme oxydants.  $(\text{BrC}_6\text{H}_4)_3\text{N}^+.\text{SbCl}_6^-$  est un agent de transfert d'électron capable de transformer les dérivés de la S-(méthoxy-4 benzyl) cystéine en dérivés correspondants de la cystine, par voie chimique (a) et par voie électrochimique (b) (Platen et al., 1984).



Cette méthode permet un clivage oxydant doux du groupe méthoxybenzyle (MeOBzl) sans toutefois affecter ni les liaisons disulfure déjà existantes, ni les groupes protecteurs des fonctions amine ou acide habituels.

Il faut signaler que le groupe MeOBzl est totalement stable dans les conditions de détritulation par l'iode (El-wassimy et al., 1984) ce qui permet d'utiliser une combinaison de ces 2 groupes Trt et MeOBzl pour former successivement, donc régiosélectivement, 2 ponts disulfure.

- Un autre composé bromé, le complexe dibromure de dioxane -1, 4 (Bodansky M. et al., 1959) est aussi utilisé pour oxyder les thiols en disulfures correspondants (El-wassimy et al., 1984); mais à partir de la cystéine, la cystine n'est obtenue qu'avec un rendement insuffisant de 52%.



## VI- OXYDATION EN UTILISANT DES SULFOXYDES

L'utilisation de thiosulfates pour la synthèse de disulfures est une méthode très ancienne (Small et al., 1947).

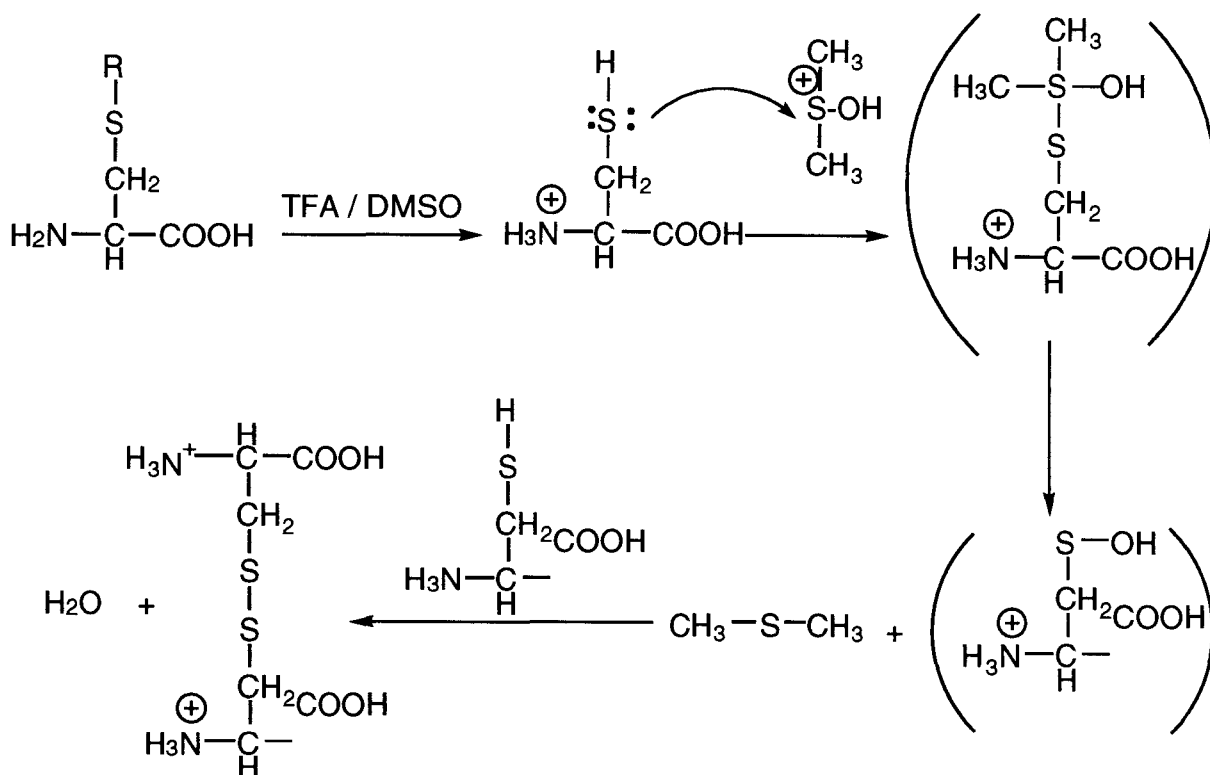
En général, les méthodes d'oxydation par l'air ou échange de disulfures mixtes sont satisfaisantes pour la plupart des synthèses, particulièrement pour les protéines et les peptides acides. Cependant, pour les peptides basiques et hydrophobes qui tendent à s'agréger et précipiter en solution, à leur point isoélectrique basique ou neutre, durant le processus d'organisation spatiale, la méthode d'oxydation par l'air ou d'échange de disulfures mixtes n'est pas satisfaisante.

Une méthode récente a été proposée par d'autres auteurs (Tam et al., 1991, Otaka et al., 1991) pour la formation de disulfure similaire à celle de l'oxydation par l'air, mais dans des conditions acides. Cette méthode consiste à utiliser un agent oxydant moyen, le diméthylsulfoxyde (DMSO) en solution aqueuse dans un large intervalle de pH. La réaction est indépendante du pH entre pH 3 et 8, dans une

solution aqueuse à 20% de DMSO. Cependant à un pH supérieur à 8, l'échange de disulfures est plutôt rapide. Mais il a été montré qu'elle devient pH-dépendante si l'acide aminé N-terminal est une cystéine dont la fonction amine en  $\alpha$  est libre. Le pH optimum dans ces conditions est entre pH 6 et 7. Cependant, cette pH-dépendance disparaît en acétylant l'amine terminale.

La réaction d'oxydation des thiols en disulfures en employant le DMSO a été introduite par Wallace et al. (Wallace et al., 1977).

Cette méthode d'oxydation par le DMSO peut être également réalisée dans le TFA (Otaka et al., 1991) et permet la transformation directe des cystéines S-protégées; Cys(Trt), Cys(MeBzl), Cys(Dbs) et Cys(Bzh), ainsi que la cystéine libre, en cystines. Cys(MeBzl) est stable au TFA et ne peut pas être convertie en cystine par un traitement avec 10% de DMSO dans le TFA. Cependant l'ocytocine protégée : Z(OMe)-Cys(Mebzl)-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys(MeBzl)-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>, préparée en phase homogène, traitée avec 10% DMSO dans le TFA en présence d'anisole à 25°C pendant 12H, fournit une oxytocine oxydée avec un rendement de 73.5% (Otaka et al., 1991).



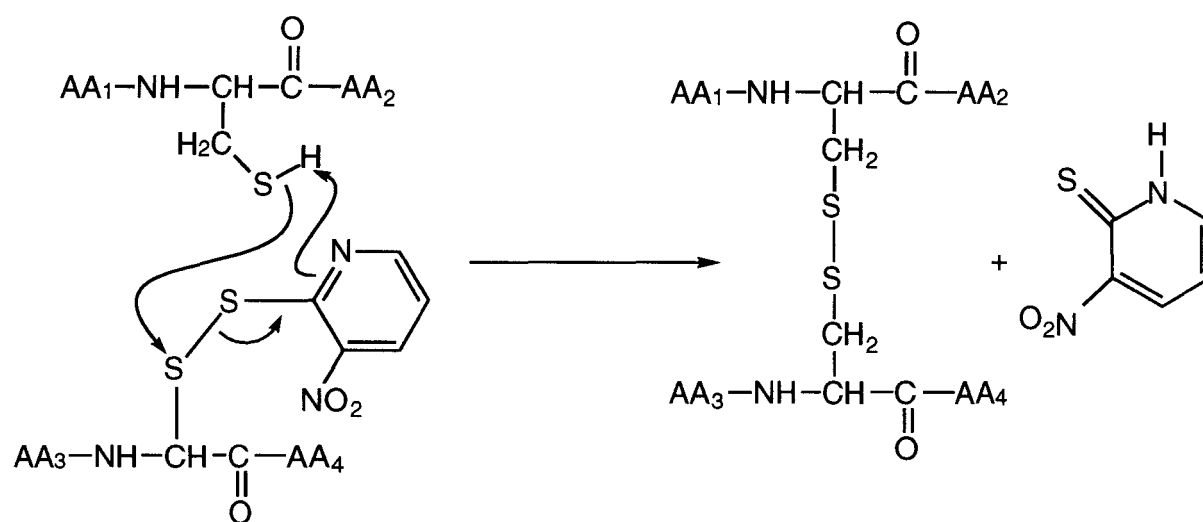
L'oxydation par le DMSO dans le TFA peut conduire à une modification partielle des tryptophanes ainsi que l'oxydation partielle des méthionines en sulfoxydes (Otaka A. et al., 1991).

## VII - UTILISATION DES DISULFURES ACTIVES

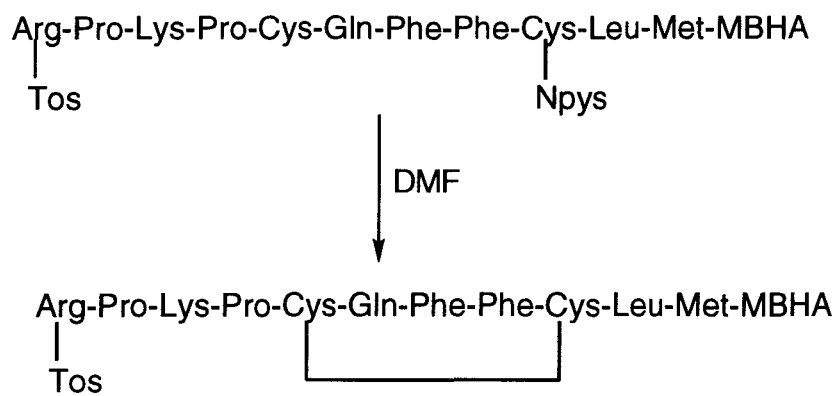
Les groupes protecteurs de type sulfényle sont de plus en plus utilisés en synthèse peptidique, car ils offrent la possibilité unique de protéger la fonction thiol durant la synthèse peptidique et de l'activer simultanément pour former un pont disulfure.

Le disulfure dissymétrique 3-nitropyridinyl-2-sulfényl cystéine : Cys(Npys) (Matsueda et al., 1982) est activé car la liaison S-S est très polarisée du fait de la présence d'un groupe fortement attracteur d'électrons.

Ceci a permis de suggérer que le groupe Npys puisse être utilisé pour former des ponts disulfure dissymétriques en une seule étape par attaque nucléophile par la fonction thiol d'une même molécule de cystéine (Bernatowicz et al., 1985, 1986, 1987).



Ploux et al. (1987.) ont utilisé cette méthode pour préparer un analogue cyclique de la substance P sur un support solide de type méthylbenzhydryl amine (MBHA).



Le succès de ces cyclisations paraît dû à une faible mobilité des espèces supportées, qui réduit la vitesse des réactions intermoléculaires conduisant aux oligomères.

## Références

- Anfinsen C.B., Scheraga H.A., Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Adv. Prot. Chem.* (1975) **29**, 209-300.
- Birr C., Wengert-Muller M., Synthesis of mast cell-degranulating (MCD) peptides from bee venom. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* (1979) **91**, 156-157.
- Barton D. H., Ley S. V., Meerrholz C. A., Bis (p-methoxyphenyl) telluroxide: a new, mild oxidizing agent. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1979) 755-756.
- Bernatowicz M. S., Matsueda R., Matsueda G. R., Preparation of Boc-[S-(3-nitro-2-pyridinesulfonyl) cysteine and its use for unsymmetrical disulfide bond formation. *Int. J. Peptide Protein Res.* (1987) **29**, 126-.
- Bernatowicz M. S., Matsueda G. R., The N-hydroxysuccinimide ester of Boc-[S-(3-nitro-2-pyridinesulfonyl)-cysteine: a heterobifunctional cross-linking agent. *Pept. Struct. Funct. Proc. Acm. Pept. Symp. 9 th.* (1985), 233-236.
- Bernatowicz M. S., Matsueda R., Matsueda G. R., Preparation of Boc-[ S-(3-nitro-2-pyridinesulfonyl)] -cysteine and its use for unsymmetrical disulfide bond formation. *Int. J. Peptide Protein Res.* (1986) **28**, 107-112.
- Bodansky M., Du Vigneaud V., An improved synthesis of oxytocin. *J Am. Chem. Soc.* (1959) **81**, 2504-2507.
- Chakravarty P. K et Olsen R. K, Benzamidomethyl group as a thiol protecting group for cystein, N-methylcysteine and corresponding N-tert-butyloxycarbonyl derivatives. *J. Org. Chem.* (1978) **43**, 1270-1271.
- Chotia C., Principles that determine the structure of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* (1984) **53**, 537-572.

**-Creighton T. E.**, Interactions between cysteine residues as probes of protein conformation; Disulfide bond between Cys-14 and Cys-38 of the pancreatic trypsin inhibitor. *J.Mol. Biol.* (1975) **96**, 767-776.

**-Creighton T. E., Goldenberg D. P.**, Kinetic role of a meta-stable native-like two-disulfide species in the folding transition of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J.Mol. Biol.* (1984) **179**, 497-502.

**-Creighton T. E.**, Protein structure. A practical approach. *Bioph. Chem.* (1988) **31**, 155-160.

**-Danehy J. P.**, Oxydation of organic divalent sulfur by iodine. *Int. J. Sulfur. Chem.* (C) (1971) **6**, 159-166.

**-Doi J. T., Musker W. K.**, Neighboring group participation in organic redox reactions. 9. Facilitation of disulfide oxydative cleavage reaction. *J. Am. Chem. Soc.* (1984) **106**, 1887-1888.

**-Doi J. T., Musker W. K.**, A general mechanism for the oxydative cleavage of amine disulfides and cysteine in aqueous iodine. Isolation of cyclic sulfinamides. *J. Org. Chem.* (1985) **50**, 1-10.

**-El-wassimy M. T. M., Jorgensen K. A., Lawesson S. O.**, The reaction of thiocarbonyl compounds S, S acetals and thiols with the 1, 4 dioxane-dibromine complex. Convenient methods for the transformation of thiocarbonyl compounds and S, S-acetals into the corresponding carbonyl synthons, and the oxidation of thiols to the corresponding disulfides. *Chem. Scripta.* (1984) **24**, 80-83.

**-Eritja R., Ziehler-Martin J. P., Walker P. A., Lee T. D., Legesse K., Albericio F., Kaplan B. E.**, Use of the S-tert-burylsulfenyl group for protection of cysteine in solid phase peptide synthesis using Fmoc aminoacids. *Tetrahedron* (1987) **43**, 2675-2680.



-Fujii N., Otaka A., Watanabe T., Okamachi A., Tamamura H., Yajima H., Inagaki Y., Nomizu M., Asano K., Silver trifluoromethanesulfonate as an S-deprotecting reagent for the synthesis of cystine peptides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1989) 283-284.

-Fujii N., Otaka A., Funakoshi S., Bessho K., Yajima H., New procedure for the synthesis of cystine peptides by oxidation of S-substituted cysteine peptides with thallium (III) trifluoroacetate. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1987) 163-164.

-Heaton G. S., Rydon H. N., Schofield J. A., Polypeptides. III. Oxidation of peptides of cysteine and glycine. *J. Chem. Soc.* (1956) 78, 3157-3168.

-Higuchi T., Gensch K. H., Acylation through a sulfonium ion intermediate. Coupled conversion of carboxylic acid to an acid anhydride during oxidation of thio ether to sulfoxide. *J. Am. Chem. Soc.* (1966) 88, 3874-3875.

-Higuchi T., Gensch K. H., Oxidation of thio ethers by iodine to sulfoxides. Catalytic role of certain inorganic nucleophiles. *J. Am. Chem. Soc.* (1966) 88, 5486-5491.

-Hiskey R. G., Davis G. W., Safdy M. E., Inui T., Uphan R. A., Jones W. C., Sulfur containing polypeptides. XIII. Bis cysteine peptide derivative. *J. Org. Chem.* (1970) 35, 4148-4157.

-Huth J.R., Perini F., Lockridge O., Bedowst E., Ruddon R.W., Protein folding and assembly in vitro parallel intracellular folding and assembly. Catalysis of folding and assembly of the human chorionic gonadotropin  $\alpha\beta$  dimer by protein disulfide isomerase. *J. Biol. Chem.* (1993) 268, 16472-16482.

-Jarvis D., Rydon H. N., Schofield J. A., Polypeptides. VII. The synthesis and oxidation of L-cysteinylpentaglycyl-L-cysteine and L-cysteinylhexaglycyl-L-cysteine. *J. Chem. Soc.* (1961) 83, 1752-1765.

- Jayakumar R., Jayanthi C., Gomathy L.,** Peptide aggregates: a novel model system to study self-assembly of peptides. *Int. J. Peptide Protein Res.* (1995) **45**, 129-137.
- Kamber B., Rittel W.,** Cysteine peptide synthesis. *Helv. Chim. Acta* (1968) **51**, 2061-2064.
- Kamber B.,** Synthesis of insulin fragments with an intact interchain bridge A20-B16. *Helv. Chim. Acta* (1971) **54**, 398-422.
- Kamber B., Hatmann A., Eisler K., Riniker B., Rink H., Sieber P., Rittel W.,** The synthesis of cystine peptides by iodine oxydation S-tritylcysteine and S-acetamidomethyl cysteine peptides. *Helv. Chim. Acta* (1980) **63**, 899- 915.
- Kishore R., Raghothama S., Balaram P.,** Cystine peptides. *Int. J. Peptide Protein Res.* (1987) **29**, 381-391.
- Kolovos M., Moutevelis-Minakakis P.,** The use of diacetoxyphenyliodine for the direct oxydative conversion of S-protected L-cysteine compounds to L-cystine derivatives. *Tetrahedron Lett.* (1984) **25**, 4153-4156.
- Large D. G., Rydon H. N., Schofield J. A.,** Polypeptides. VI. Further study of the oxydation of L-cysteinyltetraglycyl-L-cysteine. *J. Chem. Soc.* (1961) **83**, 1749-1752.
- Larrouquere J.,** Reactivity of several thiols. *Ann. Chim. (Paris)* (1961) **6**, 733-790.
- Mandal A. B., Jayakumar R.,** A new micelle-forming peptide. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1993) 237-238.
- Marbach P., Rudinger J.,** Synthesis of [2-p-fluorophenylalanine]oxytocin and its deamino analog using the S-acetamidomethyl protecting group. *Helv. Chim. Acta* (1974) **57**, 403-414.

- Matsueda R., Higashida S., Ridge R. J., Matsueda G. R.** 3-tertio-2-pyridinesulfenyl (Npys) protecting group: protection and activation of the thiol fonction. *Pept. Chem.* (1981) 31-36; Activation of conventional S-protecting groups of cysteine by conversion into the 3-nitro-2-pyridinesulfenyl (Npys) group. *Chem. Lett.* (1982) 921-924.
- Nakata M., Ueyama N., Nakamura A.**, Structure in solution of a tetrapeptide Z-Cys-Pro-leu-Cys-OMe, and thermal stability of its iron (III) complex. *Pept. Chem.* (1981) 195-198.
- Otaka A., Koide T., Shide A., Fujii N.**, Application of dimethyl sulfoxyde (DMSO) trifluoroacetic acid (TFA) oxidation to the synthesis of cystine-containing peptide. *Tetrahedron Lett.* (1991) **32**, 1223-1991.
- Platen M., Steckhan E.**, Oxidative deblocking of the 4-methoxybenzyl thioether protecting group : application to the directed synthesis of polycysteinyl peptides. *Liebigs Ann. Chem.* (1984), 1563-1576.
- Ploux O., Chassaing G., Marquet A.**, Cyclization of peptides on a solid support. Application to cyclic analogs of substance P. *Int. J. Peptide Protein Res.* (1987) **29**, 162-169.
- Small L. D., Bailey J. H., Cavallito J.**, Alkyl thiosulfinates. *J Am. Chem. Soc.* (1947) **69**, 1710-1713.
- Snyder G. H.**, Intramolecular disulfide loop formation in a peptide containing two cysteines. *Biochemistry* (1987) **26**, 688-694.
- Tam J. P., Wu C.R, Liu W., Zhang J.W.**, Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxyde. Scope and applications. *J Am. Chem. Soc.* (1991) **113**, 6657-6662.

**-Veber D., Milkowski J., Denkewalter R., Hirschmann R.,** The synthesis of peptides in aqueous medium. IV. A novel protecting group for cysteine. *Tetrahedron Lett.* (1968) 3057-3058.

**-Veber D., Milkowski J., Verga S., Denkewalter R., Hirschmann R.,** Acetamidomethyl. A novel thiol protecting group for cysteine. *J. Am. Chem. Soc.* (1972) **94**, 5456-5468.

**-Wallace T. J., Mahon J. J.,** Reactions of thiols with sulfoxides. III. Catalysis by acids and bases. *J. Org. Chem.* (1965) **30**, 1502-1506.

**-Zervas L., Photaki I., Cosmatos A., Borovas D.,** On cysteine and cystine peptides. III. Synthesis of a fragment of insulin containing the intrachain disulfide bridge. *J. Am. Chem. Soc.* (1965) **87**, 4922-4933.

## **IV-LA CHLOROTOXINE**

# LA CHLOROTOXINE

## I-INTRODUCTION

Des travaux publiés par Debin et Strichartz (1991) ont montré que le venin du scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (Lqq) est capable d'inhiber des canaux perméables au chlore extraits de cerveau d'embryons de rats et reconstitués dans des bicouches lipidiques. Ces canaux possèdent une conductance unitaire d'environ 40 pS et présentent une rectification dans le sens sortant. Récemment Debin et al. (1993) ont purifié une toxine du venin de Lqq, la chlorotoxine, qui serait le peptide responsable de l'inhibition des canaux chlore reconstitués dans les membranes lipidiques.

La chlorotoxine est une toxine peptidique, appartenant à la famille de toxines de scorpion à chaîne courte c'est à dire moins de 40 acides aminés. Elle bloque spécifiquement les canaux chlore de faible conductance. Sa structure primaire est faite de 36 acides aminés dont 8 cystéines, offrant ainsi une structure compacte verrouillée par 4 ponts disulfure.

Cette toxine présente une forte homologie avec certaines insectotoxines telles que I5A isolé du venin de *Buthus eupeus* (Grishin et al., 1978), peptide I isolé du venin de *Buthus indicus* (Fazal et al., 1989) et Ammp2 isolé du venin d'*Androctonus mauretanicus* (Zlotkin et al., 1978; Rochat et al., 1979).

Dans ce chapitre nous rapportons :

- La détermination de la structure tridimensionnelle par RMN (Lippens et al., 1995) et sa comparaison à celle de la famille charybdotoxine, à 3 ponts disulfure.

- Afin de déterminer la nature de l'extrémité C-terminale, non décrite par Debin, deux peptides ont été synthétisés dont l'un a une extrémité carboxylique et l'autre, une extrémité carboxamide.

- Pour déterminer le rôle du quatrième pont disulfure absent dans les autres toxines à chaîne courte, une série d'analogues à 3 ponts disulfure a été

synthétisée, en remplaçant à chaque fois 2 cystéines s'appariant ensemble par 2 alanines.

## II-DISCUSSION

### A- Structure 3D de la chlorotoxine

L'étude RMN de la chlorotoxine (Lippens et al., 1995) montre qu'elle est faite de 3 brins  $\beta$  antiparallèles empaquetant une hélice  $\alpha$ , adoptant ainsi la même conformation spatiale que la charybdotoxine et les autres toxines de scorpion à chaîne courte. Les ponts disulfure de la chlorotoxine Cys5-Cys28, Cys16-Cys33 et Cys20-Cys35 relient l'hélice  $\alpha$  au feuillet  $\beta$ , créant ainsi une structure identique au motif commun rencontré dans les autres toxines de scorpion à chaîne courte. Le quatrième pont disulfure (Cys2-Cys19) relie le petit brin  $\beta$  N-terminal au reste de la molécule, contrairement à ce qu'on observe dans la charybdotoxine où ce quatrième pont disulfure est absent et où le brin N-terminal interagit avec le reste de la molécule par des contacts entre les résidus hydrophobes. Une autre différence structurale entre la chlorotoxine et la charybdotoxine est observée au niveau du coude  $\alpha$ - $\beta$  où un changement du potentiel électrostatique en surface est observé et qui est largement positif au niveau de ce coude dans la chlorotoxine. Dans le cas de la charybdotoxine, ce potentiel positif, à la même position, en surface est absent. Les différents résidus chargés situés dans le site exposé au solvant au niveau du feuillet  $\beta$  en C-terminal, dans le cas de la charybdotoxine, forment la surface positive. Cette région positive est désorganisée dans la chlorotoxine par remplacement de l'une des arginines par une leucine et par la présence de deux résidus d'acide aspartique dans l'hélice  $\alpha$ .

## **B- Synthèse et identification de la nature de l'extrémité C-terminale de la chlorotoxine**

Plusieurs toxines de la famille de scorpion appartenant à la famille des toxines à chaîne courte (environ 40 acides aminés) et contenant 3 ponts disulfure ont été synthétisées par voie chimique, scyllatoxine (Auguste et al., 1990), charybdotoxine (Lambert et al., 1990), iberiotoxine (Johnson et al., 1992), PO5 (Sabatier et al., 1993), mais à notre connaissance aucune toxine de scorpion à 4 ponts disulfure n'avait été synthétisée jusqu'à présent.

La présence du quatrième pont disulfure dans le cas de la chlorotoxine augmente le nombre de possibilités de topologies de disulfure de 15 à 105. Après la déprotection des résidus cystéines, l'étape cruciale de la synthèse est l'oxydation des fonctions thiol en disulfure.

Certaines toxines à chaîne courte ont été oxydées directement par l'oxygène de l'air: scyllatoxine (Auguste et al., 1990) et noxiustoxine (Nutt et al., 1992). L'utilisation de cette méthode dans le cas de la chlorotoxine n'a pas été un succès car le profil du chromatogramme en HPLC montre un pic très large (voir fig. dans l'article). Dans ce cas, l'utilisation du système rédox réduit et oxydé est nécessaire pour un repliement correct de la protéine. Les 2 chlorotoxines synthétiques à extrémité carboxylique ou carboxamide s'oxydent dans les mêmes conditions.

La comparaison des 2 toxines synthétiques s-CITx-NH<sub>2</sub> et s-CITx-OH avec la chlorotoxine naturelle n-CITx en HPLC et en électrophorèse capillaire montre que la s-CITx-NH<sub>2</sub> coélué avec n-CITx dans les 2 cas (voir fig. dans l'article). D'autre part ces 3 toxines synthétiques ont été soumis à la dégradation enzymatique par la carboxypeptidase B. Seule s-CITx-OH a été coupée par la carboxypeptidase B et qui est sans effet sur s-CITx-NH<sub>2</sub> et sur n-CITx. Ces résultats permettent de définir la nature de l'extrémité C-terminale de la chlorotoxine comme carboxamide.

Pour tester l'activité biologique de la s-CITx-NH<sub>2</sub> et n-CITx, une série expérimentale importante a été réalisée par Philippe Poujeol et son équipe à dans le service de Biologie cellulaire à Saclay. Des cellules de la lignée HT29 qui proviennent d'un cancer du colon humain et ont été très étudiées pour leur forte



densité de canaux chlore membranaires ont été choisies comme modèle expérimental.

Quatre techniques ont été utilisées pour tester l'activité biologique de la chlorotoxine synthétique, naturelle et le venin entier de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*.

1) mesure de la perméabilité au chlore sur des épithéliums par sonde fluorescente sensible au chlore, le méthoxy sulfo-propyl quinolinium.

2) mesure du potentiel membranaire sur des suspensions de cellules par sonde fluorescente, le bis-oxonol qui est un anion lipophile traversant librement les membranes cellulaires en fonction du potentiel.

3) mesure des mouvements de chlore par détermination du gonflement des cellules en suspension, en mesurant la dispersion de la lumière à 90°.

4) mesure des courants chlore par la technique du patch-clamp qui permet d'analyser les courants ioniques unitaires à travers une membrane cellulaire.

Sur la base des résultats obtenus sur les cellules HT29 par les différentes techniques, il apparaît que le venin de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, ses différentes fractions et la chlorotoxine synthétique et naturelle n'ont pas de réel effet inhibiteur sur les canaux chlore. Dans ces expériences, les toxines ont été testées sur la face externe des cellules ce qui pourrait expliquer cette absence d'inhibition puisque Debin et al. (1991) ont conclu à un effet par voie intracellulaire. Des expériences de patch-clamp ont donc été réalisées dans une configuration où la chlorotoxine était perfusée du côté intracellulaire d'un canal chlore sensible à l'AMP cyclique. Dans ces conditions la chlorotoxine semble diminuer l'amplitude du canal sans modification de la probabilité d'ouverture.

Finalement nous ne pouvons pas attribuer à la chlorotoxine d'effet biologique sur les canaux chlore que nous avons testés. Des expériences analogues à celles de Debin et al. seraient nécessaires pour préciser l'action de la chlorotoxine qui n'a pour le moment été testé que sur des systèmes de canaux reconstitués dans des bicouches lipidiques. Canaux qui de plus semblent différents de ceux que nous avons analysés dans la présente étude.

## C- détermination du rôle du pont disulfure supplémentaire

Pour déterminer le rôle du quatrième pont disulfure (Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>19</sup>) absent dans la charybdotoxine et autres, nous avons synthétisé un analogue en remplaçant ces deux cystéines par deux alanines (ces manipulations ont été conduites avant la fin de la détermination de la structure de la chlorotoxine) et ensuite déterminer sa structure et la comparer à celle de la chlorotoxine native. Cet analogue Ala<sup>2</sup>-Ala<sup>19</sup> a été synthétisé en phase solide en utilisant la même stratégie que pour la chlorotoxine avec les 8 cystéines. Il a été également oxydé dans les mêmes conditions que la chlorotoxine, c'est à dire en présence de GSH/GSSG à pH 8.

Trois autres analogues Ala<sup>5</sup>-Ala<sup>28</sup>, Ala<sup>16</sup>-Ala<sup>33</sup> et Ala<sup>20</sup>-Ala<sup>35</sup> ont été synthétisés pour déterminer le rôle de chaque pont disulfure dans le maintien de la stabilité de la structure native. La synthèse en phase solide s'est déroulée pour les 3 analogues dans les mêmes conditions que la chlorotoxine et l'analogue Ala<sup>2</sup>-Ala<sup>19</sup>. Ces 3 analogues, contrairement à l'analogue Ala<sup>2</sup>-Ala<sup>19</sup>, ne s'oxydent pas dans les conditions citées précédemment pour l'oxydation de la chlorotoxine. Différentes autres conditions d'oxydation ont été essayées, mais le profil en HPLC montre, dans tous les cas, des pics larges indiquant la formation d'agrégats ou de polymères.

Ces résultats de synthèse des différents analogues laissent à penser que les ponts disulfure Cys<sup>5</sup>-Cys<sup>28</sup>, Cys<sup>16</sup>-Cys<sup>33</sup> et Cys<sup>20</sup>-Cys<sup>35</sup> sont indispensables pour le repliement de la protéine. Par contre, le bon déroulement de la synthèse de l'analogue Ala<sup>2</sup>-Ala<sup>19</sup> dans les mêmes conditions que la chlorotoxine suggère que le quatrième pont disulfure Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>19</sup>, absent dans la charybdotoxine, ne semble pas jouer un rôle important dans le repliement de la protéine.

Des études RMN ont été réalisées sur la s-CITx-NH<sub>2</sub> et l'analogue Ala<sup>2</sup>-Ala<sup>19</sup>. Les résultats montrent que la s-CITx-NH<sub>2</sub> est identique à la naturelle. L'analogue Ala<sup>2</sup>-Ala<sup>19</sup> a une structure secondaire à celle des toxines de scorpion à chaîne courte, avec les trois ponts disulfure reliant l'hélice  $\alpha$  au feuillet  $\beta$ . Cependant l'orientation du coude  $\alpha$ - $\beta$  distinguant la chlorotoxine de la charybdotoxine est conservée dans cet analogue. L'élimination du quatrième pont disulfure induit

une diminution globale de la stabilité de l'analogue, ceci est dû à la perturbation de la participation du brin N-terminal dans le feuillet  $\beta$ .

## Références

- Arseniev A.S., Kondakov K.I., Maiorov V.N., Bystrov V.F., NMR solution spatial structure of 'short' scorpion insectotoxin I<sub>5</sub>A. *FEBS Lett.* (1984) **165**, 57-62.
- Auguste P., Hugues M., Gravé B., Gesquière J.C., Maes P, Tartar A., Romey G., Schweitz H., Lazdunski M., Leiuroxin I (Scyllatoxin), a peptide ligand for Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* (1990) **265**, 4753-4759.
- Debin J.A., Maggio J.E., Strichartz G.R., Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am. J. Physiol. Soc.* (1993) **264**, C361-C369.
- Debin J.A & Strichartz G.R., Anion channels from mammalian nerve growth cones (Abstract). *Biophys. J.* (1990) **57**, 319a.
- Fazal A., Beg O.U., Shafgat J., Zaidi Z.H., Jornvall H., Characterization of two different peptides from the venom of the scorpion *Buthus indicus*. *FEBS Lett.* (1989) **257**, 260-262.
- Johnson B.A., Sugg E.E., Determination of the three-dimensional structure of Iberiotoxin in solution by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* (1992) **31**, 8151-8159.
- Lambert P., Kuroda H., Chino N., Watanabe T.X., Kimura T., Sakakibara S., Solution synthesis of charybdotoxin (ChTX), a K<sup>+</sup> channel blocker. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1990) **170**, 684-690.
- Lippens G., Najib J., Wodak S.J., Tartar A., NMR sequential assignments and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels. *Biochemistry* (1995) **34**, 13-21.

-Nutt R.F., Arison B.H., Smith J.S., Structure revision of the scorpion toxin noxiustoxin through total chemical synthesis. *Peptides* (Schneider C.H. & Erbel A.N, Eds) (1992) 101-102.

-Sabatier J.M, Zerrouk H., Darbon H., Mabrouk K., Benslimane A., Rochat H., Martin-Eauclaire M.F., Van Rietschoten J., PO5, a new Leiurotoxin I-like scorpion toxin: synthesis and structure-activity relationships of the  $\alpha$ -amidated analog, a ligand of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels with increased affinity. *Biochemistry* (1993) 32, 2763-2770.

-Zlotkin E., Miranda F., Rochat H., Arthropod venoms (*Bettini S., Ed*) Springer-Verlag, Berlin (1978) 317-369.

## NMR Sequential Assignments and Solution Structure of Chlorotoxin, a Small Scorpion Toxin That Blocks Chloride Channels<sup>†,‡</sup>

G. Lippens,<sup>\*,§,||</sup> J. Najib,<sup>§</sup> S. J. Wodak,<sup>||</sup> and A. Tartar<sup>§</sup>

*Service de Chimie des Biomolécules (SCBM), Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, 59000 Lille, France, and Unité de Conformation des Macromolécules Biologiques (UCMB), CP 160-16, Université Libre de Bruxelles, Avenue P. Héger, B-1050 Brussels, Belgium*

Received June 2, 1994; Revised Manuscript Received September 12, 1994<sup>®</sup>

**ABSTRACT:** The solution structure of chlorotoxin, a small toxin purified from the venom of the *Leiurus quinquestriatus* scorpion, has been determined using 2D <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. Analysis of the NMR data shows that the structure consists of a small three-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet packed against an  $\alpha$ -helix, thereby adopting the same fold as charybdotoxin and other members of the short scorpion toxin family [Arseniev *et al.* (1984) *FEBS Lett.* 165, 57–62; Martins *et al.* (1990) *FEBS Lett.* 260, 249–253; Bontems *et al.* (1991) *Science* 254, 1521–1523]. Three disulfide bonds of chlorotoxin (Cys5–Cys28, Cys16–Cys33, and Cys20–Cys35), cross-linking the  $\alpha$ -helix to the  $\beta$ -sheet, follow the common pattern found in the other short scorpion toxins. The fourth disulfide bridge (Cys2–Cys19) links the small N-terminal  $\beta$  strand to the rest of the molecule, in contrast to charybdotoxin where this disulfide bridge is absent and the first strand interacts with the rest of the molecule by several contacts between hydrophobic residues. Another structural difference between chlorotoxin and charybdotoxin is observed at the level of the  $\alpha$ - $\beta$  turn. This difference is accompanied by a change in the electrostatic potential surface, which is largely positive at the level of this turn in chlorotoxin, whereas no such positive potential surface can be found at the same position in charybdotoxin. In the latter protein, the positive surface is formed by different charged residues situated on the solvent-exposed site of the C-terminal  $\beta$ -sheet. This positive region is disrupted in chlorotoxin by the mutation of one of the arginines into a leucine and by the presence of two aspartic acid residues on the  $\alpha$ -helix.

Scorpion venoms are known to contain a variety of toxins acting on Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels. Recently, an additional activity on Cl<sup>-</sup> channels was discovered in the venom of *Leiurus quinquestriatus* (Debin *et al.*, 1993). Because of their high selectivity, these toxins are employed as pharmacological tools for the study of ionic channels (Moczydowski *et al.*, 1988; Strong, 1990; Betz, 1990; Cook & Quast, 1990; Dreyer, 1990; Garcia *et al.*, 1991). Despite their large differences in specificities and activities, the toxins of different scorpion species can be considered as one large protein family. They have been classified into two main categories on the basis of their known primary structures: less than 40 amino acids (short-chain toxins) or 60–70 amino acids (long-chain toxins). Both categories of toxins contain three or four intramolecular disulfide bridges, which are at the basis of their high compactness and stability.

Chlorotoxin (ClTx) is a small neurotoxic peptide, belonging to the short-chain toxins isolated from the venom of scorpion *L. quinquestriatus*. It acts as a specific blocker of the small conductance epithelial chloride channels, hence its name of "chlorotoxin" (Debin *et al.*, 1993). Still, the same authors observed an inhibition only when the molecule was applied to the intracellular surface of the channel and hence

concluded that it is unlikely that epithelial Cl<sup>-</sup> channels are the natural target for chlorotoxin. Sequence analysis showed the molecule to be a 36 amino acid peptide, including eight cysteines, which suggests the presence of four disulfide bonds. The examination of its primary structure revealed a high level of homology with those of the insectotoxins I<sub>5</sub>A isolated from *Buthus eupeus* venom (Grishin *et al.*, 1978), peptide I from *Buthus indicus* (Fazal *et al.*, 1989), and Ammp2 from *Androctonus mauretanicus* (Zlotkin *et al.*, 1978; Rochat *et al.*, 1979) (Figure 1a). Despite a lesser degree of sequence homology, chlorotoxin can also be aligned with an other group of short scorpion toxins which contains only three disulfide bridges: charybdotoxin (Bontems *et al.*, 1991a), iberiotoxin (Galvez *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1992), scyllatoxin (Martins *et al.*, 1990), PO5 (Meunier *et al.*, 1993), noxiustoxin (Possani *et al.*, 1982), and kaliotoxin (Crest *et al.*, 1992) (Figure 1b). These short toxins inhibit the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and form a family characterized by a typical helix/sheet organization. In order to determine whether the presence of a fourth disulfide bridge is compatible with this spatial organization, and to gain insight into the channel selectivity of this new member of the family of small scorpion toxins, we determined the complete three-dimensional structure of chlorotoxin by <sup>1</sup>H NMR and compared it both from a structural and functional point of view to the other ion channel blockers.

### METHODS

*Purification of the Natural Chlorotoxin.* Semipurified fractions of the scorpion venom containing the chlorotoxin were from Latoxan (Rosans, France). The n-ClTx was

<sup>†</sup> G.L. is a research associate receiving financial support from the Belgian National Science Foundation (NFWO).

<sup>‡</sup> Coordinates have been deposited in the Brookhaven Protein Data Bank (file name 1CHL).

<sup>\*</sup> To whom correspondence should be addressed.

<sup>§</sup> Institut Pasteur de Lille.

<sup>||</sup> Université Libre de Bruxelles.

<sup>®</sup> Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, October 15, 1994.

Chlorotoxin	MCMPCFITTDHOMARKCDDCCGGKGRGKCYGPOCLCR-NH <sub>2</sub>
ISA	MCMPCFITTDPNMAKKCRDCCGG--NGKCFGPOCLCNR-NH <sub>2</sub>
Peptide I	RCKPCFTTDPQMSKKCADCCGGKGRGKCYGPOCLC
Amp2	CGPCFTTDPYTESKCATCCGG--RGKCVGPQCLCNRI
Chlorotoxin	MCMPCFITTDHOMARKCDDCCGGKGRGKCYGPOCLCR
Charybdotoxin	EFTNVSC-TT-SKECWSVQRLHNTSRG-KMNRKCFQYS
Iberitoxin	EFTDVDCSV-SKECWSVKDLFGVDRG-KCMGKCFQY
Leiurototoxin	AFC-NLRM-CQLSRSJGLL-G-KCTGDKCECVKH
RO5	TVC-NLRR-CQLSRSJGLL-G-KCTGVKCECVKH
Nokiusotoxin	TIINVKC-TSPKQ-CSKPKELYGSSAGAKMNGKCKCYN
Kaliotoxin	GVEINVKCSGSPQ-CLKPKDAAGRFG-KMNRKCFQY

FIGURE 1: (a) Sequence alignment of chlorotoxin with those of other small insectotoxins characterized by four disulfide bonds, by matching cysteine residues. (b) Sequence alignment of chlorotoxin with those of small scorpion toxins characterized by three disulfide bonds, by matching cysteine residues. The three conserved cysteine bonds are indicated in bold. Replacement of the positively charged K23 in chlorotoxin by a hydrophobic residue in the other toxins is underlined; the residue between the two cysteines on the C-terminal  $\beta$ -sheet is indicated in *italic* (see text).

purified by reverse-phase HPLC (Nucleosil, C18, 10.7  $\times$  500 mm, 5  $\mu$ m, 100  $\text{\AA}$ ) at a flow rate of 2 mL/min, using a gradient from 0% to 18% for 15 min and then from 18% to 36% CH<sub>3</sub>CN in aqueous TFA in 60 min.

**NMR Spectroscopy.** All NMR experiments were performed at 10 and 36°C on a Varian Unity 600 MHz spectrometer (Varian Instruments, Palo Alto, CA). We recorded different homonuclear <sup>1</sup>H spectra of a 3 mM sample of the natural chlorotoxin at pH 3.2 (not corrected for isotope effects) dissolved successively in 95% H<sub>2</sub>O/5% D<sub>2</sub>O, including a DQF-COSY spectrum (Braunschweiler *et al.*, 1983), a TOCSY spectrum with a spin-locking time of 60 ms (Bax & Davis, 1985), and a NOESY spectrum in H<sub>2</sub>O (Jeener *et al.*, 1979) with a mixing time of 200 ms. Water suppression was achieved by presaturation, and the SCUBA method for recovery of saturated H <sub>$\alpha$</sub>  resonances was used for the homonuclear spectra (Brown *et al.*, 1988). Quadrature detection in  $F_1$  and suppression of axial peaks were achieved according to the TPPI—States method (Marion *et al.*, 1989). The spectra were typically acquired with 2048 points in  $F_2$  (4096 for the DQF-COSY) and 512 complex points in  $F_1$ . Zero-filling was applied to obtain a number of points equal to the next power of two. After lyophilization, the sample was dissolved in D<sub>2</sub>O and brought immediately in the preshimmed spectrometer at 36 °C. Amide protons exhibiting low rates of exchange with the solvent were identified by a series of short (2 h) TOCSY spectra. Amide protons still giving rise to intraresidual H <sub>$\alpha$</sub> —NH cross-peaks 24 h after dissolution of the sample were considered to be slowly exchangeable. A series of NOESY spectra with mixing times of 50, 100, 150, and 200 ms were then taken at the same temperature, and the coupling constants  $J_{\alpha\beta}$  were measured using a E.COSY experiment (Griesinger *et al.*, 1985). These coupling constants, together with the classification of the intraresidual  $\alpha$ — $\beta$  and  $\beta$ —NH cross-peaks as strong or weak, allowed us to attribute stereospecifically a majority of the methylene protons (see Results).

Data were processed using the Varian software on a SUN Sparc 2 or the program SNARF (F. H. J. van Hoesel, University of Groningen, The Netherlands) on a Silicon Graphics Indigo R3000 workstation. A routine was incorporated into the latter program, performing automatically (1) the volume integration of the cross-peak, (2) a baseline correction where we subtract from this volume integral the area of a rectangle around the cross-peak considered times

the average spectral value over its borders, and (3) calibration of the distance. This last step used the average volume of the cross-peaks between seven methylene proton pairs of the cysteine residues (excluding Cys5; see further) as a yard stick. The same routine also gave a calibration with respect to peak height, and the consistency between the results using volumes and heights was used to monitor the line width and thus the  $T_2$  value of the resonances concerned, in order to evaluate an eventual influence of the mobility on the distances obtained.

The final set of restraints (removing trivial constraints such as the methylene proton distances) consisted of 311 distance constraints, consisting of 156 intraresidue constraints and 155 interresidue constraints; of these latter, 91 were sequential constraints and 64 nonsequential constraints. This last group contained 49 contacts between protons that are three or more residues apart and 35 contacts between protons that are five or more residues apart. The distances were classified into three classes, corresponding to distance ranges of [1.5 $\text{\AA}$ , 2.8 $\text{\AA}$ ] (strong), [1.5 $\text{\AA}$ , 3.5 $\text{\AA}$ ] (medium), and [1.5 $\text{\AA}$ , 4.5 $\text{\AA}$ ] (weak). The accurate distance estimations obtained by comparison of the buildup curves to the averaged one over seven methylene protons were initially not used in the calculations but were used to verify *a posteriori* the quality of the results. The slow exchange of amide protons was introduced as a short distance between the amide proton and the oxygen atom implicated in the hydrogen bond, based on the hypothesis that slow amide exchange is due to a protection of the proton in a hydrogen bond. A total of eight distances (involving 16 residues) was introduced. In addition to the distance constraints, we introduced 14  $\chi_1$  angle restraints for the orientation of the side chains.

**Structure Calculations.** All structures were generated with the X-PLOR program (Brünger, 1992). We first used the *sub-embed* algorithm, where we extended the subembedded set to the  $\delta$  and  $\epsilon$  carbons (because some important constraints concerned the methyl groups of Met12 and Leu34). The covalent constraints concerning the disulfide bridges were at this stage eliminated and were reintroduced as fake NOE distances. NOE constraint terms were calculated using a split harmonic energy term with a force constant of 50 kcal/(mol  $\text{\AA}^2$ ). After the subembedding, we performed a simulated annealing step on every structure, consisting of a thousand steps at 2000 K followed by a cooling down during another 1000 steps to room temperature. The final structures were imported into the Brugel software package (Delhaise *et al.*, 1985) and further subjected to a nonconstrained steepest descent refinement of 200 steps using the CHARMM force field version 19. The conformational energies improved considerably during this refinement, even though the structures hardly moved at all (RMS values of less than 0.2  $\text{\AA}$ ). We performed a final check to verify whether the refinement without the NOE constraints had not introduced new NOE constraint violations and found this was not the case. Therefore, we used this final set of structures for evaluation of the different energetic contributions and for the structural comparisons.

Visual analysis and comparison with the structures of charybdotoxin and leiurototoxin I were done with the INSIGHT II module of the BIOSYM package (BIOSYM Technologies, San Diego, CA) running on an Indigo R3000 Silicon Graphics workstation.

**Electrostatic Potential Calculations.** The electrostatic potential surfaces around chlorotoxin and charybdotoxin were calculated by the DELPHI program (Gilson & Honig, 1988) that solves the linearized Poisson–Boltzmann equation at the nodes of a cubic lattice. The parameters used were 65 nodes by dimension of the cube, successively 30%, 50%, 75%, and 90% for the occupancy of the cube volume by the protein, 2 for the dielectric constant of the protein, 78.6 for the dielectric constant of the solvent, 0.2 M for the ionic strength, 2 Å for the exclusion radius of ions, and 1.4 Å for the exclusion radius of the solvent. The calculated electrostatic potential surfaces were displayed and graphically analysed using the BRUGEL software (Delhaise *et al.*, 1985).

## RESULTS

**<sup>1</sup>H NMR Assignments.** Sequence-specific assignment of the resonances of chlorotoxin was accomplished according to the method described by Wüthrich (1986). The six long basic side chains (three Arg and three Lys) could easily be recognized by their TOCSY lines from the N<sup>ε</sup>H or C<sup>ε</sup>H to the C<sup>α</sup>H and by the reverse transfer pathway from the NH proton to the N<sup>ε</sup>H or C<sup>ε</sup>H. The Thr7, Thr8, Ala13, and Leu34 residues were also easily distinguishable because they are the only residues containing a methyl group. The eight Cys residues are characterized by well-separated resonance frequencies of their amide proton resonances, so no problems of overlap were encountered. The two Pro residues were identified by the TOCSY lines starting from their C<sup>β</sup>H protons around 3.7 ppm to their C<sup>α</sup>H proton, and a sequence specific assignment could be made by the NOE contact from their α proton to the NH proton from the following residue and from their δ protons to the α proton of the preceding residue. The first Met residue was assigned on the basis of the intense NOE cross-peaks from both its α and β protons toward the NH protons of the Cys2 residue and by a subsequent verification of the spin system in the DQF-COSY spectrum in D<sub>2</sub>O. Similarly, the Met3 residue was assigned by the NOE cross-peaks from its α proton toward the Pro4 δ protons, but the NH of the same residue was not detectable at 36 °C, probably because at this low pH (pH = 2.55) and elevated temperature it is exchanging rapidly with the protons of water. A spectrum at 10 °C confirmed this hypothesis, because we found a broadened TOCSY cross-peak from a NH proton resonating at 7.6 ppm toward the earlier found α-proton position at 4.9 ppm. The protons belonging to the aromatic side chains of Phe6 and Tyr29 were assigned by the characteristic NOE cross-peaks between their β protons and their δ protons, where the latter resonate typically around 6.5–7 ppm. For the Phe6, however, all aromatic protons cluster around 7.31 ppm, so we could not distinguish between δ, ε, or ζ protons. In Table 1, we give all resonance frequencies at 36 °C.

While performing a comparison with a sample of chlorotoxin obtained by chemical synthesis (J. Najib, to be published) a remarkable pH dependence was found for the amide proton resonances of the glycine residues at positions 24 and 26; whereas most resonances hardly change with pH, the resonances of the amide protons of these two glycines change by as much as 0.7 ppm when the pH is varied from 2.5 to 4.7. This dependence may be explained by the fact that the two NH protons in question point toward the two aspartic acids Asp17 and Asp 18 on the helix. The only other significant variations observed were for the amide

Table 1: Chemical Shifts Measured for Chlorotoxin at pH 2.55 and 36 °C<sup>a</sup>

residue	NH	C <sup>α</sup> H	C <sup>β</sup> H	others
Met1		4.16	2.18	γ 2.40/2.12
Cys2	9.14	4.44	3.17/2.82	
Met3	7.60*	4.89	2.41/2.27	γ 2.55/2.33
Pro4		4.80	2.13/1.19	γ 2.05/1.96, δ 3.82/3.62
Cys5	7.51	5.02	3.71/2.85	
Phe6	8.31	4.86	3.21/2.91	δ 7.31, ε 7.31, ζ 7.31
Thr7	8.50	4.20	4.25	CH <sub>3</sub> 1.25
Thr8	7.47	4.17	4.38	CH <sub>3</sub> 1.20
Asp9	7.41	4.70	3.24/2.72	
His10	9.18	4.59	3.42/3.30	
Gln11	8.76	4.59	2.40/1.92	γ <sub>12</sub> 2.35
Met12	7.53	4.22	2.52/2.22	γ 2.97/2.34
Ala13	8.54	3.95	CH <sub>3</sub> 1.40	
Arg14	7.83	4.17	1.91	γ <sub>12</sub> 1.67, δ <sub>12</sub> 3.22, N <sup>ε</sup> H 7.28
Lys15	8.22	4.05	1.90/1.76	γ <sub>12</sub> 1.43/δ <sub>12</sub> 1.64/ε <sub>12</sub> 2.93/ N <sup>ε</sup> H <sub>3</sub> <sup>+</sup> 7.79
Cys16	8.51	4.22	2.97/2.79	
Asp17	7.85	4.20	2.93/2.77	
Asp18	8.55	4.24	2.92/2.86	
Cys19	8.23	4.11	3.77/3.35	
Cys20	7.52	4.61	3.14/2.52	
Gly21	7.81	4.39/3.81		
Gly22	8.34	4.32/3.71		
Lys23	8.26	4.00	1.76	γ 1.44/1.35, δ <sub>12</sub> 1.67/ε <sub>12</sub> 2.97/ N <sup>ε</sup> H <sub>3</sub> <sup>+</sup> 7.50
Gly24	8.61	4.06/3.98		
Arg25	7.76	4.20	1.94/1.70	γ <sub>12</sub> 1.39, δ <sub>12</sub> 3.02, N <sup>ε</sup> H 7.11
Gly26	8.48	5.18/3.55		
Lys27	8.52	4.37	1.64	γ 1.15/0.95, δ 1.52/1.46, ε <sub>12</sub> 2.72/ N <sup>ε</sup> H <sub>3</sub> <sup>+</sup> 7.18
Cys28	8.68	5.15	2.95/2.87	
Tyr29	9.40	4.57	2.98/2.89	δ 7.21, ε 6.81
Gly30	8.70	4.22/3.50		
Pro31		4.88	2.24/2.21	γ 2.10/1.83, δ 4.00/3.76
Gln32	7.68	4.78	2.18/1.89	γ 2.33
Cys33	8.49	4.96	3.12/2.93	
Leu34	9.05	5.04	1.92/1.45	γ 1.70, δ <sub>1</sub> CH <sub>3</sub> 0.86, δ <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> 0.67
Cys35	8.87	5.63	3.46/2.69	
Arg36	8.67	4.36	1.87/1.78	γ <sub>12</sub> 1.63, δ <sub>12</sub> 3.18, N <sup>ε</sup> H 7.05

<sup>a</sup> All resonance frequencies are given with respect to (trimethylsilyl)propionate. In the case of stereospecific assignments, the frequency of the β<sub>1</sub> proton is indicated in *italic*. The resonance indicated by an asterisk corresponds to the frequency at 10 °C because it was not visible at 36 °C.

protons of His10 and Gln11, but in this case the variation was limited to 0.1 ppm.

**Secondary Structure.** The details of the secondary structure were determined from the NMR data summarized in Figure 2. The pattern of  $d_{NN}$ ,  $d_{\alpha N}(i,i+3)$  and  $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$  indicates clearly an α-helix from residues 11 to 21 and the presence of four contacts,  $\alpha N(i,i+4)$ , in the NOE spectrum at 10 °C confirmed this hypothesis.

The pattern of consecutive  $\alpha N(i,i+1)$  contacts in the residue 26–29 and 32–36 parts of the molecule together with the long-range NOE's connecting the α protons of residues 26–35 and 28–33 are consistent with a β hairpin having a β turn centered around the residues 30–31. A further indication of the presence of this β hairpin is provided by the slow exchange rate of all amide protons that point to the interior of the hairpin.

The amide proton of Cys33 is also well protected although it points outward from the above mentioned hairpin. This, however, can be explained by the spatial proximity of an additional small β strand formed by the first four residues. The presence of a β strand spanning residues 1–4 is confirmed by the observation of a strong contact between the α proton of Met1 and the amide proton of Cys2 and between the α proton of Met3 and the δ protons of Pro4.



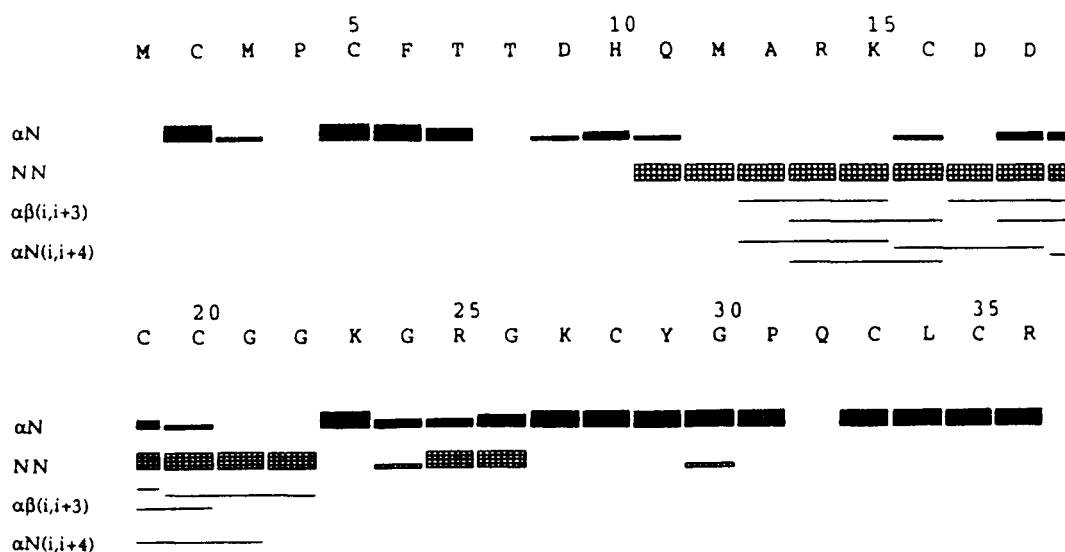


FIGURE 2: Summary of sequential and medium-range NOE's, characteristic for  $\beta$ -sheet and  $\alpha$ -helix.

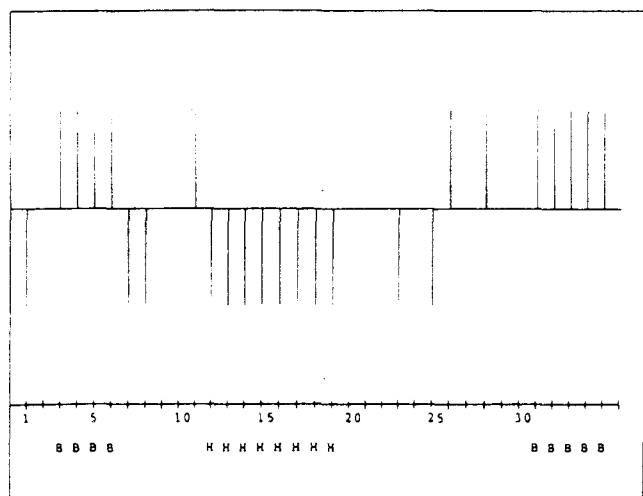


FIGURE 3: Assignment of secondary structure of chlorotoxin, as determined by the chemical shift index method. The observed  $C_{\alpha}H$  chemical shifts are compared with the random coil values given by Wüthrich (1986). A 1, a 0, or a -1 value shows respectively that the backbone  $\alpha$ -proton chemical shift of a given residue is above, within, or below the range given by Wishart *et al.* (1992). An  $\alpha$ -helix (H) is recognized as a dense group of four or more 1's and a  $\beta$ -sheet (B) as a dense group of 4 or more -1's.

The method described recently by Wishart *et al.* (1992) uses the deviation of the chemical shifts of the  $\alpha$  protons from their random coil values as an indication of the secondary structure. In Figure 3, representing graphically these deviations, the first  $\beta$  strand, the  $\alpha$  helix, and the C-terminal strand of the  $\beta$  hairpin can be readily recognized. The chemical shift deviations from the random coil values do not attribute clearly the  $\beta$  strand between residues Gly26 and Tyr29.

**Disulfide Pattern Determination.** First we tried to establish the connectivity pattern among cysteine residues in chlorotoxin by enzymatic methods, which had proved to be successful in the cases of charybdotoxin and PO<sub>5</sub>. However, in our case, we were not immediately able to obtain a good proteolytic cleavage and to isolate useful fragments. The failure of this method did not completely surprise us, as it had also been encountered in scyllatoxin, iberiotoxin, and the ragweed allergen Amb t V (unpublished results of our laboratory for scyllatoxin; Johnson & Sug, 1992; Metzler *et al.*, 1992).

We therefore attempted to use the NMR data to assign the disulfide pairs, basing our analysis on a recent study (Klaus *et al.*, 1993) which investigated the predictive value of different proton-proton distances for the presence of a disulfide bond. From an analysis of a large number of protein structures deposited in the Brookhaven Protein Data Bank, it was found that in more than 88% of the cases, a distance shorter than 5 Å between the  $\beta$  protons of the two cysteine residues under investigation is indicative of the presence of a disulfide bond between them, and this percentage increases to 95% when the  $\beta$ - $\beta$  proton distance is shorter than 4 Å. Moreover, if the  $\beta$ - $\beta$  distance shorter than 5 Å is combined with a short  $\alpha$ - $\beta$  distance (<5 Å) between protons of the two cysteine residues involved, this percentage increases to 96%.

We show in Figure 4a the aliphatic region corresponding to the  $\beta$ -proton resonances of chlorotoxin. A contact qualified as "medium" can be seen between two  $\beta$  protons from residues Cys20 and Cys35 corresponding most probably to a distance shorter than 4 Å for both protons. This distance limit was subsequently confirmed by the buildup curve of this peak for four different mixing times (50, 100, 150, and 200 ms). Calibration with respect to the average buildup of seven geminal proton pairs (see Methods) yielded a distance of 3.6 Å for this contact. In the region characteristic for the  $\alpha$ - $\beta$  contacts (Figure 4b), we observe next to the many intraresidue contacts, the corresponding interresidue contact between Cys<sup>35</sup>  $\alpha$  and Cys<sup>20</sup>  $\beta$ , corresponding to a short distance of 3.4 Å after calibration. These two contacts confirm to a high degree of certainty the presence of a disulfide bridge between cysteines 20 and 35. A larger degree of uncertainty remains for the other disulfide bridges. We observed clear contacts between the  $\alpha$  proton of Cys16 and both  $\beta$  protons of Cys19; however, no  $\beta$ - $\beta$  contacts were observed between both residues, and we did find an  $\alpha N$  contact. These data indicate that the aforementioned contacts are the  $\alpha(i)$ - $\beta(i+3)$  contacts characteristic for an  $\alpha$ -helical structure rather than an indication of a disulfide bridge between both residues.

In order to resolve the ambiguities over the assignment of the disulfide bridges, we generated structures with all possible disulfide bridges. This brute-force method has been applied earlier (Heitz *et al.*, 1989; Metzler *et al.*, 1992) and

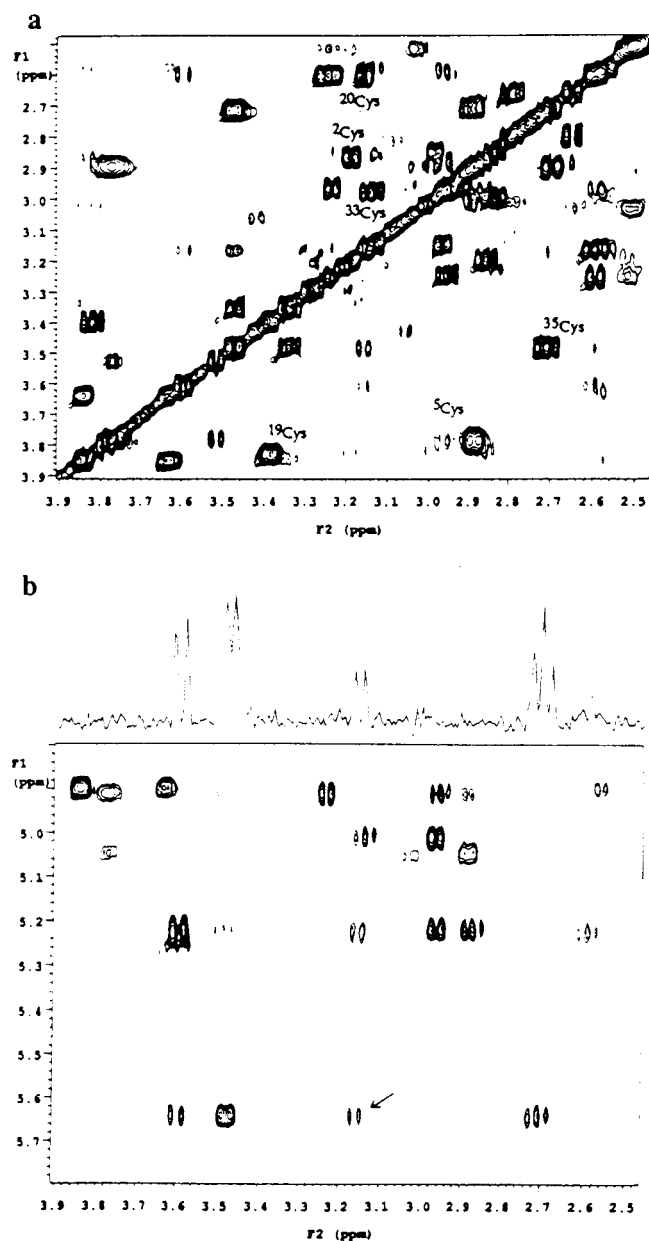


FIGURE 4: (a) Aliphatic region showing the  $\beta$ -proton resonances of a 200 ms NOESY spectrum of chlorotoxin (temperature = 36 °C, pH = 2.55). Indicated are the contacts between the geminal protons of the different cysteine residues (with an increased line width for the Cys5  $\beta_1$ - $\beta_2$  contact) and the NOE contact between the  $\beta$  protons of Cys20 and Cys35 (arrow). (b) Region of the same spectrum as in (a) connecting the  $\alpha$  and  $\beta$  protons of chlorotoxin. The trace is taken at the chemical shift of Cys35  $\alpha$ H, and the cross peak toward the  $\beta_2$  proton of Cys20 at 3.14 ppm is indicated by an arrow.

allows one to look for those disulfide pairing that are compatible with *all* distance constraints, rather than only those concerning protons on the cysteine residues. Even though the method is conceptually straightforward, the most important drawback is the computational cost (see Methods). For a protein with eight disulfides, the number of possible combinations is 105, and the generation of 10 structures for each of them did require a full week of CPU time on a Silicon Grapics R3000 machine. The outcome of these calculations yielded a surprisingly large number of structures with no NOE violations larger than 1 Å (40 out of 105), but the majority of them had unacceptably large values of van der Waals and NOE constraint energies. When placing a

Table 2: Energetic Statistics of the Seven Final Structures after a Nonconstrained Steepest Descent Minimization with the CHARMM Force Field Using the BRUGEL Package<sup>a</sup>

av energies	kcal/mol
total	12.8 ± 8
van der Waals	-163 ± 6
NOE constraints	10.1 ± 1.5
electrostatic	33.6 ± 4.4
bonds	6.2 ± 0.4
bond angles	25.5 ± 1.9
torsions	116.8 ± 11.8
planar + tetragonal	3.5 ± 0.6

<sup>a</sup> Delhaise et al., 1985. NOE constraint terms were calculated using a split harmonic energy term with a force constant of 50 kcal/(mol Å<sup>2</sup>).

cutoff of 0.3 Å on the NOE violations and 70 kcal/mol for the total energy after the X-PLOR refinement step, only the above mentioned disulfide pairing lead to two accepted structures (out of ten). Although this again confirms the proposed disulfide bridge pattern, the low overall yield of accepted structures suggests that one should generate more structures per permutation when trying to obtain the correct pattern solely by this brute-force method.

In conclusion, the presence of the Cys20-Cys35 disulfide bridge as verified by the NMR data, the identity of the secondary structure elements and their relative ordering between chlorotoxin and charybdotoxin, and more generally, the evident alignment of the primary structures of both molecules indicate that the cysteine pairing in chlorotoxin (and probably also in homologous toxin I<sub>5</sub>A) does follow the common motif, with covalent links between Cys16-Cys33, Cys5-Cys28, and Cys20-Cys35. The two additional cysteines Cys2 and Cys19 in chlorotoxin are linked together by a disulfide bridge, which cross-links the N-terminal strand of the  $\beta$ -sheet to the  $\alpha$ -helix.

**Structure Calculation by Distance Geometry and Simulated Annealing.** A total of 100 structures with the above described disulfide pairing was generated with the program X-PLOR. Of the 100 structures, 45 had no violations larger than 1 Å, 28 passed the test with no violations larger than 0.5 Å, and 16 with an upper limit of 0.3 Å for the violations. Considering the relative success of the structure generation, we decided to use the 0.3 Å as cutoff. A last selection, however, was based on an energetic criterium: of the 16 structures, 7 had a total potential energy of less than 70 kcal/mol, whereas the other ones had energies ranging from 75 up to 118 kcal/mol. Because the major contribution of the high total energies came predominantly from the van der Waals and NOE terms (despite the absence of any distance violation larger than 0.3 Å, the latter structures accumulated a large number of distance violations between 0.15 and 0.3 Å), and because visual inspection of those structures indicated that they were not substantially different from the 7 lower-energy structures, we decided to limit our structural analysis to the 7 structures that displayed no NOE violation larger than 0.3 Å and had a total potential energy below 70 kcal/mol. In order to evaluate their conformational energies using a full force field, we introduced them into the BRUGEL package (Delhaise *et al.*, 1985) and subjected them to 200 steps of steepest descent reminimization in absence of NOE constraints. The structures hardly changed, but their energies did improve considerably. In Table 2, we summarize the conformation energies as averaged over the 7 structures. The

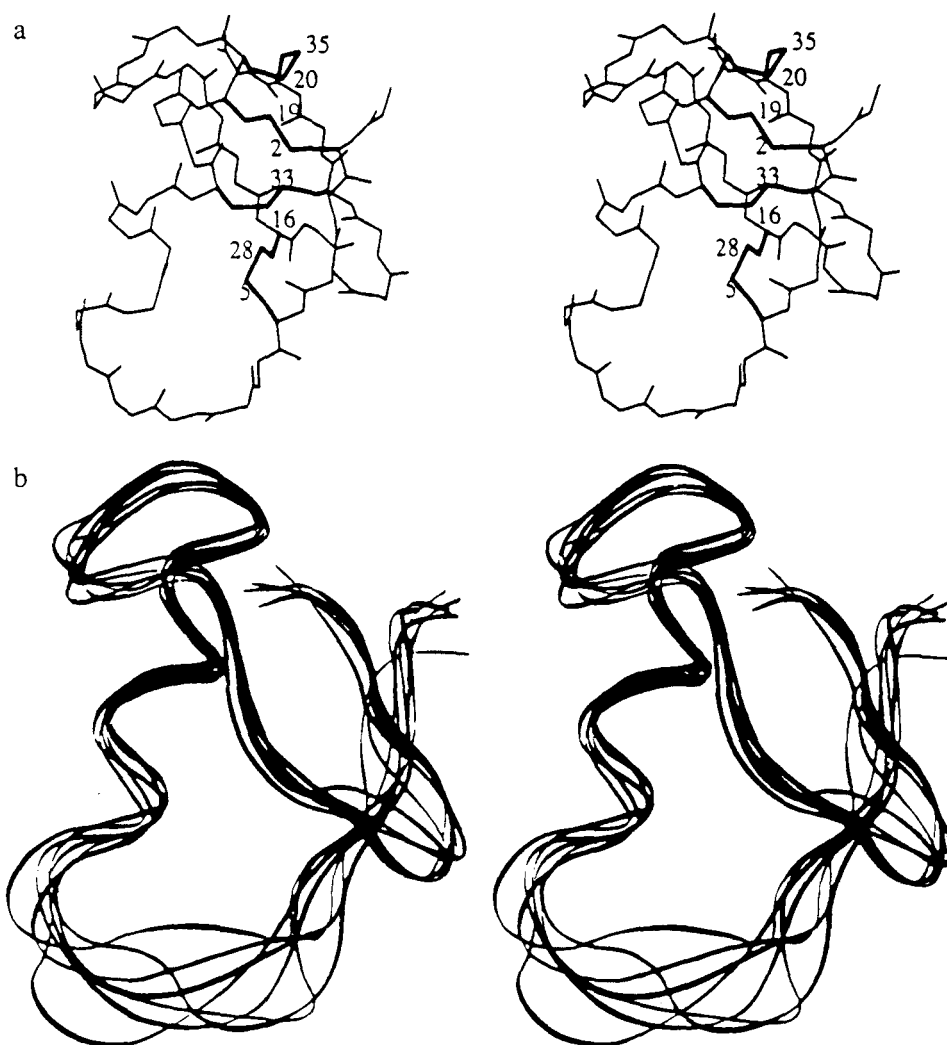


FIGURE 5: (a) Stereoview of the structure of chlorotoxin. The eight cysteine residues are shown in bold. (b) Superposition of the best seven chlorotoxin molecular structures. A ribbon has been drawn through every structure of the final set (see text).

27 accurate distance limits determined by integration of the cross-peaks and calibration with respect to the averaged integrated values over 7 geminal  $\beta$  protons (see Methods) were used to verify the final structures; when admitting deviations of 0.3 Å of those distances, no violations were observed for the seven final structures.

**Analysis of the Final Structures.** In Figure 5a, we show one individual structure of chlorotoxin, indicating the four disulfide pairs in bold. Figure 5b shows a superposition of the backbones of the 7 best structures after distance geometry and simulated annealing and using all backbone atoms for the superposition. The RMSD for all backbone atoms is 1.07 Å. It increases to 1.8 Å when all non-hydrogen atoms are included in the RMSD calculation. The different secondary structure elements are particularly well-defined: we measured backbone RMSD values of 0.7 Å for the  $\alpha$ -helix, 0.86 Å for the C-terminal  $\beta$ -sheet (from residues 26 to 36), and 1.0 Å for the short N-terminal  $\beta$ -strand (residues 1 to 4). The turn linking this first  $\beta$ -strand to the  $\alpha$ -helix is however less well-defined, with a backbone RMSD value of 2.0 Å. This last feature was not completely unexpected, as the number of NOE constraints in this region was smaller than in the regular secondary structure elements. Moreover, the line width of the  $\beta$  resonances of the Cys5 residue was a factor of 2.5 larger than that of the  $\beta$  resonances of the other cysteine residues (Figure 4a). This is probably due to

exchange broadening, resulting from an increased mobility of the loop defined by residues 4 to 10.

## DISCUSSION

**(a) Structure.** The secondary structure of chlorotoxin agrees well with those observed in the known 3D structures of the other short toxins: we find the characteristic fold where an  $\alpha$ -helix is packed against a small  $\beta$ -sheet and is cross-linked to it by three disulfide bonds (Figure 5a,b). However, when overlaying the structures of chlorotoxin and the other members of the short toxin family, some interesting differences were observed. In Figure 6, we show the structures of chlorotoxin and charybdotoxin (Bontems *et al.*, 1991), where the three common disulfide bridges and the C-terminal  $\beta$ -sheet are superimposed. A first remarkable difference is found at the level of the  $\alpha$ -helix: whereas the central part of the helix with the characteristic C-X-X-X-C motif is highly conserved between both molecules, the helix in chlorotoxin is shifted by one turn toward the N-terminus. This shift is already clear from the primary structure comparison (Figure 1b): the optimal alignment between chlorotoxin and charybdotoxin or iberitoxin contains four deletions in the latter sequences, positioned before the central cysteines in the helix.

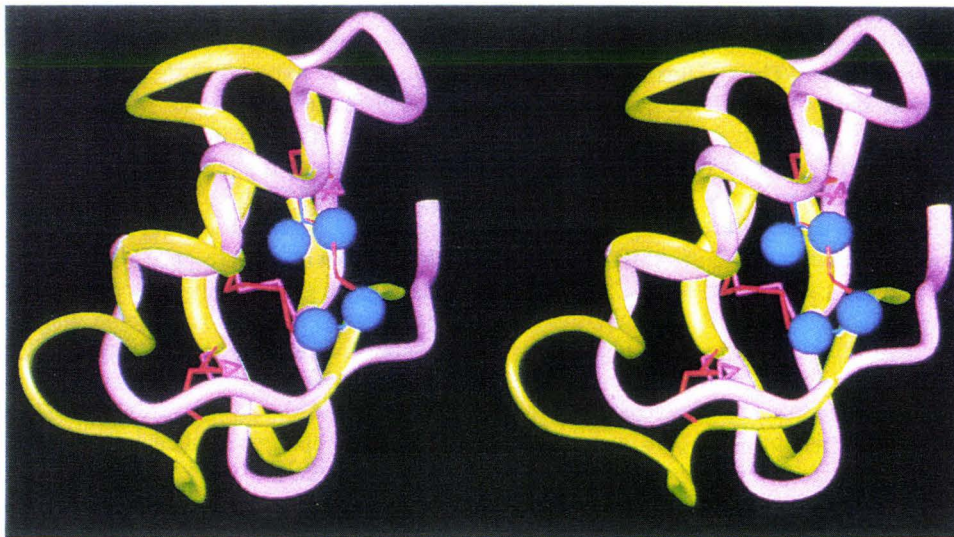


FIGURE 6: Superposition of the structures of chlorotoxin (yellow) and charybdotoxin (pink) (Bontems *et al.*, 1991), where the C-terminal  $\beta$ -sheet and the three disulfide bridges in common are superimposed. The disulfide bridges of chlorotoxin are shown in red and those of charybdotoxin in magenta. The two valines of charybdotoxin replacing the Cys2–Cys19 bridge in chlorotoxin are shown as full blue spheres (CPK representation).

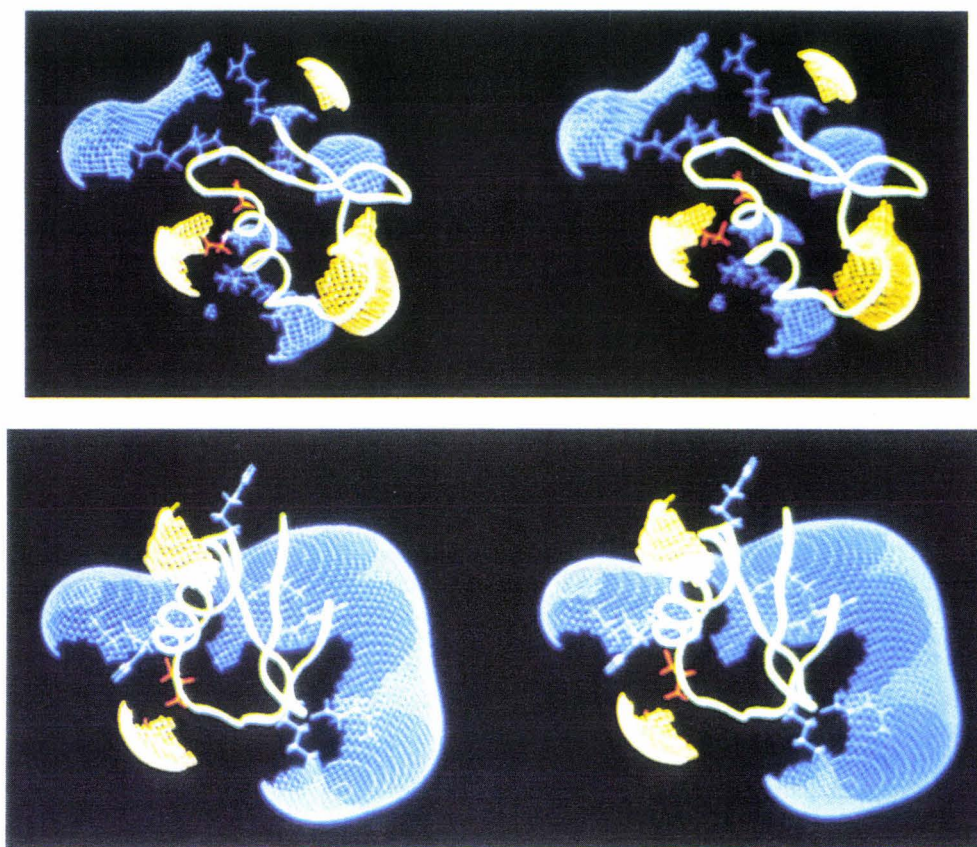


FIGURE 7: Electrostatic surface of chlorotoxin (a, top) and charybdotoxin (b, bottom) as calculated by the program DELPHI. Different color codes are  $-2 kT/e$  (red),  $-1 kT/e$  (yellow), and  $1.5 kT/e$  (blue) (where  $k$  is the Boltzmann constant,  $T$  is the temperature in kelvin, and  $e$  is the charge of the electron. With  $T$  set to 298 K,  $kT/e$  amounts to 25.6 mV or 0.6 kcal/mol of electrons). Positively charged residues are shown in blue and negatively charged in red.

The different extensions of the central part of the helix have their influence on the two turns connecting the helix with the N- and C-terminal  $\beta$ -strands. The N-terminal  $\beta\alpha$  turn of chlorotoxin is wider than that of charybdotoxin and is simultaneously characterized by a larger mobility (*vide supra*).

The  $\alpha\beta$  turn connecting the  $\alpha$ -helix with the C-terminal  $\beta$ -strand adopts a completely different orientation in both molecules. In charybdotoxin, the turn is oriented toward the

N-terminal  $\beta$ -strand. This orientation is not fortuitous but serves to bring the hydrophobic residues of the turn (Leu20, His21, and Thr23) in close contact with the first N-terminal residue of charybdotoxin. In this manner, those residues form a hydrophobic cluster linking the first  $\beta$ -strand to the rest of the molecule (Bontems, 1992). This Leu together with the aromatic nature of the following residue is strictly conserved between charybdotoxin, iberiotoxin, and noxiustoxin, and the orientation of the turn is identical in all of

them. The primary structures of leiurotoxin and PO5 deviate slightly from this pattern, because of the replacement of two residues in the turn by one Gly. The  $\alpha\beta$  turn is shortened due to this modification but is still oriented in the same direction as in charybdotoxin. The hydrophobic cluster in these molecules is not formed by the residues of the (lacking) first  $\beta$ -strand but by three Leu residues in the turn itself (Martins, 1993). Chlorotoxin and its direct analogues (Figure 1a), however, deviate substantially from this common pattern: the turn is formed by a triple (or double) repeat of the dipeptide Gly-Arg(Lys), representing thereby a positively charged rather than a hydrophobic cluster.

The different orientation of the  $\alpha\beta$  turn leads to a loss of hydrophobic contacts compared to charybdotoxin, but the first  $\beta$ -strand in chlorotoxin is linked to the rest of the molecule by the fourth disulfide bridge between Cys2 and Cys19. This fact is illustrated even more clearly when we compare the cysteines with their corresponding side chains in charybdotoxin, i.e., Val5 and Val16. In Figure 6, we show both valines as full spheres (CPK representation), and one can see that they occupy exactly the same space as the fourth disulfide bridge in chlorotoxin. This also fits well with the lack of the first two residues in chlorotoxin: in charybdotoxin, they are necessary from a structural point of view as they allow the hydrophobic contact with the  $\alpha\beta$  turn. In chlorotoxin, however, these structural requirements seem to be fulfilled by the extra cysteine bridge.

(b) *Structure-Function Relationships.* It has been shown in several cases that electrostatic effects are of uttermost importance for the interaction between the channels and the small basic peptides that are the scorpion toxins (Meunier *et al.*, 1993). The calculated electrostatic potential surface around the PO5 molecule was found to be highly asymmetric. In this molecule, three arginine residues, all located on the solvent-exposed side of the helix which is believed to interact with the receptor, form a positively charged potential surface centered around the neutral polar group of Gln9. The influence of the electrostatic contribution to the charybdotoxin specificity was investigated by a site-directed mutagenesis study, where each of the positively charged groups was replaced by a glutamine, and the resulting changes in the toxin's association-dissociation kinetics with single  $K^+$  channels were examined (Park & Miller, 1992). As a first step in investigating the possible role of electrostatics for the chlorotoxin function, we calculated its electrostatic potential and compared it with the results of identical calculations on the charybdotoxin structure.

The electrostatic surfaces for both molecules as calculated by the program DELPHI are shown in Figure 7. Their inspection allows to rationalize the results from the site-directed mutagenesis experiments on charybdotoxin: around the three critical residues Arg25, Lys27, and Arg34, we see a positively charged surface that forms half a torus around the central part of the C-terminal  $\beta$ -sheet. In the case of chlorotoxin, this positive surface has almost completely disappeared, even though the first two positive residues (Arg25 and Lys 27) are strictly conserved. However, their effect seems to be attenuated by the presence of two negatively charged aspartic acid residues on the  $\alpha$ -helix. The third positively charged residue (Arg34) of charybdotoxin is replaced by a hydrophobic leucine in chlorotoxin, and this leucine is conserved over all its direct analogues (Figure 1a). It is also at the position of this residue that we find a glutamic

acid in the case of leiurotoxin and PO5, with consequently a shift of the positively charged surface from the C-terminal  $\beta$ -sheet side exposed to the solvent to the solvent-exposed side of the helix (Meunier *et al.*, 1993).

As discussed above, chlorotoxin and charybdotoxin differ significantly in the region of the  $\alpha\beta$  turn. This has also its consequences on the electrostatic properties in this zone: whereas it forms a neutral to slightly negative zone in charybdotoxin, the presence of the three positive residues in chlorotoxin gives rise to a positive "cap" of the molecule that extends over a considerable distance into the solvent. Although we have no direct data of site-directed mutagenesis affecting those residues, this clustering of positively charged residues and the strong positive field they produce might well have important implications on the functional properties of this molecule.

## ACKNOWLEDGMENT

We thank LATOXAN, France, for their generous gift of the scorpion venom and Dr. Bontems and Dr. Martins for providing us with a copy of their Ph.D. thesis. Prof. F. Borremans provided us generously with the coordinates of leiurotoxin. We thank D. Horvath for generating the permutations of the cysteine patterns, C. Cerf for help with the DELPHI program, Dr. M. Froeyen for providing his routine of visualization of electrostatic potential surfaces, and A. Waeghe for the photography.

## REFERENCES

- Arseniev, A. S., Kondakov, V. I., Maiorov, V. N., Volkova, T. M., Grishin, E. V., Bystrov, V. F., & Ovchinnikov, Y. A. (1983) *Bioorg. Khim. (USSR)* 9, 768.
- Arseniev, A. S., Kondakov, K. I., Maiorov, V. N., & Bystrov, V. F. (1984) *FEBS Lett.* 165, 57-62.
- Auguste, P., Hugues, M., Gravé, B., Gesquière, J. C., Maes, P., Tartar, A., Romey, G., Schweitz, H., & Lazdunski, M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 4753-4759.
- Bax, A., & Davis, D. (1985) *J. Magn. Reson.* 65, 355-360.
- Betz, H. (1990) *Biochemistry* 29, 3591-3599.
- Bontems, F. (1992) Ph.D. Thesis, University of Paris Sud, Centre d'Orsay, France.
- Bontems, F., Roumestand, C., Boyot, P., Gilquin, B., Doljanski, Y., Ménez, A., & Toma, F. (1991a) *Eur. J. Biochem.* 196, 19-28.
- Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Ménez, A., & Toma, F. (1991b) *Science* 254, 1521-1523.
- Braunschweiler, L., Bodenhausen, G., & Ernst, R. R. (1983) *Mol. Phys.* 48, 535-560.
- Brown, S. C., Weber, P. L., & Mueller, L. (1988) *J. Magn. Reson.* 77, 166-169.
- Brünger, A. T. (1992) *X-PLOR Version 3.1 Manual*, Yale University, New Haven, CT.
- Cook, N. S., & Quast, U. (1990) in *Potassium channels*, Chapter 8, pp 181-255, Ellis Horwood Limited, Chichester U.K.
- Crest, M., Jacquet, G., Gola, M., Zerrouck, H., Benslimane, A., Rochat, H., Mansuelle, P., & Martin-Eauclaire, M. F. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 1640.
- Debin, J. A., Maggio, J. E., & Strichartz, G. R. (1993) *Am. J. Physiol. Soc.* 264, C369.
- Delhaise, P., Van Belle, D., Bardiaux, M., Alard, P., Hamers, P., Van Cutsem, E., & Wodak, S. J. (1985) *J. Mol. Graphics* 3, 116-119.
- Dreyer, F. (1990) *Rev. Physiol., Biochem., Pharmacol.* 115, 93-136.

- Fazal, A., Beg, O. V., Shafgat, J., Zaidi, Z. H., & Jomvall, H. (1989) *FEBS Lett.* 257, 260–262.
- Fontecilla-Camps, J. C., Almasy, R. J., Suddath, F. L., & Bugg, C. E. (1982) *Toxicon* 20, 1–7.
- Galvez, A., Gimenez, G., Reuben, J. P., Ray-Contanain, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G. J., & Garcia, M. L. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 11083.
- Garcia, M. L., Galvez, A., Garcia-Calva, M., King, F., Vasquez, J., & Kaczorowski, G. J. (1991) *J. Bioenerg. Biomembr.* 2, 615–645.
- Gilson & Honig, B. (1988) *Proteins* 4, 7–18.
- Griesinger, C., Sorensen, O. W., & Ernst, R. R. (1985) *J. Am. Chem. Soc.* 107, 6394–6396.
- Grishin, E. V., Soldatov, N. M., Tashmuchamedov, B. A., & Atakuziev, B. U. (1978) *Bioorg. Khim. (USSR)* 4, 450–461.
- Grishin, E. V., Volkova, T. M., & Soldatova, L. N. (1982) *Bioorg. Khim. (USSR)* 8, 155–164.
- Jeener, J., Meyer, P. H., Bachmann, P., & Ernst, R. R., (1979) *J. Chem. Phys.* 71, 4546–4553.
- Johnson, B. A., & Sugg, E. E. (1992) *Biochemistry* 31, 8151–8159.
- Klaus W., Broger, C., Gerber, P. & Senn, H. (1993) *J. Mol. Biol.* 232, 897.
- Lambert, P., Kuroda, H., Chino, N., Watanabe, T. X., Kimura, T., & Sakakibara, S. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170, 684–690.
- Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R., & Bax, A. (1989) *J. Magn. Reson.* 85, 393–399.
- Martins, J. C. (1993) Ph.D. Thesis, University of Ghent, Ghent, Belgium.
- Martins, J. C., Zhang, W., Tartar, A., Lazdunski, M., & Borremans F. A. M. (1990) *FEBS Lett.* 260, 249–253.
- Ménez, A., Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., & Toma, F. (1992) *Proc. R. Soc. Edinburgh* 99B (1/2), 83–103.
- Meunier, S., Bernassau, J.-M., Martin-Eauclaure, M. F., Van Rietschoten, J., Cambillau, C., & Darbon, H. (1993) *Biochemistry* 32, 11969.
- Miller, C., Moczydlowski, E., Lattore, R., & Philips, M. (1985) *Nature* 313, 316–318.
- Moczydlowski, E., Lucchesi, K., & Ravindran, A. (1988) *J. Membr. Biol.* 105, 95–111.
- Nutt, R. F., Arison, B. H. & Smith, J. S. (1992) *Peptides*, 101–102.
- Park, C.-S., & Miller, C. (1992) *Biochemistry* 31, 7749–7755.
- Possani, L. D., Martin, B. M., & Svendsen, I. (1982) *Carlsberg Res. Commun.* 47, 285.
- Rochat, H., Bernard, P., & Courand, F. (1979) in *Neurotoxins: Tools in Neurobiology* (Ceccarelli, B., Ed.) pp 325–334, Raven, New York.
- Sabatier, J.-M., Zerrouk, H., Darbon, H., Mabrouk, K., Benslimane, A., Rochat, H., Martin-Eau-claire, M.-F., & Van Rietschoten, J. (1993) *Biochemistry* 32, 2763–2770.
- Strong, P. N. (1990) *Pharmacol. Ther.* 46, 137–162.
- Veber, D. F., Mikowski, J. D., Varga, S., Denkwalter, R. G., & Hirschmann, R. (1972) *J. Am. Chem. Soc.* 94, 5456–5461.
- Wüthrich, K., (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley and Sons, New York.
- Zlotkin, E., Miranda, F., & Rochat, H. (1978) in *Arthropod Venoms* (Bettini, S., Ed.) pp 317–369, Springer-Verlag, Berlin.

B1941215M

**ROLE OF THE ADDITIONAL DISULFIDE BRIDGE  
IN CHLOROTOXIN, A MEMBER OF THE SHORT  
SCORPION TOXIN FAMILY**

Jamila NAJIB, Céline FRANCCART, Anne-Sophie BIANCI, Jean-Claude GESQUIERE , Pierre SAUTIERE, André TARTAR, Lippens GUY.

*URA 1309 CNRS, Faculté de Pharmacie and Institut Pasteur ,  
1 rue Calmette 59019 Lille France.*

**Abbreviations:**

CITx, chlorotoxin;

s-CITx-OH, synthetic chlorotoxin free acid form;

s-CITx-NH<sub>2</sub>, synthetic chlorotoxin amide form;

n-CITx, natural chlorotoxin;

Boc, t-butyloxycarbonyl;

DIEA, diisopropylethylamine;

DCM, dichloromethane;

TFA, trifluoacetic acid;

HPLC, high performance liquid chromatography;

GSH, reduced glutathione;

GSSG, oxidized glutathione;



**ABSTRACT:** We report the solid phase synthesis of chlorotoxin (ClTx), a 36-amino acid peptide containing four disulfide bridges, and four analogues with only three disulfide bridges. Comparison of the two synthetic peptides s-ClTx-OH and s-ClTx-NH<sub>2</sub> with the natural toxin purified from the venom of the scorpion allowed us to identify the C-terminus as carboxamide. Four analogues, in which a disulfide bond was replaced by two alanine residues were designed. Only the ClTx-Ala2-19 analogue could be oxidized under the same conditions than ClTx indicating a secondary role for the Cys2-Cys19 disulfide bridge in the folding process. The synthetic s-ClTx-NH<sub>2</sub> and the ClTx-Ala2-19 analogue were characterised chemically. These results, as well as the results of a structural study by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy indicated that the synthetic ClTx is indistinguishable from the natural toxin. The ClTx-Ala2-19 analogue contains a similar secondary structure pattern with the three remaining disulfide bonds cross-linking the  $\alpha$ -helix to the  $\beta$ -sheet, following the common pattern found in the other short scorpion toxins. Moreover, the orientation of the  $\alpha$ - $\beta$  turn distinguishing chlorotoxin from charybdotoxin (Lippens et al., 1995), is conserved in the analogue. The elimination of the fourth disulfide bridge disrupts the participation of the N-terminal strand in the  $\beta$ -sheet, and leads to an overall decrease in stability of the peptide.

## INTRODUCTION

Chlorotoxin (ClTx) is a small neurotoxic peptide, belonging to the short chain toxins isolated from the venom of scorpion *Leiurus quinquestriatus*. It is a specific blocker of the small conductance epithelial chloride channels (Debin *et al.*, 1993). Still, the same authors observed an inhibition only when the molecule was applied to the intracellular surface of the channel, and hence concluded that it is unlikely that epithelial Cl<sup>-</sup> channels are the natural target for chlorotoxin. Sequence analysis showed the molecule to be a 36 amino acid peptide, including eight cysteines, which form four disulfide bonds between Cys2 and Cys 19, Cys5 and Cys28, Cys16 and Cys33 and between Cys20 and Cys35. The examination of its primary structure revealed a high level of homology with those of the insectotoxins I5A isolated from *Buthus eupeus* venom (Grishin *et al.*, 1978), peptide I from *Buthus indicus* (Fazal *et al.*, 1989) and AmMP2 from *Androctonus mauretanicus* (Zlotkin *et al.*, 1978; Rochat *et al.*, 1979) (Figure 1a). Despite a lesser degree of sequence homology, chlorotoxin can also be aligned with an other group of short scorpion toxins which contains only 3 disulfide bridges: charybdotoxin (Bontems *et al.*, 1991a), iberiotoxin (Galvez *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1992), scyllatoxin (Martins *et al.*, 1990), PO5 (Meunier *et al.*, 1993), noxiustoxin (Possani *et al.*, 1982) and kaliotoxin (Crest *et al.*, 1992) (Figure 1b). These short toxins inhibit the Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels, and form a family characterized by a typical helix/sheet organisation. The solution structure of chlorotoxin showed the compatibility of the fourth disulfide bridge with this spatial organisation, and electrostatic calculations based on this solution structure attributed the activity of the chlorotoxin to the positively charged region linking the  $\alpha$ -helix to the  $\beta$ -sheet (Lippens *et al.*, 1995).

In order to further investigate the structural and functional role of the fourth disulfide bridge as well as the other ones in the chlorotoxin, we synthesized different analogues where every single disulfide bridge was replaced by two alanines. The first product synthesized was the native toxin sequence. This step allowed us to establish the experimental conditions for synthesis and oxidation of

the polypeptide, and the nature of the C-terminus, and formed the basis for subsequent synthesis of the different analogues.

```

Chlorotoxin      M C M P C F T T D H Q M A R K C D D C C - - - G G K G R G K C Y G P Q C L C R
I5A              M C M P C F T T D P N M A K K C R D C C - - - G G - - N G K C F G P Q C L C N R
Peptide I       R C K P C F T T D P Q M S K K C A D C C - - - G G K G K G K C Y G P Q C L C
AmmP2           C G P C F T T D P Y T E S K C A T C C - - - G G - - R G K C V G P Q C L C N R I

```

a

```

Chlorotoxin      M C M P C F T T D H Q M A R K C D D C C - - - G G K G R G K C Y G P Q C L C R
Charybdotoxin   Z F T N V S C T T S K E - - - - - C S V C Q R L H N T S - R G K C M N K K C R C Y S
Iberitoxin      Z F T D V D C S V S K E - - - - - C S V C K D L F G V D - R G K C M G K K C R C Y Q
Scyllatoxin     A F C N - L R M - - - - - C Q L S C R S L G - - - L L G K C I G D K C E C V K H
PO5             T V C N - L R R - - - - - C Q L S C R S L G - - - L L G K C I G V K C E C V K H
Noxiustoxin     T I I N V K C T S P K Q - - - - - C S K P C K E L Y G S S A G A K C M N G K C K C Y N N
Kaliotoxin      G V E I N V K C S G S P Q - - - - - C L K P C K D A A G M H F - G K C M N H K C H C I P

```

b

**Figure: 1 a)** Sequence alignment of chlorotoxin with those of other small insectotoxins characterized by four disulfide bonds, by matching cysteine residues.

**b)** Sequence alignment of chlorotoxin with those of small scorpion toxins characterized by three disulfide bonds, by matching cysteine residues. The three conserved cysteine bonds are indicated in bold.

## II-MATERIALS AND METHODS

### Materials

N- $\alpha$ -Boc-L-amino acids were purchased from Propeptide (Vert-le-petit, France), Boc-Arg(Tos) phenylacetamidomethyl resin (PAM) and 4-methylbenzhydramine resin (MBHA) were from Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA). Other solvents, reagents and analytical grade products were from Aldrich or Sigma.

### Peptide synthesis

The peptides were synthesised by the solid-phase method (Merrifield, 1986) on an automated peptide synthesizer Model ABI 430 A, (Applied Biosystems Inc.) using Boc/Bzl strategy on a 0.5 mmol of resin: Boc-Arg-PAM resin (0.59 mmol/g) for the chlorotoxin free acid form and MBHA resin (0.77 mmol/g) for the chlorotoxin amide form and the different analogues. Each amino acid was coupled twice in N-methyl-2-pyrrolidinone, by the dicyclohexylcarbodiimide / 1-hydroxybenzotriazole method, followed by a capping step with acetic anhydride of the unreacted amino groups. Side chain protective groups were as follows: tosyl (Tos) for Arg; cyclohexyl (cHex) for Asp; acetamidomethyl (Acm) for Cys; dinitrophenyl (Dnp) for His; 2-chlorobenzyloxycarbonyl (Cl-Z) for Lys; benzyl (Bzl) for Ser and Thr; sulfoxide (O) for Met and 2-bromobenzyloxycarbonyl (Br-Z) for Tyr.

### Deprotection and cleavage

The Dnp group was removed from His10 on the peptidyl-resin, prior to the cleavage of the peptide from its support, by treatment with 20% 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) DIEA / DCM for 2x2 h.

The final amino-terminal Boc group was removed with 50% TFA in DCM for 20 min. The resin was washed with DCM (3x2 min) and the free  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> was generated with 5% (V/V) DIEA / DCM (2x2 min). The peptide was cleaved from

the resin and simultaneously deprotected following the low/high HF protocol (Tam et al., 1983): the resin (1 g) was treated with anhydrous HF (2.5 ml) in the presence of scavengers: p-cresol (0.75 g), p-thiocresol (0.25 g) and dimethylsulfide (6.5 ml) for 3 h at 0 °C. After removal of HF and dimethylsulfide by vacuum evaporation, the residual scavengers and by-products were extracted with cold diethyl ether and the reaction vessel was recharged with p-cresol (0.75 g), p-thiocresol 0.25 g) and 10 ml of anhydrous HF after which the mixture was allowed to react for 90 min at 0°C. After removal of HF, the resin was washed with cold diethyl ether and the peptides were extracted with 5% aqueous acetic acid and lyophilized.

The crude products were analyzed by reverse-phase HPLC (Macherey-Nagel, C18, Nucleosil, 4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ , 100 Å). The crude S-Acm-protected peptides were purified by preparative reverse-phase HPLC on a Vydac 218TP C18 column (20x200 mm, 7  $\mu$ , 300 Å) using a 60 min gradient from 20% to 60% buffer B (0.05% TFA, 60% CH<sub>3</sub>CN in water), at a flow rate of 3 ml/min; the elution was monitored at 280 nm, and the fractions were analyzed by reverse-phase HPLC before pooling and lyophilisation.

#### *Disulfide bond formation and purification*

S-Acm protected peptides were dissolved in 5% acetic acid (10 mg/ml) and treated with mercuric acetate (1.1 eq/Acm) under N<sub>2</sub> (Veber et al., 1972). The solution was stirred at room temperature for 4 h. Mercuric ions were removed by bubbling hydrogen sulfide through the containing peptide solution for 10 min, the pH was then adjusted to 8 by addition of NH<sub>4</sub>OH and the solution was filtered. The filtrate containing the fully deprotected peptide was immediately diluted in water (2.5 10<sup>-5</sup> M final peptide concentration) in the presence of reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG). The ratio of peptide: GSH: GSSG was 1: 60: 6. The oxidation mixture was stirred at room temperature. After 24 h, the pH was adjusted to 2.5 with TFA and the solution was filtered on a Millipore system 0.22 $\mu$  and pumped directly onto a preparative reverse-phase HPLC on a Nucleosil C18

column (10.7x500 mm, 5  $\mu$ , 100 Å). The column was then eluted with buffer B (0.05% TFA, 60% CH<sub>3</sub>CN in water) using a gradient of 0% to 60% buffer B in 90 min, at flow rate of 2 mL/min and the elution was monitored at 280 nm. This followed by purification with preparative HPLC Machery Nagel Nucleosil 5 CN (10x500mm, 5 $\mu$ , 100 Å) using the same eluants and a gradient of 20% to 60% buffer B in 80 min, at flow rate of 2 mL and the detection was performed at 235 nm.

### *Analytical chromatography*

The purified peptides were analysed by microbore reverse-phase HPLC on a Vydac C18 column 201 HS (2 x 200 mm, 5  $\mu$ , 90 Å) using a gradient from 0% to 100% buffer B (0.05% TFA, 60% CH<sub>3</sub>CN in water) at 50 mL / min for 4 h.

### *Capillary electrophoresis*

Peptides were analyzed on an Applied Biosystems Model 270 A Capillary Electrophoresis system in the following conditions: field, 25 kV; current, 28  $\mu$ A; capillary length 50 cm; capillary diameter, 50 $\mu$ m; fused silica. The separation was performed using a buffer solution of 20 mM sodium citrate, at pH 2.5, and a temperature of 30°C. The detection was monitored at 200 nm

### *Mass analysis*

The molecular weight of the synthetic peptides coated on a nitro-cellulose-layered aluminized Mylar foil was determined with a Bio-Ion 20 time of flight Plasma Desorption Mass Spectrometer (PDMS) (Bio-Ion Nordic AB, Uppsala, Sweden) using <sup>252</sup>Californium as a source of fission fragments. The molecular weight was also determined by Ion Electrospray Mass Spectrometry: samples were dissolved in an aqueous solution of 20% CH<sub>3</sub>CN and 0.1% HCOOH (20 pmol/mL) and Ion spray spectra were recorded on a simple-quadrupole mass spectrometer API

(Perkin-Elmer Sciex) equipped with an ion-spray (nebulizer-assisted electrospray) source (Sciex, Toronto, Canada).

### *Amino acid analysis*

The amino acid composition of the purified peptides was analyzed on a Beckman 6300 amino acid analyzer (Beckman Instruments, Fullerton, CA), after hydrolysis with 6N HCl containing 0.25% phenol at 110°C for 24 hours .

### *Carboxypeptidase digestion*

7 nM samples of both synthetic peptides (s-CITx-OH and s-CITx-NH<sub>2</sub>) and of natural chlorotoxin (n-CITx) were dissolved in 0.1 mL of 0.2M ammonium bicarbonate at pH 7.9 and digested for 3h at 40°C with diisopropylfluorophosphate-treated carboxypeptidase B, using an enzyme-to-substrate (w/w) ratio of 1:10. The released amino acids were analyzed on a Beckman 6300 amino acid analyser.

### *NMR spectroscopy*

All NMR experiments were performed at 10°C and 36°C on a Bruker DMX 600 MHz spectrometer. We recorded different homonuclear <sup>1</sup>H spectra on a 1 mM sample of the synthetic chlorotoxin at pH 3.2 (not corrected for isotope effects) dissolved successively in 95% H<sub>2</sub>O / 5% D<sub>2</sub>O, in order to confirm the identity of the synthetic product and the natural chlorotoxin. For the the CITx-Ala2-19 analogue, we disposed only of a submillimolar sample, and the NMR analysis was based on a TOCSY spectrum with a spin-locking time of 60 ms (Bax and Davis, 1985), and a NOESY spectrum in H<sub>2</sub>O (Jeener *et al.*, 1979 ) with a mixing time of 200 ms. Water suppression was achieved by the WATERGATE sequence (Piotto *et al.*, 1992) where the water magnetization was brought back to the z-axis at the beginning of the acquisition time through the use of flip-back pulses

(Lippens et al., 1995). Quadrature detection in  $F_1$  and suppression of axial peaks were achieved according to the TPPI-States method (Marion *et al.*, 1989). The spectra were typically acquired with 2048 points in  $F_2$  and 256 complex points in  $F_1$ . Zero-filling was applied to obtain a number of points equal to the next power of two. Data were processed using the BRUKER software on a Silicon Graphics Indy R4000 workstation.

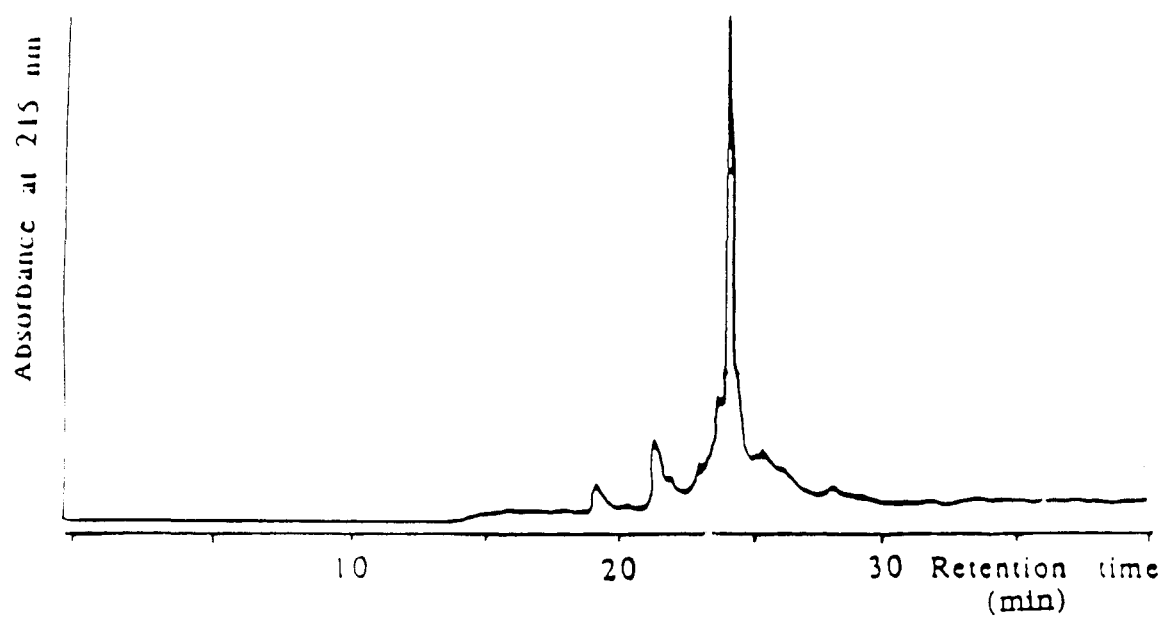


## II - RESULTS

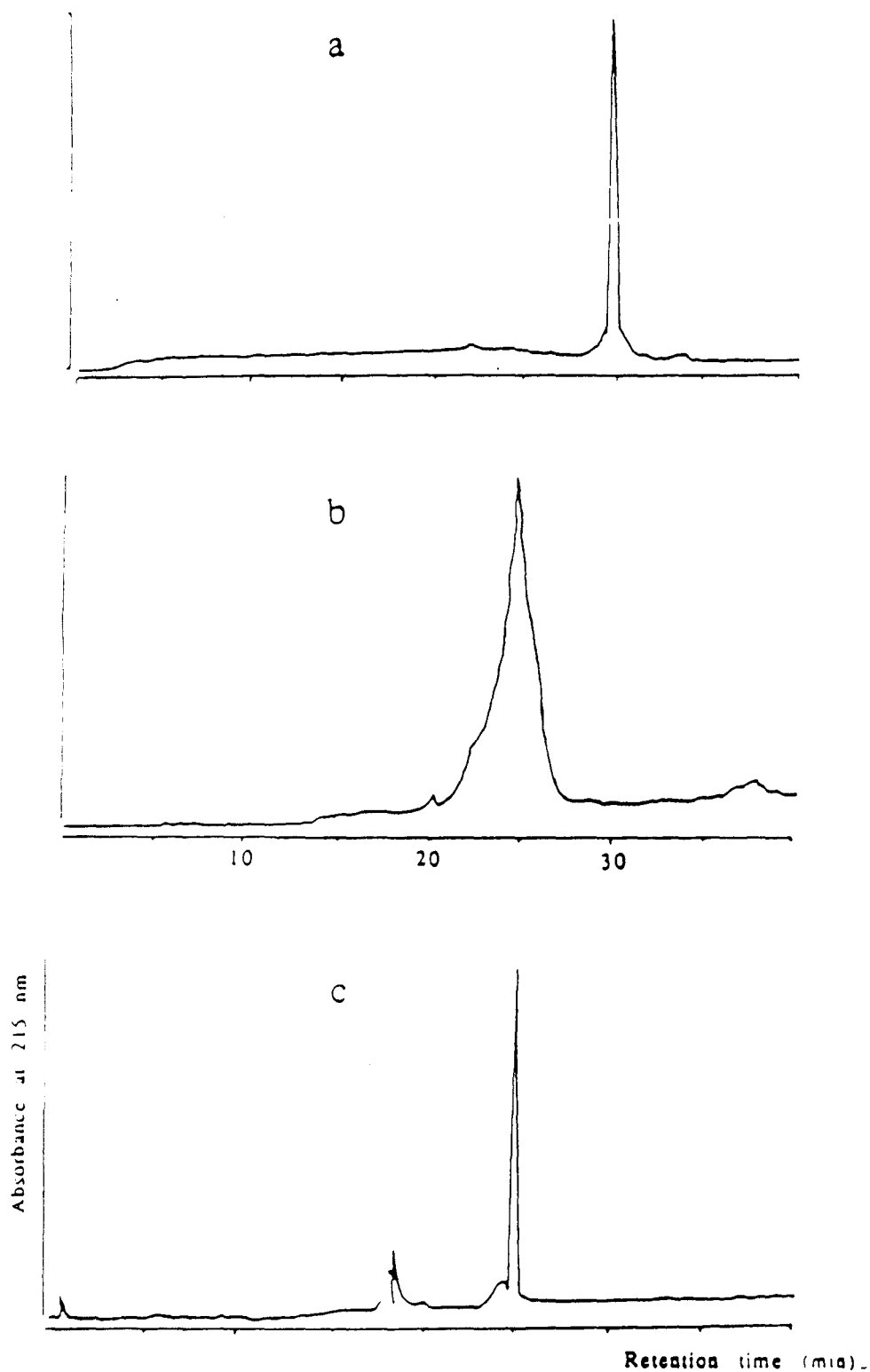
### *Synthesis of s-CITx-OH and s-CITx-NH<sub>2</sub>.*

Peptidyl resins, obtained in high yield were deprotected and cleaved by treatment with HF. Analytical reverse-phase HPLC of the crude S-Acm-protected peptides obtained after these steps showed moderately good purity (Figure 2). The crude products were purified by reverse-phase HPLC, giving yields of about 50% for both synthetic peptides. Purified S-Acm-protected peptides were treated with mercuric acetate to remove the Acm groups; this step was immediately followed by oxidation of cysteines in dilute aqueous solution in the presence of the glutathione system. After 24 h, the mixture was pumped directly onto a nucleosil C18 reverse-phase HPLC column. The resulting products were purified by nucleosil 5CN reverse-phase chromatography. Redox buffering with a glutathione system was necessary for efficient formation of the disulfide bonds. This was demonstrated by an experiment in which a sample of fully reduced s-CITx-OH was folded in the presence and in the absence of the GSH/GSSG system. In the first case, the target product is formed in 1 hour and no further change is observed after this time; in the absence of the glutathione system, the air-oxidation reaction leads to extensive polymer formation (Figure 3). The yields for the oxidation reaction, based on the initial quantities of purified S-Acm peptide, were 16% for s-CITx-OH and 20% for s-CITx-N<sub>2</sub>.

An analysis of the amino acid composition of each purified material was performed. The results showed the following amino acid ratios in the total acid hydrolysate, for s-CITx-NH<sub>2</sub>: Asp: 3.0 (3), Thr: 1.9 (2), Glu: 2.2 (2), Pro: 1.9 (2), Gly: 5.2 (5), Ala: 1.12 (1), Cys: 5.8 (8), Met: 2.8 (3), Leu: 1.0 (1), Tyr: 1.0 (1), Phe: 1.1 (1), His: 1.1 (1), Lys: 3.1 (3), Arg: 3.0 (3) and for s-CITx-OH: Asp: 2.9 (3), Thr: 1.9 (2), Glu: 2.1



**Figure 2:** HPLC profile of s-CITx-NH<sub>2</sub>, crude product after HF cleavage. Column: Nucleosil C18 (4.6 x 250 mm). Eluant: 0.5% TFA in MeCN-water. Flow rate 0.7 ml/min. Detection: 215 nm.



**Figure 3:** HPLC profiles during oxidative refolding of s-CITx-NH<sub>2</sub>. a) fully reduced s-CITx-OH obtained after deprotection of AcM groups by mercuric acetate. b) reaction medium after 24 h of air oxidation without redox system. c) Reaction medium after 1 h in the presence of GSH/GSSG, the double peak at 18 min corresponds to the redox system. Column: Nucleosil C18 (4.6 X 250 mm). Eluant: 0.5% TFA in MeCN-water. Flow rate: 0.7 ml/min. Detection: 215 nm.

(2), Pro: 1.9 (2), Gly: 5.2 (5), Ala: 1.0 (1), Cys: 4.5 (8), Met: 2.7 (3), Leu: 0.9 (1), Tyr: 0.9 (1), Phe: 1.0 (1), His: 1.0 (1), Lys: 2.9 (3), Arg: 3.0 (3).

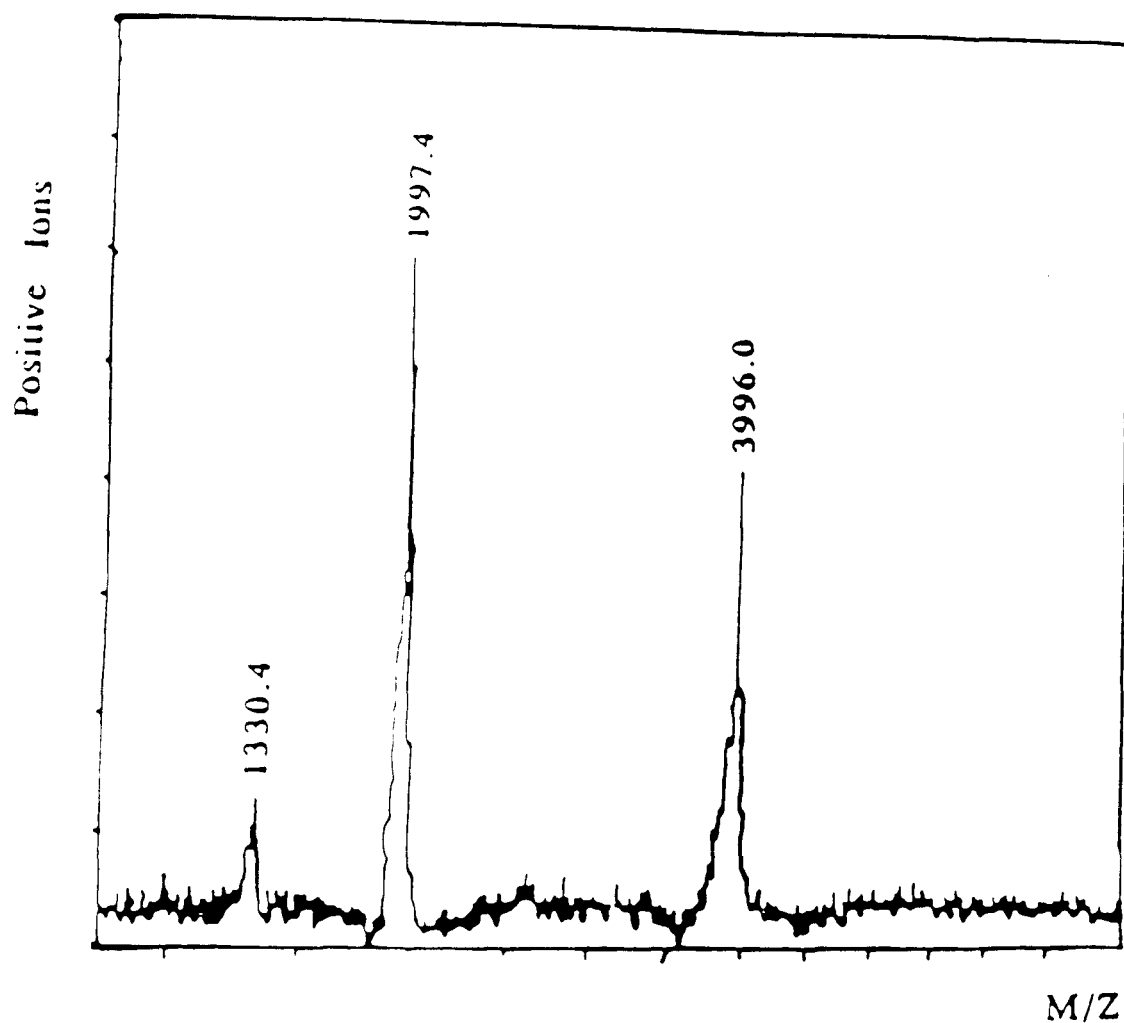
The purified synthetic peptides were also submitted to molecular weight determination by PDMS spectrometry. A molecular weight  $(M+H)^+$  of 3996.0 was measured for the s-CITx-NH<sub>2</sub> (calculated 3996.7) (Figure 4). The second and third peaks represent respectively the peptide with two positive charges and three positive charges.

The homogeneity of the purified peptides was checked by microbore-HPLC and capillary electrophoresis.

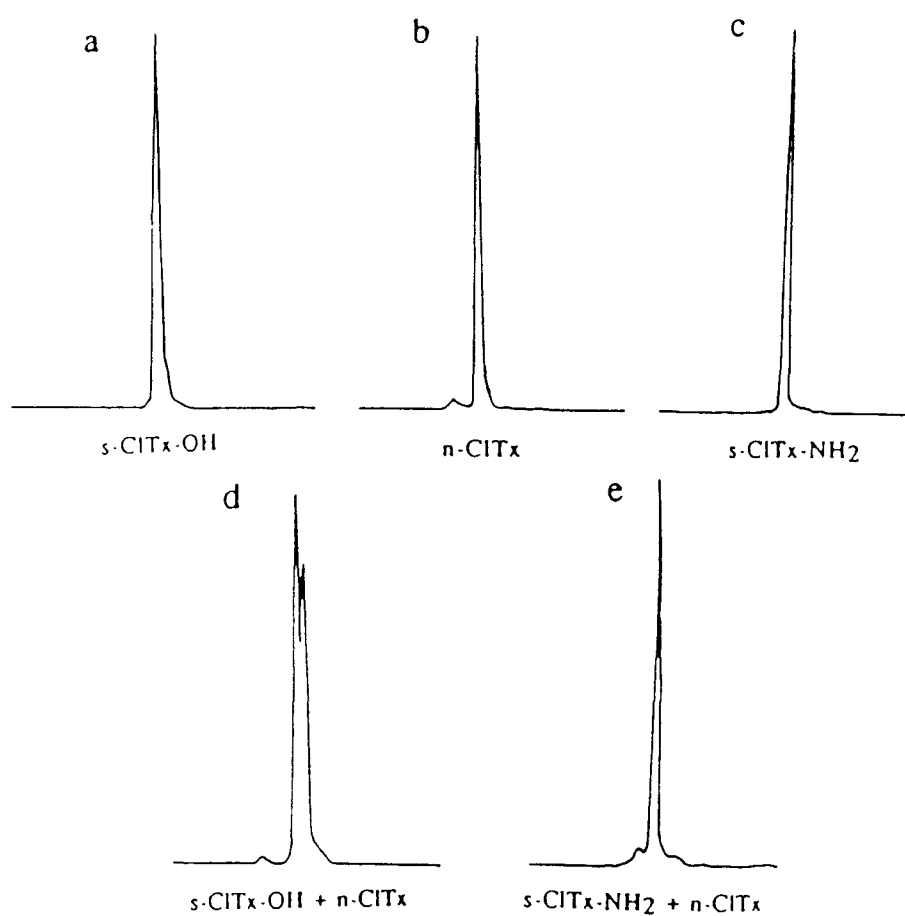
#### *Identification of the carboxy-terminus of chlorotoxin as amide form.*

The nature of C-terminus of the natural chlorotoxin was not established in the initial work (Debin et al, 1993). To clarify this point, we synthesized two forms (COOH and CONH<sub>2</sub>) and compared their elution profiles with that of the natural chlorotoxin using reverse-phase microbore HPLC and capillary electrophoresis. In both methods, the conditions were optimized in order to obtain a clear separation between the s-CITx-OH and s-CITx-NH<sub>2</sub>. The retention time, on a microbore reverse-phase HPLC, of the s-CITx-NH<sub>2</sub> at 30°C was found to be identical to that of n-CITx but was different from that of s-CITx-OH (Figure 5a). These results were also confirmed by capillary electrophoresis where the co-injection of the n-CITx with s-CITx-NH<sub>2</sub> showed one peak whereas the elution profile with s-CITx-OH showed two peaks that could be easily separated (Figure 5b). Final confirmation of the identity of the C-terminus came from the resistance of n-CITx and s-CITx-NH<sub>2</sub> to carboxypeptidase B while s-CITx-OH was digested.

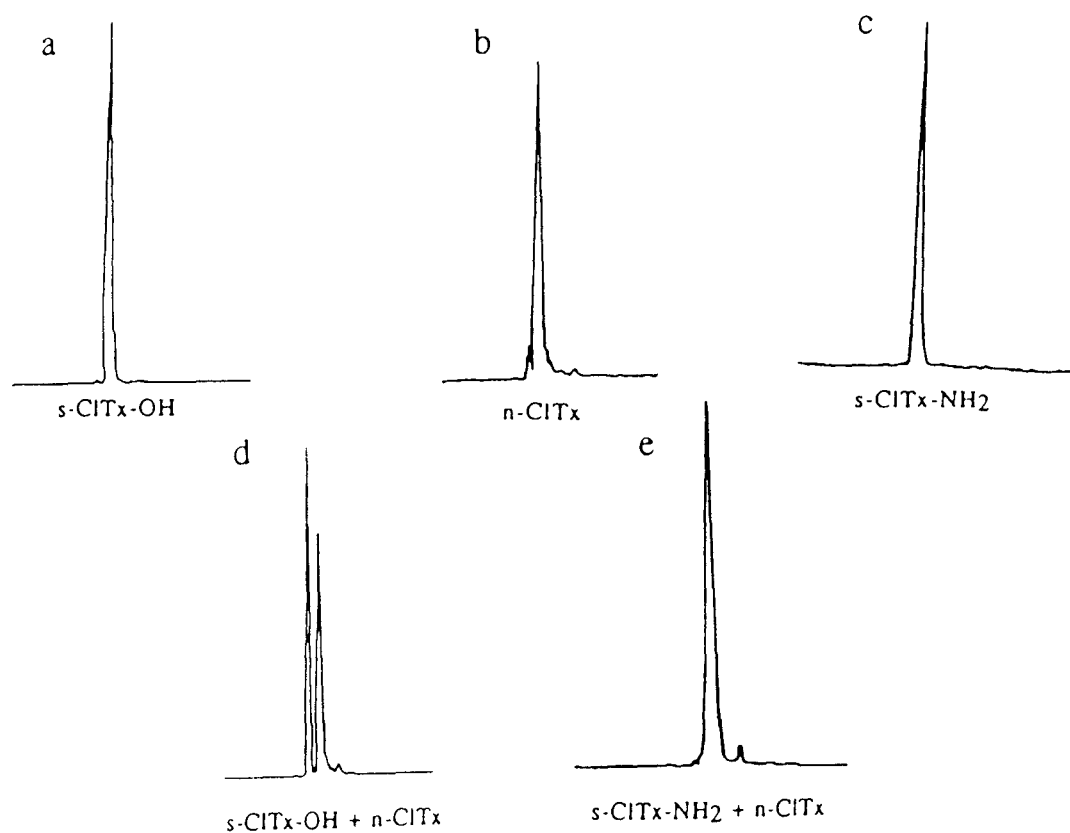
Using ion electrospray mass spectrometry we observed a difference of 1 mass unit between s-CITx-OH and both s-CITx-NH<sub>2</sub> and n-CITx.



**Figure 4:** Plasma Desorption Mass Spectrum of s-CIT<sub>x</sub>-NH<sub>2</sub>. The peak at MW=3996 corresponds to the expected (M+H)<sup>+</sup> ion. Additional peaks correspond to (M+2H)<sup>2+</sup> and (M+3H)<sup>3+</sup> ions.



**Figure 5a:** Reverse-phase high pressure liquid chromatography of synthetic peptides and natural chlorotoxin. a) s-CITx-OH. b) n-CITx. c) s-CITx-NH<sub>2</sub>. d) Co-injection of s-CITx-OH and n-CITx. e) Co-injection s-CITx-NH<sub>2</sub> and n-CITx. Column: Nucleosil C18 (2 x 200 mm). Eluant: 0.5% TFA in MeCN-water. Flow rate: 50 ml/min. Temperature: 30°C. Detection: 215 nm.



**Figure 5b:** Capillary electrophoresis of synthetic peptides and natural chlorotoxin .a) s-CITx-OH. b) n-CITx. c) s-CITx-NH2. d) co-injection of s-CITx-OH and n-CITx. e) co-injection of s-CITx-NH2 and n-CITx. Analyses were performed on a 50 cm coated capillary and in 20 mM sodium citrate, PH 2.5 . Injection: 1s. Temperature: 30°C. Detection: 200 nm.

*Synthesis of the analogues ClTx-Ala2-19, ClTx-Ala5-28, ClTx-Ala 16-33 and ClTx-Ala20-35.*

The four analogues were synthesized as amidated form using MBHA resin. The strategy followed for the synthesis of the native carboxamide form was used for all the analogues.

Under the conditions described for the oxidation of s-ClTx-NH<sub>2</sub>, only the ClTx-Ala2-19 analogue folds correctly. The yield for the oxidation reaction, based on the initial quantities of purified S-Acm peptide, was 7 % for ClTx-Ala2-19. The molecular weight, determined on PDMS spectrometer, (M+H)<sup>+</sup> of 3935.4 was measured for the ClTx-Ala2-19 (calculated 3935.64).

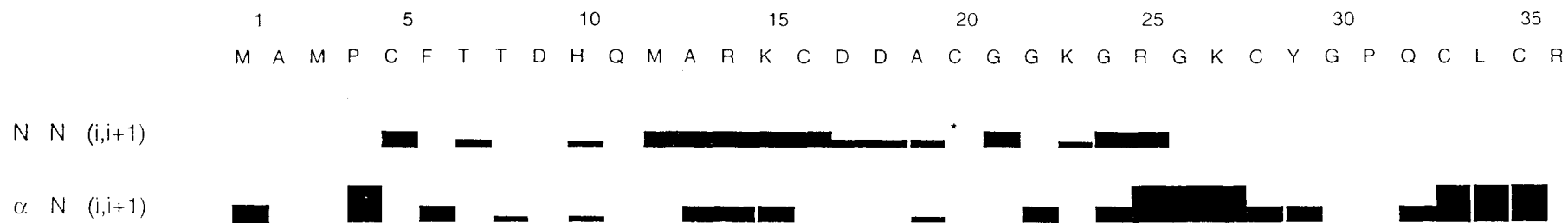
For the analogues ClTx-Ala5-28, ClTx-Ala16-33 and ClTx-Ala20-35, several different folding conditions of oxidation were tested: dimethyl-sulfoxide (Tam et al.,1991), potassium ferricyanure (Rivier et al, 1978), air oxygen in the presence or absence of the redox system, at different concentrations of ammonium acetate, at different pH, at room temperature and 4°C. But none resulting HPLC profiles in these conditions were satisfying.

#### *1H-NMR Assignments of s-ClTx-NH2 and ClTx-Ala2-19.*

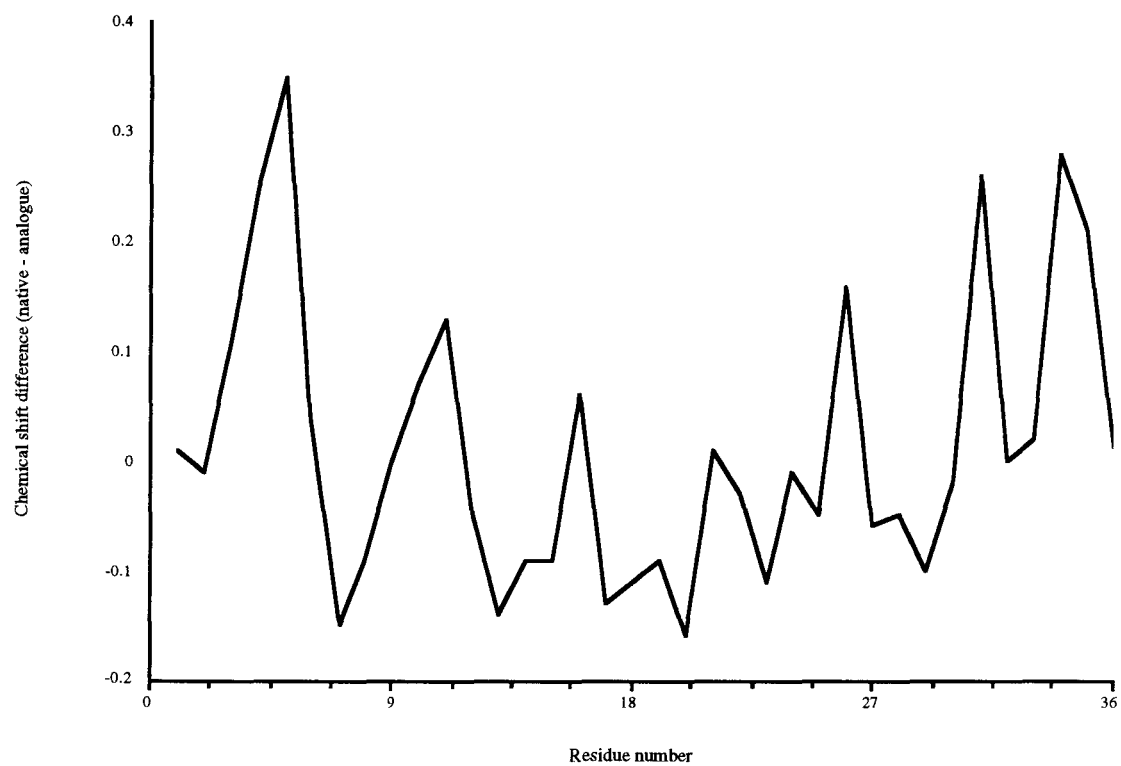
Assignment of the synthetic chlorotoxin was trivial, as no differences in chemical shift compared to the natural peptide larger than 0.1 ppm were observed with the exception of the amide proton resonances of the two Gly residues at positions 24 and 26 in the  $\alpha$ - $\beta$  turn. However, this difference could be attributed to a slight difference in pH, as a remarkable pH dependence was found for the amide proton resonances of both glycine residues. Whereas most resonances hardly change with pH, the resonances of the amide protons of these two glycines change by as much as 0.7 ppm when the pH is varied from 2.5 to 4.7. Nevertheless, as the chemical shift is a very sensitive indication of the three-dimensional environment of the proton, the excellent overall agreement confirms the structural identity between both products. As far as the ClTx-Ala2-19 analogue is concerned, chemical shift values did not agree as well, so we proceeded to the



sequence specific assignment according to the method described by Wüthrich (Wüthrich, 1986). The residues between Ala13 and Gly22 could be readily attributed, as they give sequential contacts between consecutive amide proton resonances (Figure 6). These sequential contacts indicate the presence of an  $\alpha$ -helical stretch between those two positions, in agreement with the structure of the natural chlorotoxin. This structural similarity is confirmed by the minor chemical shift differences for the  $H\alpha$  protons in this region (Figure 7). In a similar way, the C-terminal region ranging from Gly26 to Arg 36 could be easily assigned due to the intense  $H\alpha$ -HN ( $i,i+1$ ) contacts between consecutive residues, indicating the presence of a stable  $\beta$ -sheet. However, even though the same secondary structure element was found in the native chlorotoxin, a significant



**Figure 6:** Sequential contacts between consecutive amide proton resonances.



**Figure 7:** H $\alpha$  Chemical shift difference between the native chlorotoxin and the CITx-Ala2-19 analogue

difference of 0.2ppm in a proton chemical shift was found for Leu34 and Cys35. The N-terminal region was harder to attribute, as no contacts indicative of a regular secondary structure could be detected. However, the presence of Phe6 and two Thr at positions 7 and 8 did facilitate the attribution. The Methionine residue at position 12 was attributed by comparison to Met12 in the natural chlorotoxin, even though no NOE contacts were present to confirm this attribution. A list of the complete attributions of the ClTx-Ala2-19 analogue can be found in Table 1.

### *Structure of the ClTx-Ala2-19 analogue*

The NMR contacts characteristic for the secondary structure elements are summarized in figure 6. As stated above, the  $\alpha$ -helix and C-terminal  $\beta$ -sheet are conserved between the native chlorotoxin and the ClTx-Ala2-19 analogue. However, a significant difference superior to 0.2 ppm in  $H\alpha$  chemical shift is observed for Leu34 and Cys35. If we plot the  $H\alpha$  chemical shift difference for corresponding residues in the two polypeptides, we observe a similar upfield shift for Pro4 and Cys5 in the N-terminal strand (Figure 7). This simultaneous upfield shift of the  $H\alpha$  resonances is in agreement with a model where the  $\beta$  strand spanning residues 1-5 in the native chlorotoxin is disrupted through the mutation of the Cys2 residue.

Residue	NH	CaH	CbH	Others
1Met	-	4.15	2.53	g 2.61/2.18
2Ala	8,67	4.44	CH <sub>3</sub> 1,37	-
3Met	8,32	4.78	2.05	g 2.58/2.49
4Pro	-	4.55	2.17/1.98	g 1,55 d 3.79/3.68
5Cys	7.88	4.67	3.02/2.63	-
6Phe	8.19	4.82	3.20/2.99	d 7.31 e 7.31 z 7.31
7Thr	8.20	4.35	4.26	CH <sub>3</sub> 1.21
8Thr	7.81	4.26	4.26	CH <sub>3</sub> 1.22
9Asp	7.90	4.70	3.12/3.00	-
10His	8.84	4.52	3.40/3.29	
11Gln	8.55	4.46	2.36/2.02	g <sub>12</sub> 2.30
12Met	7.83	4.27	2.52/2.15	g 2.68/2.22
13Ala	8.32	4.09	CH <sub>3</sub> 1.40	-
14Arg	7.94	4.26	1.89	g <sub>12</sub> 1.69/ d <sub>12</sub> 3.22/ N <sup>e</sup> H 7.32
15Lys	8.17	4.14	1.88/1.69	g <sub>12</sub> 1.46 / d <sub>12</sub> 1.59/ e <sub>12</sub> 2.98 / N <sup>z</sup> H <sub>3</sub> <sup>+</sup> 7.79
16Cys	8.25	4.66	3.01/2.85	-
17Asp	8.03	4.33	2.85/2.77	-
18Asp	8.33	4.35	2.84	-
19Ala	8.02	4.20	CH <sub>3</sub> 1,56	-

20Cys	7.76	4.77	3.17/2.53	-
21Gly	7.82	4.34/3.84	-	-
22Gly	8.33	4.31/3.79	-	-
23Lys	8.19	4.11	1.80	g 1.47/1.38 d <sub>12</sub> 1.71 / e <sub>12</sub> 2.98/ N <sup>z</sup> H <sub>3</sub> <sup>+</sup> 7.48
24Gly	8.72	4.08/3.98	-	-
25Arg	7.86	4.25	1.94/1.74	g <sub>12</sub> 1.43 d <sub>12</sub> 3.05 N <sup>e</sup> H 7.12
26Gly	8.58	4.83/3.58	-	-
27Lys	8.50	4.43	1.69	g 1.16/1.27 d <sub>12</sub> 1,62 e <sub>12</sub> 2.86 N <sup>z</sup> H <sub>3</sub> <sup>+</sup> 7.44
28Cys	8.58	5.20	3.08/2.88	-
29Tyr	8.97	4.67	2.99/2.84	d 7.25 e 6.81
30Gly	8.47	4.17/3.58	-	-
31Pro	-	4.62	2.24/2.08	g 1.91 d 3.90/3.66
32Gln	7.74	4.78	2.06	g 2.31
33Cys	8.52	4.94	2.83/2.91	-
34Leu	8.86	4.76	1.45	g 1.75 d <sub>1</sub> CH <sub>3</sub> 0.86 d <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> 0.77
35Cys	8.63	5.42	3.41/2.74	-

36Arg	8.62	4.35	1.88/1.76	g <sub>12</sub> 1.61 d <sub>12</sub> 3.18 N <sup>e</sup> H 7.05
-------	------	------	-----------	---

**Table 1** : Chemical shifts measured for the ClTx-Ala2-19 analogue at pH 3.01 and 36°C. All resonance frequencies are given with respect to trimethyl silyl propionate.

### III-DISCUSSION

Whereas most members of the short scorpion toxin family are cross-linked by three disulfide bridges, a fourth disulfide is present in the sequence of chlorotoxin (Figure 1). Several toxins of this family characterized by three disulfide bonds have recently been obtained by chemical synthesis: scyllatoxin (Auguste et al, 1990), charybdotoxin (Lambert et al., 1990), iberiotoxin (Johnson et al., 1992), PO5 (Sabatier et al., 1993), but to our knowledge no short scorpion toxin molecule with four disulfide bridges has yet been synthesised. The additional disulfide bridge increases the number of possible disulfide topologies from 15 to 105. Considering this increased complexity, our synthetic strategy consisted in the preparation of an extensively purified derivative in which the thiol groups of the eight cysteine residues were protected by the HF-resistant acetamidomethyl group (Acm) which avoids the formation of polymers through premature formation of disulfide bridges during initial purification steps.

The crucial step of such a synthesis is the oxidation which follows the deprotection of the cysteine residues. A first difficulty is the possible polymerisation due to the formation of interchain cystine links. This is particularly the case during the Acm-deprotection step where the peptide concentration is high (10 mg/ml). The presence of oxygen is thus carefully avoided by degassing solvents and performing the reaction under nitrogen. The solution containing the peptide is then diluted to  $2.5 \cdot 10^{-5}$  M. A second problem which is no longer dependent on the dilution of the peptide but which increases

exponentially with the number of cysteine is the possible formation of structures containing non-native disulfide links, where some of these structures could represent non-productive folding pathways, as observed in the case of BPTI (Creighton, 1986).

Although some short toxins have been successfully folded to their native structures by direct air oxidation (scyllatoxin (Auguste et al., 1990) and noxiustoxin (Nutt et al., 1992)), attempts to use this method with chlorotoxin were not successful. The use of a redox system consisting of reduced and oxidized glutathione allows an equilibration between the different folding intermediates and as such establishes an equilibrium between kinetically-favoured intermediates and the thermodynamically controlled product, where the latter is expected to be the native protein. The optimal conditions in our case were found to be a solution containing both GSH/GSSG (60/6 eq) in which case a refolding yield of 20 % was obtained for s-CITx-NH<sub>2</sub> and 16% for the s-CITx-OH based on the corresponding S-Acm peptides.

The exact nature of the carboxy-terminus group of chlorotoxin had not been established in the initial report (Debin et al., 1993). Although the mechanisms of maturation leading to a carboxylate or a carboxamide are different, both C-terminus types have been reported in the case of short scorpion toxins: charybdotoxin from the *Leiurus quinquestriatus* scorpion venom has been shown to be in the carboxylate form (Miller et al., 1985; Lambert et al., 1990) while scyllatoxin, isolated from the same scorpion venom, exists in carboxamide form (Auguste et al., 1990). However, PO5, isolated from the venom of *Androctonus mauretanicus*, although 93% homologous to scyllatoxin, has been shown to be in the carboxylate form (Sabatier et al., 1993) while noxiustoxin, 47% homologous to charybdotoxin but isolated from the venom of *Centruroides noxius* has a carboxamide end. Comparison with both synthetic forms of chlorotoxin proved that the C-terminus of the natural chlorotoxin is the amide form as in scyllatoxin. This confirms that the toxin maturation process in the venom of *Leiurus quinquestriatus* can generate small toxins with both carboxylate C-terminus (charybdotoxin) and carboxamide C-terminus (scyllatoxin and chlorotoxin) forms. However, the nature of the C-terminus does not appear to be of major



importance in the structuration of the molecule as indicated by the similarity in the kinetics as well as in the yield of the folding steps of both s-CITx-OH and s-CITx-NH<sub>2</sub>.

Several members of the three-disulfide bridged toxin family had their three dimensional structure elucidated by NMR (charybdotoxin (Bontems et al, 1991a), scyllatoxin (Martins et al, 1990), iberiotoxin (Johnson et al, 1992). Chlorotoxin clearly distinguishes itself from this family through the presence of a fourth disulfide bridge and whose three dimensional structure has been recently determined (Lippens et al., 1995). The folding pattern consists of a small triple-stranded anti parallel  $\beta$  sheet linked to a short helix by two disulfide bonds. The same pattern was also recognized in the case of the charybdotoxin molecule (Bontems et al., 1991b). This structural organisation is associated with a typical pattern in the primary structure (Bontems et al., 1991b; Ménez et al., 1992)(Figure 1b):

Cys-(....)-Cys-Xxx-Xxx-Xxx-Cys-(....)-Gly-Xxx-Cys-(....)-Cys-Xxx-Cys-(....).

The presence of this pattern in the different molecules corresponds to the existence of a common structural organisation, consisting of a sheet containing the Cys-Xxx-Cys sequence which is linked through two disulfide bonds to the Cys-Xxx-Xxx-Xxx-Cys sequence located in an helix. The same pattern of amino acids is also found in chlorotoxin, even though the presence of two additional cysteine residues.

In first time, in order to determine the part of the additional disulfide bond, present in CITx (Cys2-Cys19) and absent in other short scorpion toxins, in the folding and in the maintain of a structural stability, CITx-Ala2-19 analogue with only three disulfide bonds was synthesized and in which the cysteine residues of the deleted disulfide bond were replaced by alanine residues. In second time, in order to understand the contribution of each other disulfide bonds of the common pattern in the folding and stability, three other analogues with three disulfide bonds: CITx-Ala5-28, CITx-Ala16-33 and CITx-Ala20-35 were synthesised. The results show that only CITx-Ala2-19 analogue can be folded and in the same conditions of oxidation of CITx indicating that the additional disulfide bond (Cys2-Cys19) has a secondary role in the folding processus of CITx. The other

analogues could not be folded even in different other conditions showing the importance of these disulfide bridges in the folding.

The comparison of  $^1\text{H-NMR}$  data study of s-CITx-NH<sub>2</sub> with previous data on the natural chlorotoxin clearly proves that synthetic and natural chlorotoxin have the same structure.

The NMR contacts characteristic for the secondary structure elements indicate that the  $\alpha$ -helix and C-terminal  $\beta$ -sheet are conserved between the native chlorotoxin and the CITx-Ala-2-19 analogue, with the three remaining disulfide bonds cross-linking the  $\alpha$ -helix to the  $\beta$ -sheet, following the common pattern found in the other short scorpion toxins. The disappearance of the N-terminal  $\beta$  strand is confirmed by the absence of contacts between the  $\alpha$  proton of Met1 and the amide proton of Cys2 and between the  $\alpha$  proton of Met3 and the  $\delta$  protons of Pro4. When comparing the primary and tertiary structures of chlorotoxin and charybdotoxin, the absence of the fourth disulfide bridge in charybdotoxin seemed to be compensated for by a hydrophobic cluster between the N-terminal residues and the hydrophobic residues of the turn (Leu20, His21 and Thr23) (Lippens et al., 1995). The different orientation of the  $\alpha\beta$  turn in chlorotoxin (*vide infra*) and the shorter N-terminal strand did not allow for such a hydrophobic cluster. If the anchoring point formed by the Cys2-Cys19 disulfide bridge disappears, it is therefore not amazing that the one or two hydrogen bonds do not succeed to keep the N-terminal strand in the previously observed conformation.

Based on comparative calculations of the electrostatic potential surface around the native chlorotoxin and charybdotoxin structures, we have emitted the hypothesis that the activity of the native chlorotoxin is concentrated in the positive patch formed by the three Arg/Lys side chains in the  $\alpha\beta$  turn. The orientation of this turn deviates substantially from the equivalent turn in charybdotoxin, and we therefore had spent a great deal of effort in accurately determining the contacts that define this orientation. Therefore, the presence of the Asp17 H $\beta$  - Lys23 H $\alpha$  and the Cys20 H $\beta$  - Arg25 H $\beta$  contacts in the CITx-Ala-2-19 analogue indicates that the turn has conserved the orientation adopted in the

native protein, and is not influenced by the changes in conformation of the N-terminal strand.

A comparison of the number of NOE contacts in the spectra of the native and the analogue chlorotoxin samples showed a clear loss of stability of the latter. Indeed, the contacts between the N-terminal strand and the C-terminal strand have completely disappeared, but also in the  $\alpha$ -helix a large number of long-range contacts are not present in the NOE spectrum of the analogue. Although this loss of cross peaks might be partly due to the lower concentration of the analogue, it is indicative of an overall decrease in stability of the analogue. A similar phenomenon is observed at the level of the C-terminal  $\beta$ -sheet: of the two cross-strand  $H\alpha$ - $H\alpha$  contacts (Cys35-Gly26 and Cys33-Cys28) only the latter is conserved, indicating the conservation of the  $\beta$  hairpin but with a lesser stability.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank M. Kouach and G. Briand for their assistance with Ion Electrospray Mass Spectrometry.

## REFERENCES

- Arseniev, A. S., Kondakov, V. I., Maiorov, V. N., Volkova, T. M., Grishin, E. V., Bystrov, V. F., and Ovchinnikov, Y. A. (1983) *Bioorg. Khem. (USSR)* 9, 768
- Arseniev, A. S., Kondakov, K. I., Maiorov, V. N., and Bystrov, V. F. (1984) *FEBS Lett.* 165, 57-62.
- Auguste, P., Hugues, M., Gravé, B., Gesquière, J. C., Maes, P., Tartar, A., Romey, G., Schweitz, H., and Lazdunski, M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 4753-4759.
- Bax, A., and Davis, D. (1985) *J. Magn. Res.* 65, 355-360
- Betz, H. (1990) *Biochemistry* 29, 3591-3599.
- Bontems, F., Roumestand, C., Boyot, P., Gilquin, B., Doljanski, Y., Ménez, A., and Toma, F. (1991a) *Eur. J. Biochem.* 196, 19-28.
- Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Ménez, A., and Toma, F., (1991b) *Science* 254, 1521-1523.
- Braunschweiler, L., Bodenhausen, G., and Ernst, R. R. (1983) *Molec. Phys.* 48, 535-560.
- Brown, S. C., Weber, P. L., and Mueller, L. (1988) *J. Magn. Reson.* 77, 166-169.
- Cook, N. S., and Quast, U. (1990) in *Potassium channels*, Chapter 8, pp 181-255, Ellis Horwood Limited, Chichester U.K.
- Creighton, T. E. (1986) *Methods Enzymol.* 131, 83-106
- Crest M., Jacquet G., Gola M., Zerrouk H., Benslimane A., Rochat H., Mansuelle P., Martin-Eauclaire M.F. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 1640-1647.
- Debin, J. A., Maggio, J. E., and Strichartz, G. R. (1993) *Am. J. Physiol. Soc.* 264 , C369.
- Dreyer, F. (1990) *Rev-physiol., Biochem-pharmacol.* 115, 93-136.
- Fazal, A., O.V.Beg, J. Shafgat, Z.H. Zaidi, and H. Jornvall (1989) *FEBS Lett.* 257, 260-262.
- Fontecilla-Camps, J. C., Almassy, R. J., Suddath, F. L., and Bugg, C. E., (1982) *Toxicon* 20, 1-7
- Garcia, M. L., Galvez, A., Garcia-Calva, M., King, F., Vasquez, J., and Kaczorowski, G. J. (1991) *J. Bioenerg. Biomembr.* 2, 615-645

- Galvez A., Gimenez-Gallego G., Reuben J.P., Roy-Contancin L., Feigenbaum P., Kaczorowski G.J., Garcia M.L. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 11083-11090.
- Grishin, E. V., Soldatov, N. M., Tashmuchamedov, B. A. and Atakuziev, B. U. (1978) *Bioorgan. Khem. (USSR)* 4, 450-461.
- Grishin, E.V., Volkova, T.M and Soldatova, L.N. (1982) *Bioorgan. Khem (USSR)* 8, 155-164.
- Jeener, J., Meyer, P. H., Bachmann, P., and Ernst, R. R., (1979) *J. Chem. Phys.* 71, 4546-4553
- Johnson, B. A., and Sugg, E. E. (1992) *Biochemistry* 31, 8151-8159
- Klaus W., Broger, C., Gerber, P. and Senn, H., (1993) *J. Mol. Biol.* 232, 897
- Lambert, P., Kuroda, H., Chino, N., Watanabe, T. X., Kimura, T., and Sakakibara, S., (1990) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 170, 684-690.
- Lippens, G., Najib, J., Wodak, S. J., Tartar, A. (1995) *Biochemistry* 34, 13-21.
- Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R., and Bax, A. (1989) *J. Magn. Reson.* 85, 393-399.
- Martins, J. C., Zhang, W., Tartar, A., Lazdunski, M., and Borremans F. A. M., (1990) *FEBS Lett.* 260, 249-253.
- Ménez, A., Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., and Toma, F., *Proc. Royal Soc. Edinburgh* 99B, 83-103.
- Merrifield, R. B. (1986) *Science* 232, 341-347.
- Meunier S., Bernassau J.M., Martin-Eauclaire M.F., Van Rietschoten J., Cambillau C., Darbon H. (1993) *Biochemistry* 32, 11969.
- Miller, C., Moczydlowski, E., Lattore, R., and Philips, M. (1985) *Nature* 313, 316-318
- Moczydlowski, E., Lucchesi, K., and Ravindran, A. (1988) *J. Membr. Biol.* 105, 95-111.
- Nutt, R. F., Arison, B. H. and Smith, J. S. (1992) *Peptides* 101-102, Editors: C. H. Schneider and A. N. Eberle.
- Possani L.D., Martin M.B., Sveden I.B., (1982) *Carlsberg Res. Commun* 47, 285-289.
- Rivier, J., Kaiser, R., and Galyean, R. (1978) *Biopolymers* 17, 1927-1938.
- Rochat, H., Bernard, P., and Courand, F. (1979) *Neurotoxins: Tools in neurobiology*, edited by B. Ceccarelli. New York : Raven, 325-334.

Sabatier, J.-M., Zerrouk, H., Darbon, H., Mabrouk, K., Benslimane, A., Rochat, H., Martin-Eau-claire, M.-F., and Van Rietschoten, J. (1993) *Biochemistry* 32, 2763-2770.

Strong, P. N. (1990) *Pharmacol. Ther.* 46, 137-162.

Tam, J. P., Wu, C. R., Liu, C. R., and Zhang, J. W. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113, 6657-6662.

Veber, D.F, Mikowski, J.D., Varga, S., Denkwalter, R.G. and Hirschmann, R. (1972) *J. Am. Chem. Soc.* 94, 5456-5461.

Wüthrich, K., (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley and Sons, NY

Zlotkin, E., F. Miranda, and H. Rochat (1978) *Arthropod Venoms*, edited by S. Bettini: Berlin : Springer-Verlag 317-369.

**V-L' $\omega$ -AGATOXINE IVA**



## L' $\omega$ -AGATOXINE IV A, BLOQUEUR DE CANAUX $Ca^{2+}$ DE TYPE P.

### I-INTRODUCTION

Les venins d'araignée contiennent plusieurs classes distinctes de toxines synaptiques. Le venin d'*Agelenopsis aperta* contient 3 classes de toxines : les  $\alpha$ -agatoxines qui sont des acylpolyamines (Quistad et al., 1990), les  $\mu$ -agatoxines et les  $\omega$ -agatoxines qui sont des polypeptides avec 4 ponts disulfure (Adams et al., 1990 ; Skinner et al., 1989). Les acylpolyamines d'*Agelenopsis* affectent la neurotransmission, en agissant sur les récepteurs des acides aminés excitateurs et causent une paralysie, immédiate mais réversible, des insectes alors que les toxines peptidiques verrouillées par des ponts disulfure bloquent de façon efficace et irréversible la transmission synaptique.

La plupart des cellules des Vertébrés possèdent de multiples types de canaux  $Ca^{2+}$  voltage-dépendants (Tsien et al., 1988 ; Bean et al., 1989 ; Hess et al., 1990). Les  $\omega$ -agatoxines d'*Agelenopsis* sont utilisées comme antagonistes des canaux  $Ca^{2+}$  voltage-dépendants. L' $\omega$ -agatoxine III A ( $\omega$ -Aga III A) bloque avec haute affinité les canaux  $Ca^{2+}$  de type N et L, avec la même puissance et des propriétés (Mintz et al., 1991) qui font de ces toxines des outils pour l'étude structurale et fonctionnelle des canaux  $Ca^{2+}$ .

Récemment une nouvelle  $\omega$ -agatoxine IV A ( $\omega$ -Aga IV A) a été isolée du venin d'*Agelenopsis aperta*, elle bloque à la fois les canaux  $Ca^{2+}$  entrant dans les synaptosomes de cerveau de rat et les canaux  $Ca^{2+}$  de type P des neurones cerebelleux de Purkinje du rat (Mintz et al., 1992). L' $\omega$ -Aga IV A faciliterait la caractérisation des canaux  $Ca^{2+}$  du cerveau résistant aux bloqueurs de canaux déjà existants et pourrait contribuer à la conception de molécules neuroprotectrices. Il

a été aussi montré que cette  $\omega$ -Aga IV A inhibe la libération du glutamate à partir des synaptosomes du rat, ce qui signifie que le glutamate libéré est couplé aux canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type P (Turner et al., 1992).

La structure primaire de l' $\omega$ -Aga IV A est constituée de 48 acides aminés dont 8 cystéines et un tryptophane, et l'extrémité C-terminale est libre (Mintz et al., 1992).

H-Lys-Lys-Lys-Cys-Ile-Ala-Lys-Asp-Tyr-Gly-Arg-Cys-Lys-Trp-Gly-Gly-Thr-Pro-Cys-Cys-Arg-Gly-Arg-Gly-Cys-Ile-Cys-Ser-Ile-Met-Gly-Thr-Asn-Cys-Glu-Cys-Lys-Pro-Arg-Leu-Ile-Met-Glu-Gly-Leu-Gly-Leu-Ala-OH

L' $\omega$ -Aga IVA représente une forte homologie de séquence avec l' $\omega$ -Aga TK extraite du même venin (Teramoto et al., 1993). L'alignement des séquences de ces deux toxines montre la présence de 71% d'acides aminés conservés (Figure 1). L' $\omega$ -Aga TK maintient le même profil pharmacologique que l' $\omega$ -Aga IV A, c'est à dire le blocage des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type P alors qu'elle est 20 fois plus abondante dans le venin que l' $\omega$ -Aga IV A (10). L' $\omega$ -Aga TK a été identifiée par une autre équipe qui l'a baptisée l' $\omega$ -Aga IV B (Yu et al., 1993) et a réalisé son étude structurale par RMN.



Figure 1 : Alignement de séquences des  $\omega$ -agatoxines IV A et IV B d'*Agelenopsis sparta*.  
Les acides aminés identiques sont encadrés.

Il a été démontré récemment que l' $\omega$ -Aga IVB peut donner naissance à une autre toxine  $\omega$ -Aga IVC par inversion enzymatique de la configuration L en D de la Serine 46. L'enzyme responsable de cette inversion se trouve dans le venin (Gunther, 1994 ; Heck et al., 1994a ; Heck et al., 1994b).

Dans ce travail nous décrivons la synthèse en phase solide de l' $\omega$ -Aga IV A en utilisant la stratégie Boc/Bzl et l'optimisation des conditions d'oxydation. En

l'absence de toxine naturelle, notre objectif était d'obtenir par voie de synthèse une quantité suffisante de toxine qui permet de réaliser l'étude structurale par RMN. Malheureusement, une fois notre synthèse était achevée, la publication de la structure tridimensionnelle obtenue par RMN  $\omega$ -Aga IV B (Yu et al., 1993) nous a amenée à abandonner ce projet en raison de la forte homologie de séquences entre l' $\omega$ -Aga IV A et l' $\omega$ -Aga IV B (Figure 1) (71%), de l'appariement de leurs cystéines et de l'identité de leur activité biologique. D'un point de vue structural, l' $\omega$ -Aga IV A et l' $\omega$ -Aga IV B ont des séquences de même longueur dont l'alignement ne nécessite ni insertion ni délétion.

Alors que ce travail était en partie achevé, la synthèse de cette même toxine, selon une stratégie totalement différente puisque faisant appel au couplage de fragments préparés en solution, a été décrite (Nishio et al., 1993). Ces deux stratégies sont complémentaires, l'approche utilisée par Nishio et al. permet la production de quantités importantes par contre, la notre, si elle conduit à des quantités plus faibles permet beaucoup plus facilement d'accéder à des variants structuraux.

## II-SYNTHESE DE L' $\omega$ -AGATOXINE IVA EN PHASE SOLIDE ET OPTIMISATION DES CONDITIONS D'OXYDATION

L' $\omega$ -Aga IV A a été synthétisée en phase homogène par Nishio et al. combinant la synthèse en solution de fragments et la condensation de ces derniers (Yu et al., 1993). Dans ce travail on montre que la synthèse automatique de l' $\omega$ -Aga IV A en phase solide est une voie plus rapide et économe tout en permettant d'obtenir un produit de haute pureté avec un bon rendement.

La synthèse de l' $\omega$ -Aga IV A a été effectuée sur une résine Boc-Ala-Pam, en utilisant la stratégie Boc/Bzl. Pour la protection des chaînes latérales des cystéines, on a choisi le groupe AcM dont l'intérêt réside dans sa résistance aux acides forts, ce qui permet en fin de synthèse de cliver l'ensemble des groupes protecteurs, excepté les AcM, notamment par HF (Lyle et al., 1987). Cette déprotection sélective

permet de purifier le produit brut de HF sans se confronter à des problèmes majeurs de polymérisation.

L'analyse du produit brut de HF en spectrométrie de masse, mode électrospray, montre un mélange de produits correspondant à M+8Acm, M+7Acm, M+6Acm et M+5Acm (Fig. 2 dans l'article) ceci montre qu'il y a déprotection prématurée des fonctions thiol. Cette instabilité partielle des groupes Acm durant le clivage par HF a été déjà observée par d'autres auteurs (Nutt et al., 1986 ; Brady et al., 1988).

Durant l'étape de déprotection des résidus Cys(Acm), une réaction secondaire a été détectée entraînant la modification du tryptophane par un groupe Acm. Cette réaction parasite peut être évitée par addition d'un excès de tryptophane libre (10 éq/peptide-Acm) durant l'étape de déprotection par l'acétate mercurique.

Dans le but d'optimiser les conditions de réaction oxidative de réarrangement spatiale, nous avons fait varier les paramètres suivants: la concentration de peptide, la concentration d'acétate d'ammonium, la température, le pH, la présence ou l'absence de glutathion réduit et oxydé et l'utilisation de différents agents oxydants tels que l'oxygène de l'air, le diméthylsulfoxyde, le ferricyanure de potassium et le trifluoroacétate de thallium dans le TFA (qui permet simultanément la déprotection des résidus Cys(Acm) et la formation de ponts disulfure).

Dans les conditions optimales d'oxydation, à 4°C dans l'acétate d'ammonium 0.2 M en présence du mélange de glutathion réduit et oxydé, et après purification le produit attendu est obtenu avec un rendement de 10% (déterminé par hydrolyse acide totale) par rapport au peptide-Acm purifié.

La mesure d'activité de ce produit synthétique a été faite sur les cellules de Purkinje de jeunes rats (Llano et al., 1994) en utilisant la méthode du voltage imposé. Elle montre que l'efficacité d'inhibition des canaux  $Ca^{2+}$  de type P par l' $\omega$ -Aga IV A synthétique est similaire à celle obtenue avec le produit naturel (Mintz et al., 1992).

## Références

- Adams M. E., Bindokas V. P., Hasegawa L., Venema V. J.,  $\omega$ -Agatoxins: novel calcium channel antagonists of two subtypes from funnel web spider (*Agelenopsis aperta*) venom. *J. Biol. Chem.* (1990) **265**, 861-867.
- Bean B. P., Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Ann. Rev. Physiol.* (1989) **51**, 367-384.
- Brady S. F., Palevada W. J., Nutt R. F., Studies of acetamidomethyl as cysteine protection: Application in synthesis of ANF analogs. *Peptides, Chemistry and Biology : Proceedings of the Tenth American Peptide Symposium (Marshall G. R., Ed)* (1988) 192-195, ESCOM, Leiden.
- Gunther K., Conversion of L- to D-amino acids: a posttranslational reaction. *Science* (1994) **266**, 996-997.
- Heck S. D., Kelbaugh P.R., Kelly M. E., Thadeio P. F., Saccomano N. A., Stroh J. G., Volkman R., A, Disulfide bond assignment of  $\omega$ -agatoxins IVB and IVC: discovery of a D-serine residue in  $\omega$ -agatoxin IVB. *J. Am. Chem. Soc.* (1994a) **116**, 10426-10436.
- Heck S. D., Siok C. J., Krapcho K. J., Kelbaugh P. R., Thadeio P. F., Welch M. J., Williams R. D., Ganong A. H., Kelly M. E., Lanzetti A. J., Gray W. R., Phillips D., Parks T. N., Jackson H., Ahlijanian M. K., Saccomano N. A., Volkman R. A., Functional consequences of posttranslational isomerisation of Ser<sup>46</sup> in a calcium channel toxin. *Science* (1994b) **266**, 1065-1068.
- Hess P., Calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Neurosci.* (1990) **13**, 337-356.

-Llano, I., Dipolo R., Marty A., Calcium-induced calcium release in cerebellar Purkinje cells. *Neuron* (1994) **12**, 663-673.

-Lyle T. A., Brady S. F., Ciccarone T.M., Colton C. D., Palevada W. J., Veber D. F., Nutt R. F., Chemical synthesis of rat atrial natriuretic factor by fragment assembly on a solid support. *J. Org. Chem.*, (1987) **52**, 3752.

-Mintz I. M., Venema V. J., Adams M. E., Bean B. P., Inhibition of N- and L-type  $Ca^{2+}$  channels by the spider venom toxin  $\omega$ -Ag-IIIa. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A* (1991) **88**, 6628-6631.

-Mintz I. M., Venema V. J., Swiderek K. M., Lee T. D., Bean B. P., Adams M.E., P-type calcium channels blocked by the spider toxin  $\omega$ -Aga-IVA. *Nature* (1992) **355**, 827-829.

-Nishio H., Kumagaye K. Y., Kubo S., Chen Y., Momiyama A., Takahashi T., Kimura T., Sakakibara S., Synthesis of  $\omega$ -agatoxin and its related peptides. *Biochem. and Biophysical research communication* (1993) **196**, 1447-1453.

-Nutt R. F., Brady S. F., Lyle T. A., Ciccarone T.M., Colton C. D., Palevada W. J., Veber D., Palevada W. J., Veber D. F., Winkquist R., Synthesis of atrial natriuretic factor and highly active analogs. *J. protides of the biological Fluids*, (Peeters, Ed) Brussels, Belgium (1986) **34**, 55-58.

-Quistad G.B., Suwanrumpha S., Jarema M.A., Shapiro M.J., Skinner W.S., Jamieson G.C., Lui A., Fu E.W., Structures of paralytic acylpolyamines from the spider *Agelenopsis aperta*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1990) **169**, 51-56.

-Skinner W. S., Adams M. E., Quistad G. B., Kataoka H., Cesarin B. J., Ederlin F. E., Schooley D. A., Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *J. Biol. Chem.* (1989) **264**, 2150-2155.

-Teramoto T., Kuwada M., Niidome T., Sawada K., Nishizawa Y., Katayama K., A novel peptide from funnel web spider venom,  $\omega$ -Aga TK, selectively blocks P-type calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1993) **196**, 134-140.

-Tsien R. W., Lipscombe D., Madison D. V., Bley K. R., Fox A. P., Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* (1988) **11**, 431-438.

-Turner T. J., Adams M.E., Dunlap K., calcium channels coupled to glutamate release identified by  $\omega$ -Aga-IVA. *Science* (1992) **258**, 310-313.

-Yu H., Rosen M. K., Saccomano N. A., Phillips D., Volkman R. A., Schreiber S. L., Sequential assignment and structure determination of spider toxin  $\omega$ -Aga IVB. *Biochemistry* (1993) **32**, 13123-13129.

# SOLID PHASE SYNTHESIS OF $\omega$ -AGATOXIN IV A, A P-TYPE CALCIUM CHANNEL BLOCKER.

Jamila Najib, Thierry Letailleur, Jean-Claude Gesquière and André Tartar

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, CNRS URA 1309 and Institut Pasteur de Lille, France.

**Key words** : Solid phase synthesis, calcium channel blocker, spider toxins, side reaction, peptide folding.

**address correspondence to:**

Mrs Jamila Najib

Institut Pasteur

Chimie de Biomolécules

1, rue A. Calmette

59019 Lille cedex, France

Tel:( 33)-20-87-77-47

Fax: (33)-20-87-73-77

**Abbreviations:**

Acm, acetamidomethyl;

Boc, tertio-butyloxycarbonyl;

DIEA, diisopropylethylamine;

DCM, dichloromethane;

HOBt, hydroxybenzotriazole;

NMP, N-methylpyrrolidone;

TFA, trifluoroacetic acid;

GSH, reduced glutathione;

GSSG, oxidized glutathione;

PDMS, Plasma Desorption Mass Spectrometry;



**ABSTRACT.**

$\omega$ -agatoxin IVA, isolated from the venom of funnel web spider *Agelenopsis aperta*, blocks potently and selectively P-type calcium channels. This toxin, composed of 48 amino acids and containing eight cysteine residues, was synthesized by the solid phase procedure. The Cys residues were protected by acetamidomethyl (Acm) groups which were removed by mercuric acetate. During treatment with mercuric acetate, a by-product was detected, involving modification of tryptophan residues by the Acm groups. This side reaction can be completely prevented by addition of an excess of tryptophan in the reaction medium during Acm deprotection.

The resulting reduced peptide was submitted to an oxidative refolding, in different conditions in order to determine the most favorable protocol. After formation of the four disulfide bonds, the toxin was purified by successive preparative HPLC, on two different supports, and fully characterized by analytical HPLC, capillary electrophoresis, amino-acid analysis, mass spectrometry and Edman degradation. It was found to block the P-type calcium channel with a similar biological potency as described for the natural product.

## INTRODUCTION

The venom of funnel web spider *Agelenopsis aperta* contains three classes of toxins. The  $\alpha$ -agatoxins, a family of low molecular weight acylpolyamines, block the glutamate-sensitive receptor channel complex in insect muscle, inducing a reversible paralysis. The  $\mu$  and  $\omega$ -agatoxins are polypeptides which affect presynaptic voltage-sensitive ion channels [1, 2]. The  $\mu$ -agatoxins cause irreversible paralysis in lepidopterous insects and flies, and like scorpion toxins, induce repetitive activity in motor neurons and increase the transmitter release from presynaptic stores at neuromuscular junctions. The  $\omega$ -agatoxins produce durable suppression of neurotransmitter release from presynaptic stores, they act with antagonism of voltage sensitive calcium channel.

It has been recently shown that  $\omega$ -agatoxin IVA ( $\omega$ -Aga IVA), isolated from the venom of funnel spider, *Agelenopsis aperta* blocks a sensitive P-type voltage dependent calcium channel [3]. The primary structure analysis showed that  $\omega$ -Aga IVA contains 48 amino acids including eight cysteine residues:

H-Lys-Lys-Lys-Cys-Ile-Ala-Lys-Asp-Tyr-Gly-Arg-Cys-Lys-Trp-Gly-Gly-Thr-Pro-Cys-Cys-Arg-Gly-Arg-Gly-Cys-Ile-Cys-Ser-Ile-Met-Gly-Thr-Asn-Cys-Glu-Cys-Lys-Pro-Arg-Leu-Ile-Met-Glu-Gly-Leu-Gly-Leu-Ala-OH

Recently, the synthesis of this toxin was described by Nishio *et al* [4, 5] using a solution procedure. A solid phase procedure was described in a preliminary report by Ahlijanian *et al.* [6] but with very low yield (0,5% based on the peptide-SH). In this work we report the detailed solid phase synthesis of  $\omega$ -Aga IVA using a Boc/benzyl strategy, and the optimization of the folding and reoxidation steps. We also report the solution to avoid the side products involving modifications of tryptophan residues by the Acn groups, during the mercuric acetate deprotection step.

## MATERIALS AND METHODS

### 1- Materials

Boc-protected amino acids were purchased from Propeptide (Vert-le-petit, France), Boc-Ala-phenylacetamidomethyl-resin (Boc-Ala-PAM) was from Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA), N-methylpyrrolidone (NMP), *p*-cresol, oxidized and reduced glutathione were from Aldrich (Steinheim, Germany). *p*-thiocresol and hydroxybenzotriazole (HOBt) were from Janssen Chimica (Geel, Belgium). HF was from Union Carbide (Oevel, Belgium). All chemical solvents were from Janssen Chimica and Aldrich. The peptide chains were assembled on an ABI 431A peptide synthesizer, Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA). The preparative HPLC was performed on a Shimadzu liquid chromatography Model LC-6A, analytical HPLC analysis were performed on a system Gilson Model 302. Capillary electrophoresis was performed on an Applied Biosystems Model 270 A, Inc. (Foster City, CA) in the following conditions: field, 25 kV; current, 28  $\mu$ A; capillary length, 50 cm; capillary diameter, 50  $\mu$ m; fused silica. The separation was performed using a Buffer solution of 20 mM sodium citrate, pH 2.5, and a temperature of 30°C. The detection was performed at 200 nm.

The molecular mass was determined using a Bio-Ion 20 time of flight Plasma Desorption Mass Spectrometer (PDMS) (Uppsala, Sweden) in positive mode using  $^{252}\text{Cf}$  as a source of fission fragments or using an API (Perkin-Elmer Sciex) of simple-quadrupole Ion Electrospray Mass Spectrometer, equipped with an ion-spray (nebulizer assisted electrospray) source [Sciex, Toronto, Canada].

Amino acid analysis was performed using a Beckman 6300 amino acid analyzer (Beckman instruments, Fullerton, CA), after hydrolysis with 6N HCl containing 0.25% phenol at 110°C for 24 hours. Edman degradation was performed using an Applied Biosystems Inc. 470 A gas-phase sequencer (Foster City, CA) and the 03RPTH program. Phenylthiohydantoin derivatives of amino acid were identified with an Applied Biosystems 120 A on-line phenylthiohydantoin amino acid analyzer.

### 2- Methods

#### *A - Solid phase peptide synthesis*

Solid phase peptide synthesis was carried out on an automated synthesizer ABI 431A (Applied Biosystems Inc.) using a standard Boc/Benzyl strategy starting with 0.5 mmol of Boc-Ala-

PAM-resin (0.75 mmol/g). The standard cycle was as follows: deprotection with 25% TFA in DCM for 3 min and 50% TFA in DCM for 16 min, neutralization with 5% DIEA in DCM for 4 min. Each amino acid (4 equiv.) was coupled twice by dicyclohexylcarbodiimide / hydroxybenzotriazole (4 equiv.) for 2 x 60 min and followed by a capping step of the unreacted amino groups, with 10% acetic anhydride and 5% DIEA in NMP for 9 min. Side chain protecting groups were as follows: Arg(Tos), Asp(Ochex), Cys(Acm), Glu(Ochex), Lys(2-Cl-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Met(O), Trp(Formyl) and Tyr(Br-Z). Following assembly of the 48 residues, 4.6 g of protected peptide resin was obtained (expected: 4.67g).

The formyl group on Trp<sup>14</sup> was removed from the peptide, prior to the cleavage from its support by treatment with 10% piperidine in NMP for 2 x 2 h. The peptidyl resin was then treated with 50% TFA in DCM for 20 min to remove the amino-terminal Boc, and the peptide was cleaved from the resin and simultaneously deprotected according to a low and high HF procedure [7]: the resin (1g) was treated with anhydrous HF (2.5 ml) in the presence of *p*-cresol (0.75 g), *p*-thiocresol (0.25 g) and dimethylsulfide (6.5 ml) at 0°C. After 3 h hydrogen fluoride and dimethylsulfide were removed by vacuum evaporation and the residual scavengers and by-products were extracted with diethyl ether. The reaction vessel was then recharged with *p*-cresol (0.75 g), *p*-thiocresol (0.25 g) and 10 ml of anhydrous HF and the mixture was allowed to react at 0°C for 1.5 h. Hydrogen fluoride was removed by evaporation and the residue was triturated with diethyl ether. The residue was filtered off, washed with diethyl ether and extracted with 200 ml of 5% aqueous acetic acid and lyophilized. The crude product was analyzed by reversed-phase HPLC on a Vydac C18 column (4.6 x 250 mm, 5 μ, 100Å) using a 60 min linear gradient from 0 to 100% Buffer B (Buffer A: 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O and Buffer B/ 0.05% TFA, 60% CH<sub>3</sub>CN in H<sub>2</sub>O) at a flow rate of 0.7 ml / min and detection was performed at 215 nm.

The S-Acm protected peptide was purified by preparative reversed-phase HPLC on a Vydac C18 (column 20 x 200 mm, 7μ, 300 Å) using the Buffers described above: from 0 to 40% Buffer B in 15 min, 40 to 60% Buffer B in 40 min. The flow rate was 3 ml/min and detection was performed at 280 nm.

### ***B - Disulfide bond formation and purification***

1)-Deprotection of S-Acm peptide with mercuric acetate: to the peptide (200 mg) dissolved in 5% aqueous acetic acid (40 ml), mercuric acetate (1.1 eq./Acm) was added, under N<sub>2</sub> and the solution was stirred at room temperature for 4 hours [8]. The solution was diluted with water (60 ml) and the free mercuric ions were precipitated by bubbling hydrogen sulfide through the

solution for 10 min. The pH was adjusted to 8 with diluted ammonium hydroxide and the solution was filtered to give a fully deprotected peptide.

2)-Oxidative folding reaction. The preceding solution of fully deprotected peptide was divided out to 12 equal small samples (5 ml) which were submitted to oxidative folding reaction. Several attempts were made in order to determine the most suitable oxidation conditions. In each case, mentioned below, the oxidative folding of the deprotected peptide was monitored by reversed-phase HPLC.

*a) air oxydation.* The octa-SH peptide was oxidized in NH<sub>4</sub>OAc Buffer at different concentrations ranging from 0.1 M to 2 M, at peptide concentrations of 0.1 mg/10 ml and 1 mg /10 ml, at pH 6 and at pH 8, in the presence or absence of reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG) with respectively the following ratio: 60 / 6. All oxidations were performed both at 4°C and at room temperature.

*b) Dimethylsulfoxide oxidation.* The octa-SH peptide was diluted in 5% aqueous acetic acid at a final peptide concentration of 0.5 mg/ml ( $9.6 \cdot 10^{-4}$  M), the pH was adjusted to 6.5 with ammonium bicarbonate and dimethylsulfoxide (20% of peptide solution volume) was added. The resulting mixture was stirred for 10 h at room temperature [9].

*c) Potassium ferricyanide oxidation.* The octa-SH peptide was diluted in water at a peptide concentration of 1 mg/10 mL ( $2 \cdot 10^{-5}$  M) and the pH was adjusted to 8.5 with diluted ammonium hydroxide. The thiol groups were oxidized to disulfide by dropwise addition of a potassium ferricyanide 1 mM solution until a yellow color persisted (32 equiv./peptide) [10]. The mixture was stirred for 5 h at room temperature. Then the pH was adjusted to 5 with acetic acid. An anion exchange ion resin (70 equiv.) (Bio-Rad, AG 2-X10, chloride form) was added and the mixture was stirred for 1h. The resin was removed by filtration.

3)- Simultaneous cleavage of Acm groups and disulfide bond formation with thallium(III) trifluoroacetate [11]. The S-Acm peptide (20 mg, 5.5 μM) was dissolved in trifluoroacetic acid (3 ml) and treated with Tl(CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>3</sub> (1.2 equiv.) in the presence of anisole alone (50 μl) or anisole (25 μl) and glycerol (25 μl) in an ice bath for 1 h [11]. Trifluoroacetic acid was removed by vacuum evaporation. The oxidized peptide was precipitated in dry ether and the resulting precipitate was collected by centrifugation, dissolved in 5% aqueous acetic acid and lyophilized.

### ***C - Synthesis and characterization of w-Aga IVA under optimal conditions***

According to the previous experiments, the following optimal conditions were used: the S-Acm peptide (200 mg) was deprotected with mercuric acetate as described above in the presence of tryptophan (10 molar excess over the peptide). The octa-SH peptide was dissolved in 0.2 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  pH 8 at a peptide concentration of  $2 \cdot 10^{-5}$  M, in the presence of reduced and oxidized glutathione; the ratio of peptide: GSH: GSSG was 1:60:6. The solution was stirred at  $4^\circ\text{C}$  for 48 h and the reaction was stopped by acidification to pH 2.5 with TFA. The solution was filtered on a Millipore System  $0.22 \mu$  and pumped directly at  $4^\circ\text{C}$  onto a preparative reversed-phase HPLC Vydac 218TP C18 column (10 x 500 mm,  $5\mu$ , 100 Å). The column was then eluted using buffers described above and gradient of 0 to 40% Buffer B in 15 min, 40 to 40% Buffer B in 10 min and 40 to 60% Buffer B in 80 min, at a flow rate of 2 ml/min and the detection was performed at 280 nm. This was followed by purification on HPLC Machery Nagel Nucleosil 5 CN (10 x 500 mm,  $5 \mu$ , 100Å) using the same eluants and a gradient of 0 to 50% Buffer B in 20 min, 50 to 50% Buffer B in 10 min and 50 to 80% Buffer B in 100 min, at flow rate of 2 ml/min and the detection was performed at 225 nm.

The amino acid composition of the purified peptide was determined as described above. The molecular mass of the synthetic peptide was determined by a Bio-Ion 20 time of flight Plasma Desorption Mass Spectrometer (PDMS). The homogeneity of the purified product was tested by two different systems. It was analyzed by reversed-phase HPLC on a Vydac C18 column (4.6 x 250 mm,  $5 \mu$ , 100Å) using a 60 min linear gradient from 0 to 100% Buffer B (Buffer A: 0.05% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$  and Buffer B: 0.05% TFA, 60%  $\text{CH}_3\text{CN}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ) at flow rate of 0.7 ml / min and detection was performed at 215 nm, and it was also analyzed on an Applied Biosystems Model 270 A Capillary electrophoresis in the conditions previously mentioned.

### ***D - Biological activity***

Measurement of voltage clamped calcium currents in slices from young rats Purkinje cells. Recording obtained from a cerebellar slice of a 9-days old rat. This slice superfused at room temperature with a bicarbonate-Buffered saline (BBS) containing: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 26 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 25 mM glucose. This solution was pre-equilibrated with oxygen and bicarbonate, bringing its pH to 7.4, and was supplemented with 4 mM tetraethylammonium-chloride and  $0.5 \mu\text{M}$  tetrodotoxin to block voltage dependent  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  currents respectively. A tight-seal whole-cell recording was

obtained with a patch-clamp pipette containing: 155 mM CsCl, 10 mM Cs-HEPES, 0.4 mM Na-GTP, 4 mM Na-ATP, 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.1 mM fura-2 (pH 7.3).

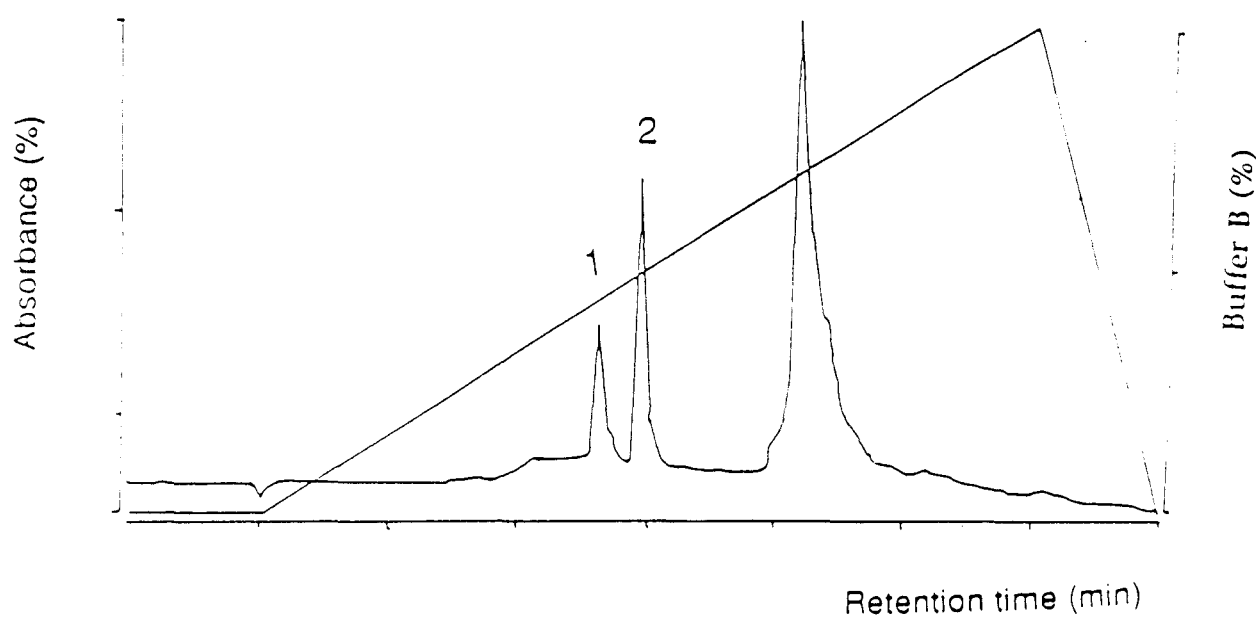
Control current records obtained by stepping the membrane potential from -70 mV to various test potentials ranging from -50 mV to +50 mV, in 20 mV increments. The inhibition by  $\omega$ -Aga IVA of current was recorded in the same conditions after superfusion of the slice with 160 nM of  $\omega$ -Aga IVA. (Reproduced with permission from Llano et al. 1994 and Neuron journal) [12].

### III - RESULTS AND DISCUSSION

The synthesis of  $\omega$ -Aga IVA was performed on solid phase using a Boc/Benzyl chemistry. After deprotection, onto the resin, of the formyl group from the tryptophan side chain with piperidine, all protecting groups, except the AcM groups on cysteine residues, were removed by hydrogen fluoride treatment (Fig. 1). AcM protection of cysteine was used in order to allow an easy purification of the crude S-protected peptide prior to the oxidation step. The determination of the molecular weight of the crude S-AcM products, obtained after HF treatment, by ion electrospray mass spectrometry showed several peaks (Fig. 2), one corresponds to the expected  $M+8AcM$  while other peaks correspond to  $M+7AcM$ ,  $M+6AcM$  and  $M+5AcM$ , providing evidence for partial loss of AcM during HF cleavage of the peptidyl-resin. Although the mass distribution does not fit exactly to a binomial expression (indicating that the successive deprotections cannot be considered as completely independent events), it corresponds roughly to 10% individual deprotection of the AcM groups. Instability of AcM groups has been previously reported by Nutt *et al.* [13], Brady *et al.* [14] and Lyle *et al.* [15], and was expected, due to the use of a thiol scavenger (*p*-thiocresol in our case) during HF cleavage. However, it proved to be more extensive in this case than in others similar syntheses performed in our laboratory [16, 17]. The presence of these peaks is not due to the cleavage of the S-AcM groups during the process of mass measurement as this was not observed when pure fully S-AcM protected peptides were examined following the same procedure. The crude S-AcM peptide was submitted to preparative reversed-phase HPLC, yielding three main fractions which were submitted to amino acid analysis. The three fractions demonstrated the expected amino acid composition. Due to the fact that mass spectrometry and amino acid analysis seemed to indicate that the loss of the AcM group(s) had not been accompanied by any other modification, the three AcM-peptide fractions were pooled and treated with mercuric acetate to completely remove the AcM groups.

In order to optimize the oxidation step, a large number of different conditions were systematically tested by comparison of the HPLC profile of the reaction medium. Disulfide bonds formations from the Cys(AcM) peptide were carried out according to two different





**Fig. 1** Reversed-phase HPLC of crude product from HF cleavage, performed on a nucleosil C18 column (4.6 x 250 mm) using as Buffer B: 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN-water. Peaks 1 and 2 are not peptidic materials. Flow rate was performed at 0.7 ml/min and detection was at 215 nm.

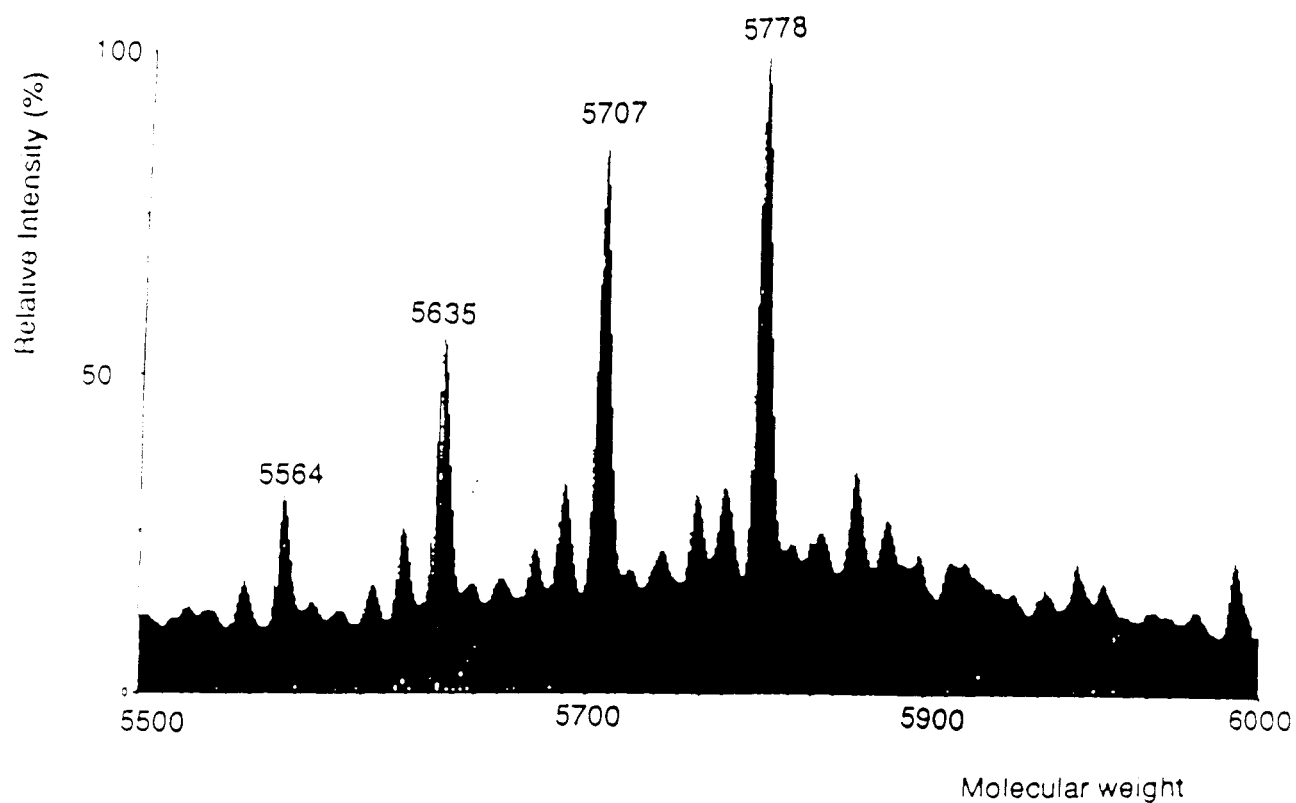
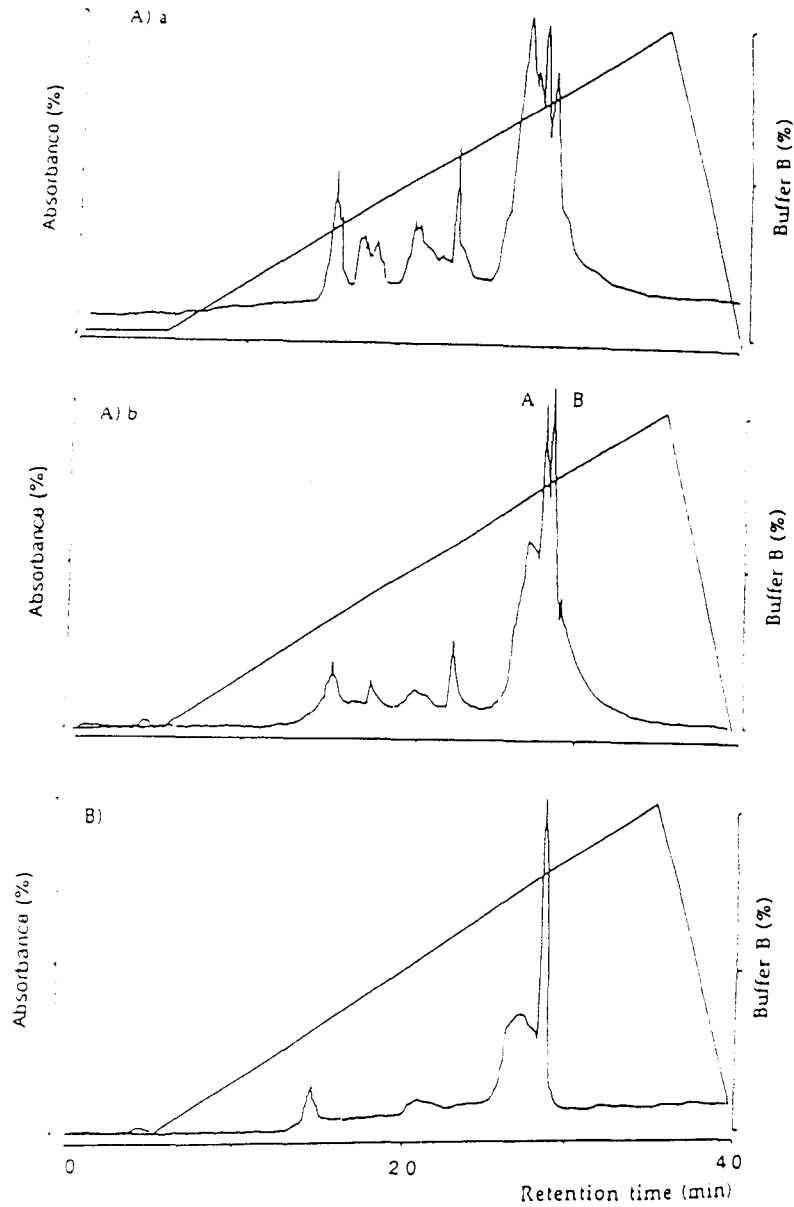
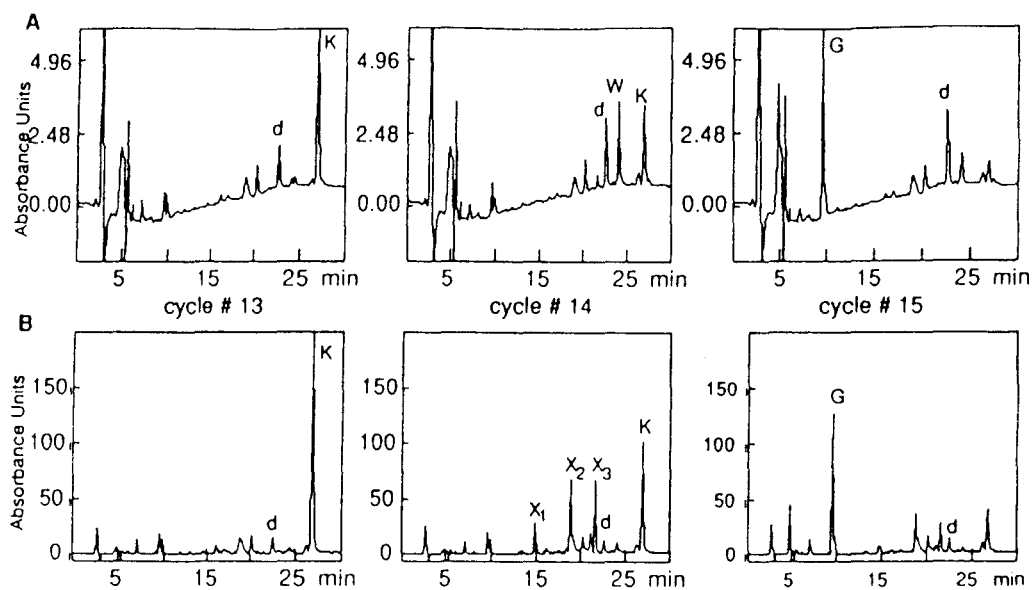


Fig. 2 Ion Electro spray Mass Spectra of S-Acm crude product after HF cleavage. The peak at MW = 5778 corresponds to the expected M+8Acm, the other peaks correspond to M+7Acm, M+6Acm and M+5Acm.

strategies. In the first case, a two-step protocol was used in which deprotection of Cys(Acm) with mercuric acetate was followed by disulfide bond formations. Different oxidation conditions were tested: potassium ferricyanide, DMSO, air oxygen, in the presence or absence of the redox system, at different concentrations of NH<sub>4</sub>OAc, at different pH, at room temperature and 4°C (Fig. 3Aa and 3Ab). The second strategy involved concomitant Acm cleavage and disulfide bond formations with thallium(III) trifluoroacetate. The results show that the oxidation conditions which give the best results, as judged by the HPLC profile of the oxidative reaction medium, are: deprotection with mercuric acetate followed by an oxidative folding reaction of the octa-SH peptide in 0.1 M NH<sub>4</sub>OAc Buffer (pH 8), at a peptide concentration of 2.10<sup>-5</sup> M, in the presence of reduced and oxidized glutathione, at 4°C for 48 h. The HPLC analysis of the reaction mixture showed two major products A and B (Fig. 3Ab). The amino acid composition of products A and B were identical (Trp was not determined). However, molecular weight determination by ion electrospray showed that product B had the expected mass, while product A showed an excess of 71 mass units which corresponds to the mass of an Acm group. Thiol determination according to Ellman test [18], performed on product A yielded a negative result, not consistent with our initial hypothesis that one of the S-Acm groups had remained undeprotected as, in this case only three disulfides could have been formed, leaving one cysteine with a free sulfhydryl group (the molecular weight determination excluded the formation of a disulfide-linked dimer). This led us to suspect that the Acm group could have migrated on an other side chain, allowing the formation of the four disulfides. In order to check this hypothesis, both peptides were submitted to Edman degradation. This method allowed to confirm that product B had the expected sequence for ω-Aga IV A. By contrary, during the sequencing of product A, no PTH-Trp could be detected at cycle 14, while three unidentified peaks (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>) were observed (Fig. 4). One hypothesis to account for this side reaction, consistent with the loss of Acm groups observed on the crude peptide obtained after hydrogen fluoride treatment, was that the indole ring had been modified by electrophilic species (such as  ${}^+\text{CH}_2\text{-NH-CO-CH}_3 \longleftrightarrow \text{CH}_2=\text{NH}^+\text{-CO-CH}_3$ ) during the synthesis or HF cleavage. An other possibility being that this modification had occurred during the cleavage of the Acm by mercuric acetate. In order to choose between these two possibilities, an excess of tryptophan



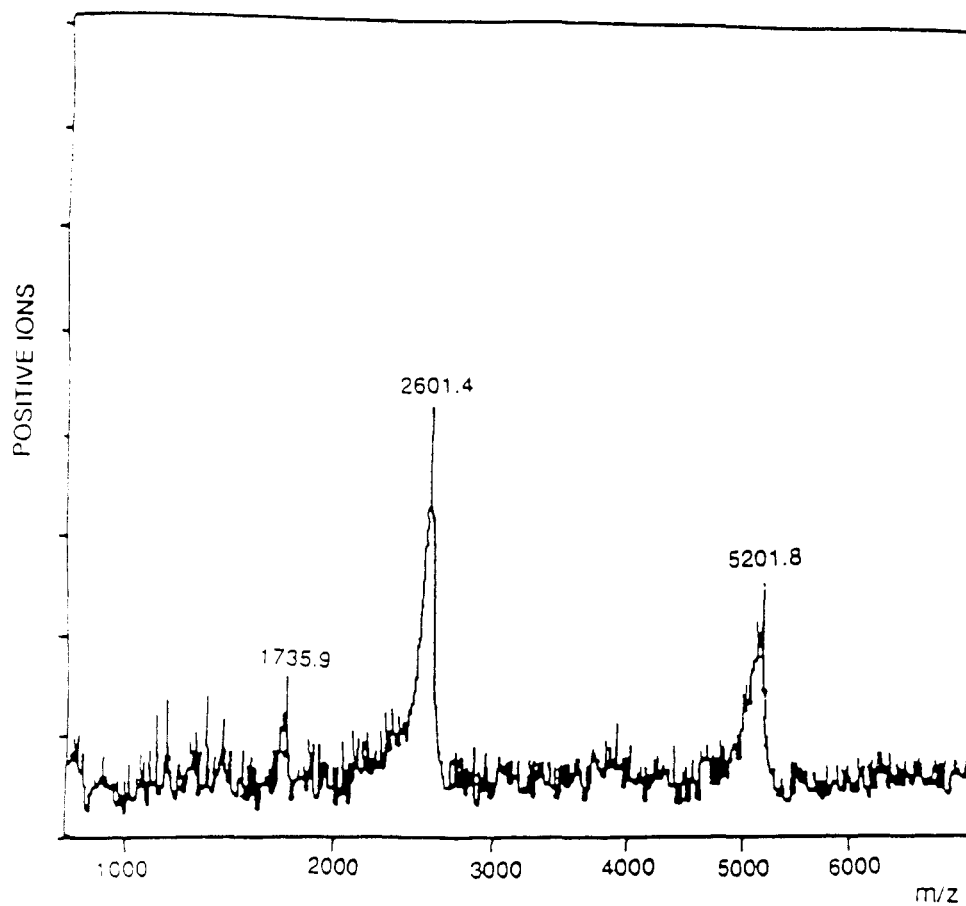
**Fig. 3** Reversed-phase HPLC after 48 hours of oxidative refolding using a nucleosil C18 column (4.6 x 250 mm). A) Deprotection of Cys-Acm was performed with mercuric acetate without addition of tryptophan and the oxidation was performed in 0.1M ammonium acetate at pH 8 in the presence of reduced and oxidized glutathione. a) at room temperature. b) at 4°C ; peak A corresponds to the side product (with modified Trp) and peak B corresponds to the  $\omega$ -Aga IVA. B). Deprotection of Cys-Acm was performed with mercuric acetate in the presence of Tryptophan (10 molar excess over the peptide) and the oxidation was performed at 4°C in the presence of reduced and oxidized glutathione in 0.2M ammonium acetate at pH 8.



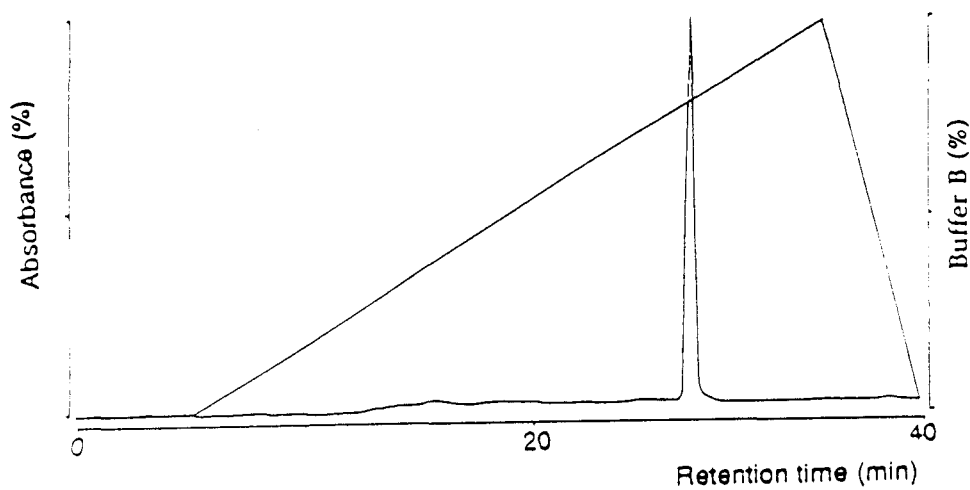
**Fig. 4** Edman degradation profiles, d = diphenylthiourea. A) Edman degradation of product 2 : cycle 13 corresponds to PTH-Lys, cycle 14 corresponds to PTH-Trp (and the overlap from PTH-Lys) and cycle 15 corresponds to PTH-Gly. B) Edman degradation of product 1 : cycle 13 corresponds to PTH-Lys, cycle 14 corresponds to presence of non identified peaks (and the overlap from PTH-Lys) , cycle 15 corresponds to PTH-Gly.

(10 molar excess over the peptide) was added during the treatment with mercuric acetate, to trap alkylating species. Reversed-phase HPLC of the oxidation reaction medium showed the formation of a major peak (Fig. 3B), corresponding to product B and the complete disappearance of peak A, indicating that the migration of AcM group on tryptophan occurs during the mercuric acetate deprotection step. Recently, an other modification involving the side chain of tryptophan during AcM deprotection by mercuric acetate has been reported by Nishio *et al.* which consists in the incorporation of a mercaptoethanol moiety in various positions of the indole ring [19]. These observations indicate that great care must be exercised during AcM deprotection of tryptophan-containing peptides and that addition of tryptophan as a scavenger can greatly improve this step. The small quantities of by-product isolated did not allow for NMR studies, moreover, it is highly probable that modification of tryptophan occurs at several positions of the indole ring leading to an heterogeneous product which, due to the size of the molecule cannot be resolved.

In order to obtain large quantities of  $\omega$ -Aga IVA, the deprotection with mercuric acetate was performed on 200 mg of S-AcM protected peptide, followed by the oxidation under the optimal conditions (in 0.2 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  pH 8 at peptide concentration of  $2 \cdot 10^{-5}\text{M}$ , in the presence of GSH/GSSG, at  $4^\circ\text{C}$ ) and the main product was isolated to homogeneity. Two steps of preparative HPLC on two different supports (octadecylsilane and cyanoethyl) afforded 20 mg of pure  $\omega$ -Aga IVA (determined by quantitative amino acid analysis). This corresponds to 10% for the oxidation step, based on the S-AcM peptide and to an overall yield of 5% based on the load of the starting peptidyl-resin. The amino acid composition of the final product was determined as follows: Asp 1.9 (3), Thr 1.9(3), Ser 0.9 (1), Glu 2.2 (3), Pro 1.9 (3), Gly 8.0 (9), Ala 2 (3), Cys 6.0 (9), Met 1.8 (3), Ile 3.8 (5), Leu 3.1 (4), Tyr 0.8 (1), Lys 5.9 (7), Arg 3.8 (5). The correct molecular weight was confirmed by mass spectrometric analysis (Fig. 5) which showed 5201.8 as  $(\text{M}+\text{H})^+$ , 2601.4 as  $(\text{M}+2\text{H})^{2+}$  and 1735.9 as  $(\text{M}+3\text{H})^{3+}$ . The purity was controlled by reversed-phase HPLC and capillary electrophoresis (Fig. 6 and 7). Synthetic  $\omega$ -Aga IVA was tested for its capacity to block P-type calcium channel in Purkinje cells as shown in (Fig. 8). The potency and the selectivity of the synthetic toxin were similar to those reported

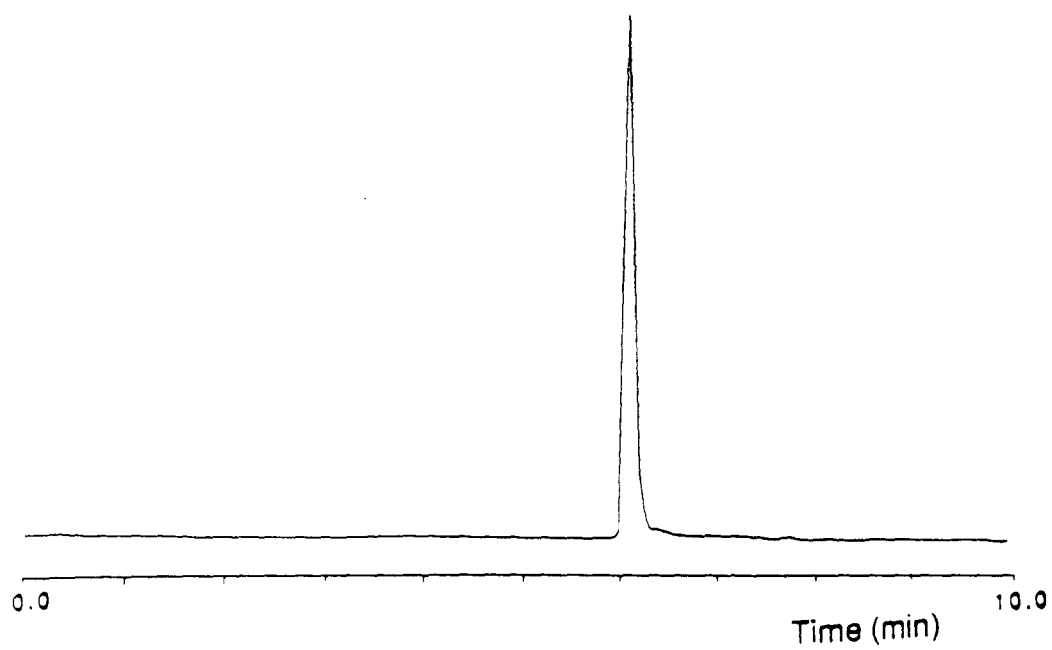


**Fig. 5** Plasma Desorption Mass Spectra in positive mode of synthetic  $\omega$ -Aga IVA. The peak at MW=5201.8 corresponds to the expected  $(M+H)^+$  ion. The additional peaks at 2601.4 and 1735.9 correspond respectively to  $(M+2H)^{2+}$  and  $(M+3H)^{3+}$  ions.

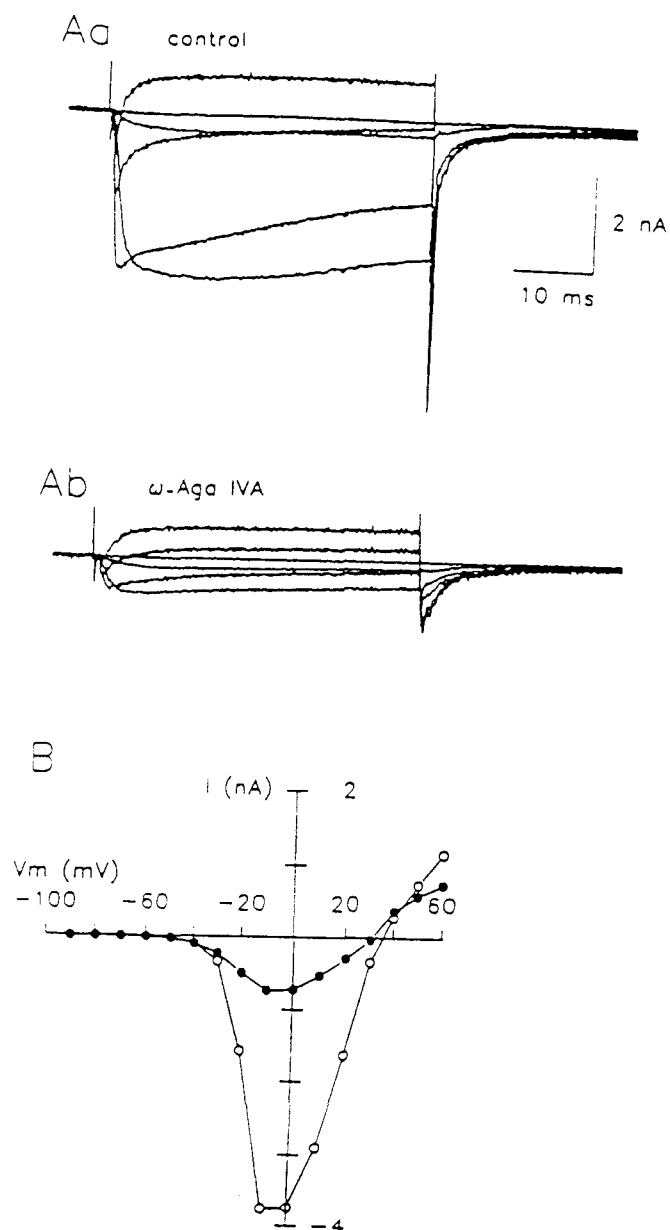


**Fig. 6** Reversed-phase HPLC of synthetic and purified  $\omega$ -Aga IVA on a nucleosil C18 column (4.6 x 250 mm) using as Buffer B: 0.05% TFA in CH<sub>3</sub>CN-water. Flow rate 0.7 ml/min and detection was performed at at 215 nm.





**Fig. 7** Capillary electrophoresis profile of purified synthetic  $\omega$ -Aga IVA. Analysis was performed on a 50 cm coated capillary, in 20 mM sodium citrate, pH 2.5. Injection: 1s. Temperature: 30°C. Detection: 200 nm.



**Fig. 8** Effects of  $\omega$ -Aga IVA on  $\text{Ca}^{2+}$  currents of cerebellar Purkinje cells. Recording obtained from a cerebellar slice of a 9-days old rat. A - a) Control current records obtained by stepping the membrane potential from -70 mV to various test potentials ranging from -50 mV to +50 mV, in 20 mV increments. b) Responses to the same voltage steps after superfusion of the slice with 160 nM of  $\omega$ -Aga IVA.

B - I-V curves in control BBS (open symbols) and in the presence of  $\omega$ -Aga IVA (filled symbols). Reproduced with permission from Llano et al. 1994 and *Neuron* journal (7).

for the natural product. The Acn modified product (product 1, Figure 3Ab) was shown to induce a leak of  $\text{Ca}^{2+}$ .

In conclusion, we described an optimized preparation of  $\omega$ -Aga IVA, using a solid phase method which will allow the synthesis of various analogs in order to perform structure-activity studies. A major improvement during this synthesis was the addition of an excess of tryptophan during the mercuric acetate treatment which prevents a side reaction involving the side chain of tryptophan.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would like to thank M. Kouach and G. Briand, Faculté de Médecine de Lille, for their assistance with ion electrospray mass spectrometry; I. Llano and A. Marty, Ecole Normale Supérieure de Paris, for testing the biological activity; P. Sautière, Institut Pasteur de Lille, for sequencing the synthetic peptides and H. Drobecq, Institut Pasteur de Lille, for his technical assistance.

**REFERENCES**

- [1] M.E. Adams, V.P. Bindokas, L. Hasegawa and V.J. Venema (1990).  $\omega$ -Agatoxins: novel calcium channel antagonists of two subtypes from funnel web spider (*Agelenopsis aperta*) venom. J. Biol. Chem. **265**, 861-867.
- [2] W.S. Skinner, M.E. Adams, G.B. Quistad, H. Kataoka, B.J. Cesarin, F.E. Enderlin and D.A. Schooley (1989). Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. J. Biol. Chem. **264**, 2150-2155.
- [3] , I.M. Mintz, V.J. Venema, K.M. Swiderek, T.D. Lee, B. P. Bean and M.E. Adams (1992). P-type calcium channels blocked by the Spider toxin  $\omega$ -Aga IVA. Nature **355**, 827-829.
- [4] H. Nishio, K.Y. Kumagaye, S. Kubo, Y. Chen, T. Kimura and S. Sakakibara in: Peptides, Chemistry, Structure and Biology, R.S Hodges and J.A. Smith Eds., p. 31-33, ESCOM, Leiden 1994.
- [5] H. Nishio, K.Y. Kumagaye, S. Kubo, Y. Chen, A. Momiyama, T. Takahashi, T. Kimura and S. Sakakibara (1993). Synthesis of  $\omega$ -Agatoxin IVA and its related peptides. Biochem. and Biophysical research communication **96**, 1447-1453.
- [6] M.K.Ahlajanian, G.C. Andrews, L.G. Contillo, B.C Guarino, L.D. Hirning, A.L. Mueller, D. Phillips, N.A. Saccomano, D.H. Singleton & R.A. Volkmann in: Peptides, Chemistry, Structure and Biology, R.S Hodges & J.A. Smith Eds., p 395-397, ESCOM, Leiden 1994.
- [7] J. P. Tam, W.F. Heath and R.B. Merrifield (1983). SN2 deprotection of peptides with a low concentration of HF in dimethyl sulfide: evidence and application in peptide synthesis. J. Am. Chem. Soc. **105**, 6442-6455.
- [8] D.F.Veber, J.D. Milkowski, S.L. Varga, R.G. Denkwalter and R. Hirschmann (1972). Acetamidomethyl. A novel thiol protecting group for cysteine. J. Am. Chem. Soc. **94**, 5456-5461.
- [9] J.P. Tam, C.R. Wu, W. Liu and J.W. Zhang (1991). Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications. J. Am. Chem. Soc. **113**, 6657-6662.

- [10] J. Rivier, R. Kaiser and R. Galyean (1978). Solid-phase synthesis of somatostatin and glucagon-selective analogs in gram quantities. Biopolymers **17**, 1927-1938.
- [11] N. Fuji, A. Otaka, S. Funakoshi, K. Bessho, T. Watanabe, K. Akaji, and H. Yajima (1987). Studies on peptides. CLII, 2. Syntheses of cystine-peptides by oxidation of S-protected cysteine-peptides with thallium (III) trifluoroacetate Chem. Pharm. Bull. **35**, 2339-2347.
- [12] I. Llano, R. Dipolo and A. Marty (1994). Calcium-induced calcium release in cerebellar purkinje cells. Neuron. **12**, 663-673.
- [13] R.F. Nutt, S.F. Brady, T.A. Lyle, T.M. Ciccarone, C.D. Colton, W.J. Paleveda, D.F. Veber and R.J. Winquist (1986). Synthesis of atrial natriuretic factor and highly active analogs. Protides of the Biological Fluids **34**, 55-58.
- [14] S.F. Brady, W.J. Paleveda and R.F. Nutt in: Peptides, Chemistry and Biology, G R. Marshall Eds., p. 192-194, ESCOM, Leiden. 1988
- [15] T.A. Lyle, S.B. Brady, T.M. Ciccarone, C.D. Colton, W.J. Paleveda, D.F. Veber and R.F. Nutt (1987). Chemical synthesis of rat atrial natriuretic factor by fragment assembly on a solid support. J Org. Chem. **52**, 3752-3759.
- [16] G. Lippens, J. Najib, S. Wodak, and A. Tartar (1995). NMR sequential assignments and solution of chlorotoxin, a small scorpion toxin That Blocks Chloride Channels. Biochemistry **34**, 13-21.
- [17] J. Najib, P. Sautière, J. C. Gesquière and A. Tartar in: Innovation and perspectives in solid phase peptide synthesis, R. Epton Eds., p. 615-618 1994
- [18] G.L. Ellman (1958). A colorimetric method for determining low concentration of mercaptans. Archives of Biochemistry and Biophysics **74**, 443-450.
- [19] H. Nishio, T. Kimura and S. Sakakibara (1994). Side reaction in peptide synthesis: Modification of tryptophan during treatment with mercury (II) acetate/2-mercaptoethanol in aqueous acetic acid. Tetrahedron Lett. **35**, 1239-1242.

## **VI-REACTIONS SECONDAIRES**

# SYNTHESE DIVERGENTE DES ANALOGUES DE LA SCYLLATOXINE ET MISE EN EVIDENCE D'UNE REACTION SECONDAIRE

## I- INTRODUCTION

Une famille de toxines animales est capable d'inhiber les canaux potassium activés par le calcium, à faible conductance. Ces canaux ont été décrits pour la première fois grâce à la haute affinité et spécificité de fixation de l'apamine qui est une toxine, de 18 acides aminés avec 2 ponts disulfure, extraite du venin d'abeille (Habermann, 1972). Depuis, ces canaux sont référencés comme canaux potassium sensibles à l'apamine. Plus récemment, chez les toxines de scorpion, une activité compétitive de celle de l'apamine vis à vis de sa fixation sur le récepteur a été démontrée. Ces toxines sont purifiées à partir de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*: scyllatoxine ou leiurotoxine I (Chicchi et al. 1988, Auguste et al., 1990) et à partir de *Androctonus mauretanicus mauretanicus*: PO5 (Zerrouk et al., 1993). Ce sont des toxines à chaîne courte de 31 acides aminés verrouillées par 3 ponts disulfure. L'alignement de ces 2 toxines montre une forte homologie de séquence (87%).

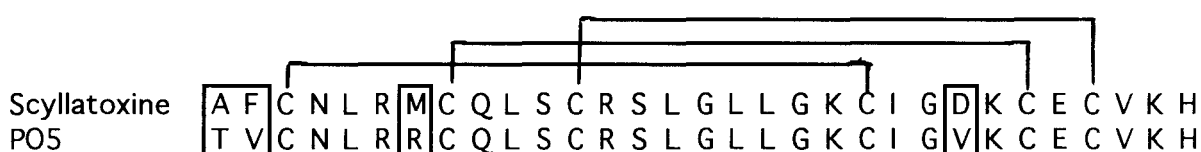


Figure 1 : Structure primaire et appariement des cystéines de la scyllatoxine et de la PO5.

Les structure tridimensionnelles de ces 2 toxines ont été déterminées par RMN (scyllatoxine (Martins et al., 1990) et PO5 (Meunier et al., 1993). Ces 2 toxines présentent le même motif structural hélice/feuillet. Les acides aminés 6 à 16 forment l'hélice  $\alpha$  et les acides aminés 18 à 29 forment le feuillet  $\beta$  avec un coude en position 23 et 24.

Récemment, des études portant sur les rapports structure-activité ont été décrites pour la scyllatoxine (Sabatier et al, 1994; Inisan et al., 1995) et pour la PO5 (Sabatier et al., 1993). Ces études montrent que les position 6 et 7 dans la séquence sont des



résidus clés pour l'activité des toxines. Ces résidus sont localisés dans une région de l'hélice  $\alpha$  du côté exposé au solvant. Lors de la détermination structurale de la PO5 (Meunier et al., 1993), le calcul du champ électrostatique de PO5 montre une large hétérogénéité dans la répartition des charges : la surface de l'hélice  $\alpha$  exposée au solvant est chargée positivement. Le remplacement dans la PO5 des arginines 6 et 7 par des leucines sur cette surface, provoque une chute très importante de la fixation sur le récepteur (le test de fixation par compétition avec l'apamine montre que la PO5 modifiée est 5000 fois moins active que la PO5 native). Le remplacement de la méthionine 7 par un résidu arginine dans la scyllatoxine augmente l'activité de fixation qui devient voisine à celle de la PO5 native (induit une augmentation d'activité d'un rapport de 5). Ces observations montrent que l'interaction électrostatique de cette zone courte participe directement à la reconnaissance du récepteur par la toxine.

Il a été démontré également que l'amidation de l'histidine 31 augmente considérablement l'affinité pour le récepteur de l'apamine mais n'affecte pas la neurotoxicité de la molécule (Sabatier et al., 1994).

Très récemment, il a été démontré par des études RMN effectuées sur les analogues [Arg<sup>7</sup>] scyllatoxine et [Leu<sup>6,7</sup>] PO5 que ces mutations, induisant des modifications d'activité, ne s'accompagnent pas de changement conformationnel (Inisan et al., 1995). Manifestement, ces variations d'activité sont dues à la nature chimique des chaînes latérales. Les calculs de structure montrent que les résidus 6 et 7 ont la même orientation dans les molécules natives et mutées.

Les analogues décrits ci dessus portent sur des modifications au niveau de l'hélice  $\alpha$  qui joue un rôle crucial dans l'activité de fixation de la toxine sur le récepteur.

D'autres modifications chimiques portant sur des résidus situés sur le feuillet  $\beta$ , tels que la transformation des lysines 20, 25 et 30 en homoarginine par action de la O-méthylsourée, ou la réaction de l'acide glutamique 27 avec l'ester méthylique de la glycine n'altèrent pas la liaison de la toxine avec son récepteur. Par contre ces résidus sont très importants pour l'activité biologique.

Dans le laboratoire, avant la publication des analogues cités ci dessus, nous avons entrepris une étude de relations structure-activité en commençant par l'introduction de modifications au niveau du résidu 27. Cet acide aminé, un acide

glutamique, est situé sur le feuillet  $\beta$  et sa chaîne latérale est orientée vers l'extérieur de la molécule.

Nous avons adopté une stratégie de synthèse divergente, de façon à obtenir, après une seule synthèse en phase solide, une série de modifications permettant d'accéder à tout un éventail de propriétés, portant sur la charge, l'encombrement ou l'hydrophilie. Ce concept permet également l'introduction de marqueur de fluorescence ou de fonctions permettant de faciliter les étapes de purification.

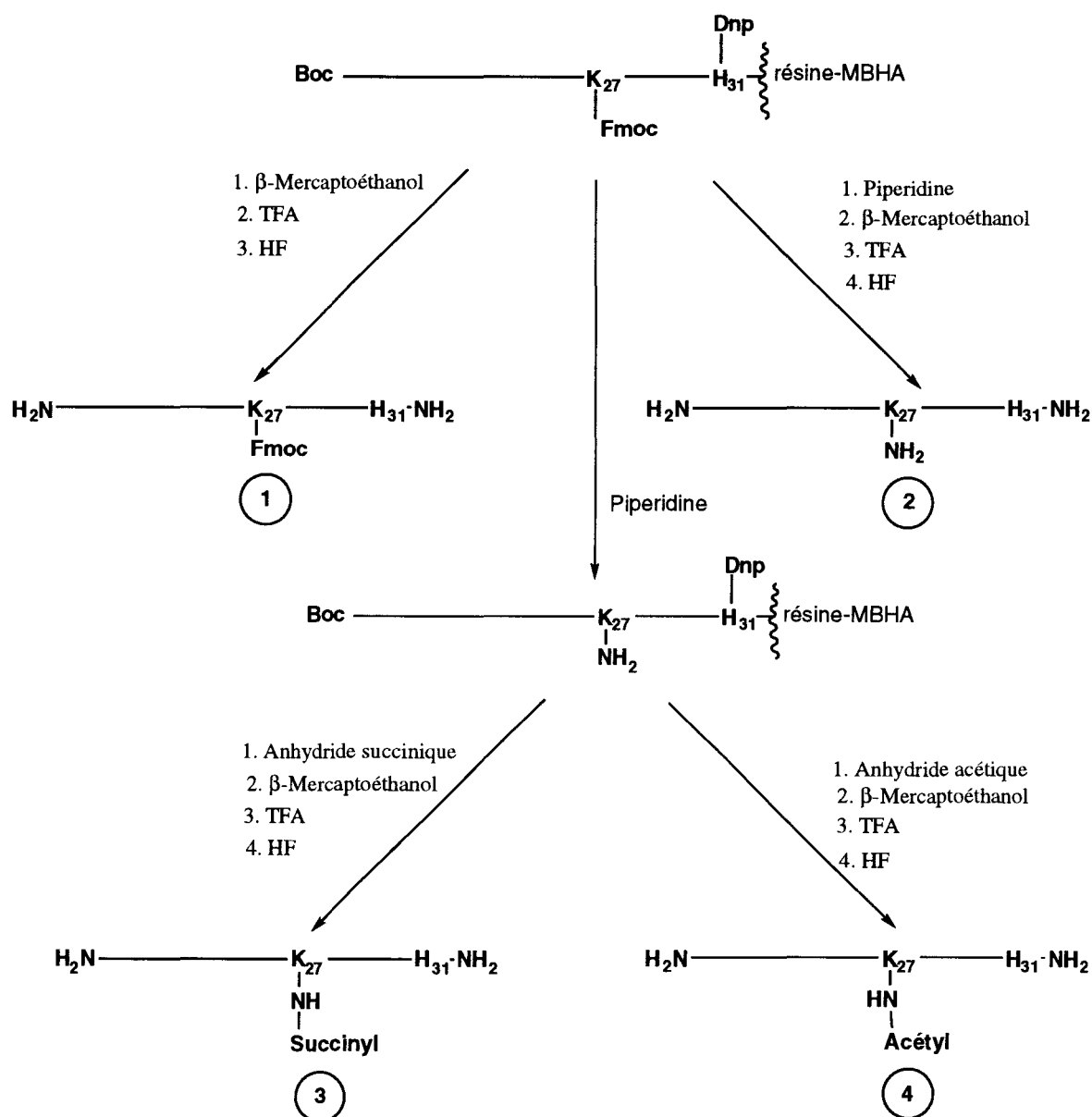
## II- SYNTHÈSE DIVERGENTE DES ANALOGUES DE LA SCYLLATOXINE

La stratégie de la synthèse divergente consiste à introduire un aminoacide portant une fonction réactive, protégée par un groupe protecteur orthogonal, c'est à dire un groupe qui soit stable durant les cycles répétitifs de la synthèse en phase solide et qui en même temps puisse être sélectivement déprotégé. Le nombre des groupes protecteurs disponibles est limité et la combinaison des groupes protecteurs de type Boc/Bzl et des groupes protecteurs labiles en milieu basique comme le Fmoc sur les chaînes latérales des acides aminés est très utilisée.

La figure 2 décrit la stratégie choisie pour la synthèse divergente des quatre analogues de la scyllatoxine où l'acide glutamique en position 27 a été remplacé par une lysine dont la chaîne latérale était protégée par un groupe Fmoc, clivable en milieu basique et résistante aux traitements acides. Après introduction de tous les acides aminés, on obtient un peptide dont toutes les chaînes latérales sont protégées. Ce peptide peut être traité classiquement en milieu acide, en donnant le peptide déprotégé mais ayant gardé le reste Fmoc sur la lysine, ou il peut être soumis préalablement à l'action de la pipéridine de manière à déprotéger sélectivement la lysine 27. On obtient dans ce cas une peptidyl-résine, totalement protégée par ailleurs, mais possédant une chaîne latérale portant une fonction amine libre, que l'on peut faire réagir sélectivement avec différents réactifs.

Nous avons obtenu les analogues :

Scyll-Lys <sup>27</sup> -NH <sub>2</sub>	basique, hydrophile
Scyll-Lys <sup>27</sup> -Fmoc	neutre, hydrophobe
Scyll-Lys <sup>27</sup> -Succinyle	acide, hydrophile
Scyll-Lys <sup>27</sup> -Acétyle.	neutre



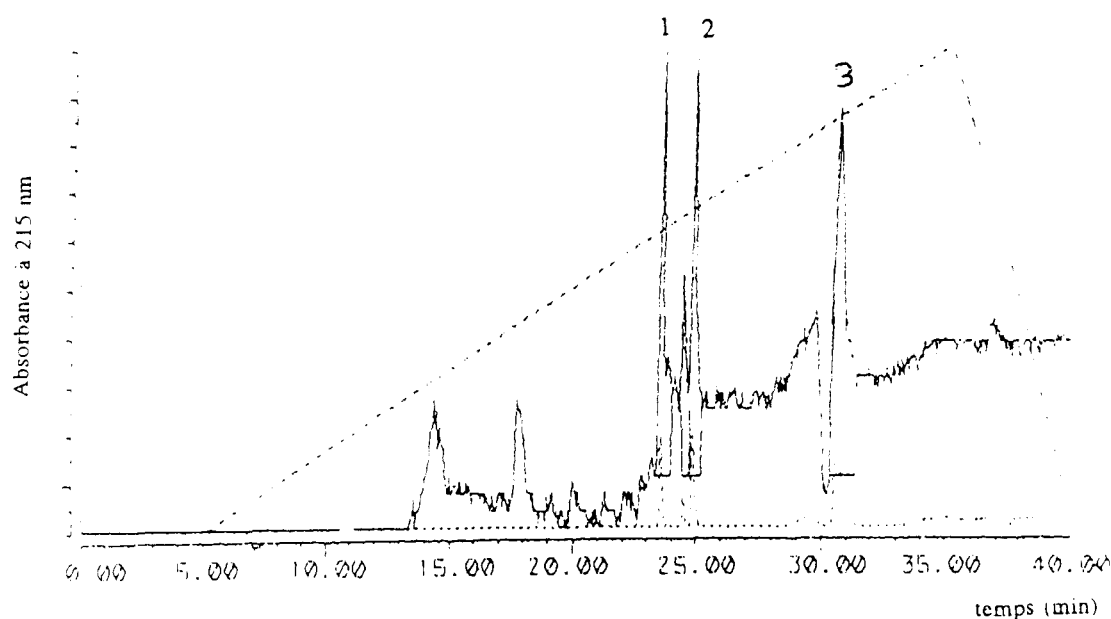
**Figure 2 :** Stratégie de la synthèse divergente des 4 analogues de la scyllatoxine. Les autres groupes protecteurs, utilisés et ne figurant pas sur le schéma, sont clivables en milieu très acide.

La synthèse de ces analogues a été réalisée en chimie Boc/Bzl en utilisant pour les couplages le mélange HBTU/HOBT. Les groupes protecteurs utilisés sont : Arg (Tos), Asp (OCHx), Cys (MeBzl), His (Dnp), Lys<sup>20, 25, 30</sup> (ClZ), Lys<sup>27</sup> (Fmoc), Met (O) et Ser (Bzl).

L'analyse en HPLC des produits, après clivage par l'acide fluorhydrique, montre une multitude de pics en particulier pour les analogues Scyll-Lys<sup>27</sup>-Succinyle et Scyll-Lys<sup>27</sup>-Acétyle. Compte tenu de la difficulté que représente une purification préalable, nous avons procédé directement aux manipulations de formation de ponts disulfure, la renaturation constituant par elle même une étape de

purification très sélective. Les quatre analogues ont été oxydés dans les mêmes conditions: acétate d'ammonium  $5.10^{-2}$  M à pH 8.

Après purification, un seul produit a été isolé dans le cas de l'analogue Scyll-Lys<sup>27</sup>-NH<sub>2</sub> ayant la masse attendue. Dans le cas de l'analogue Scyll-Lys<sup>27</sup>-Fmoc, deux fractions ont été isolées dont une majeure ayant la masse attendue et une fraction mineure ayant la masse du premier analogue ce qui s'explique par l'instabilité partielle du groupe Fmoc durant la coupure HF (Albericio et al, 1990). Dans le cas de l'analogue Scyll-Lys<sup>27</sup>-Succinyle, l'analyse en HPLC du milieu d'oxydation avant purification (Fig. 3) montre deux pics principaux.



**Figure 3** : Profil HPLC du brut d'oxydation de l'analogue Scyll-Lys<sub>27</sub>-Succinyl.

(Le pic numéro 3 correspond à un produit de nature non peptidique)

Après séparation de ces deux produits, les analyses en HPLC et en spectrométrie de masse montrent que le pic 1 a la masse attendue (3523,23) et correspond donc à l'analogue Scyll-Lys<sup>27</sup>-Succinyl (Fig. 4). Par contre, le pic 2 a une masse de 3589,32 présentant donc un excédent de 166 unités de masse par rapport à l'analogue Scyll-Lys<sup>27</sup>-NH<sub>2</sub>. Cet excès de masse peut correspondre à un groupement dinitrophényle (Fig. 5). Le même produit secondaire a été également isolé dans le cas de l'analogue Scyll-Lys<sup>27</sup>-Acétyle.



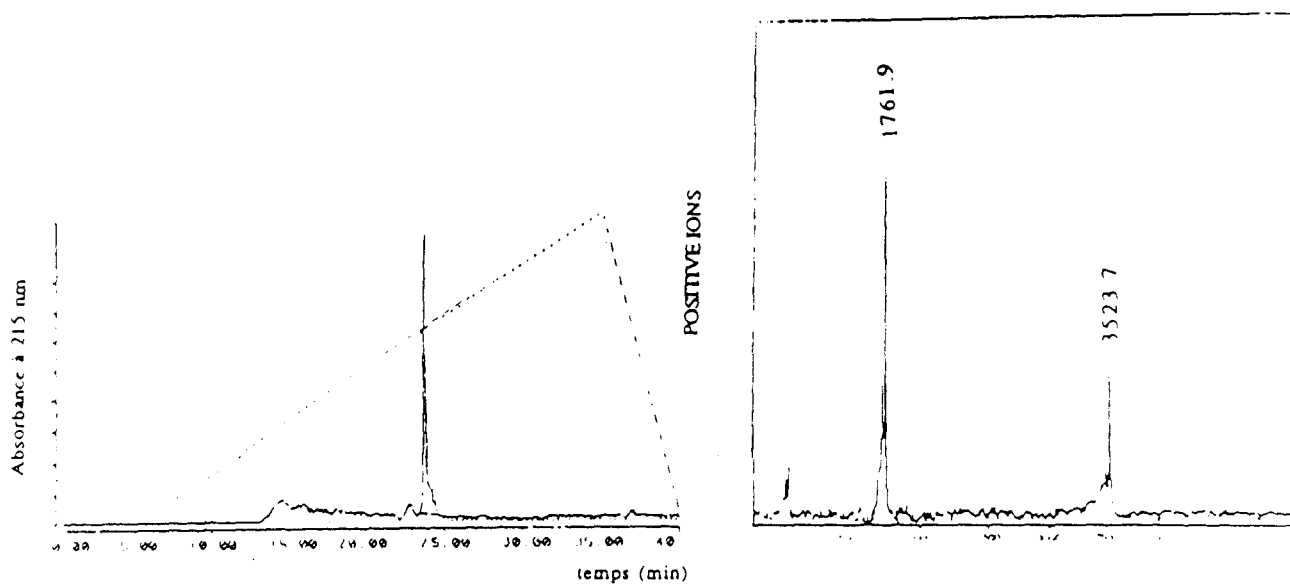


Figure 4 : HPLC et spectrométrie de masse correspondant à l'analogue Scyll-Lys<sub>27</sub>-Succinyl

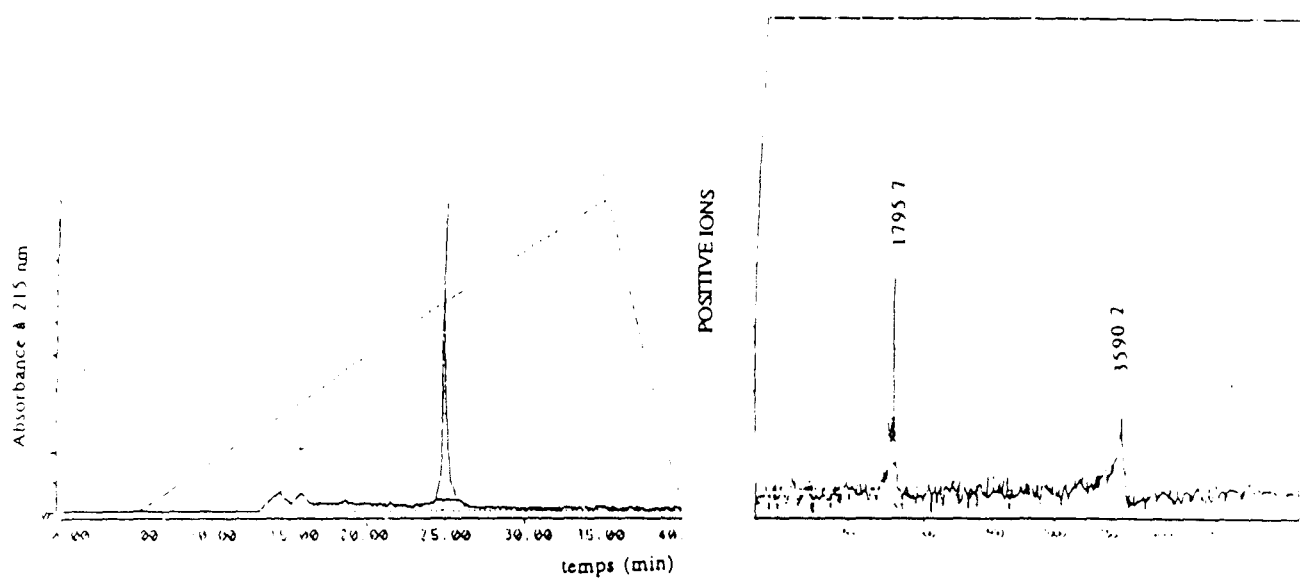
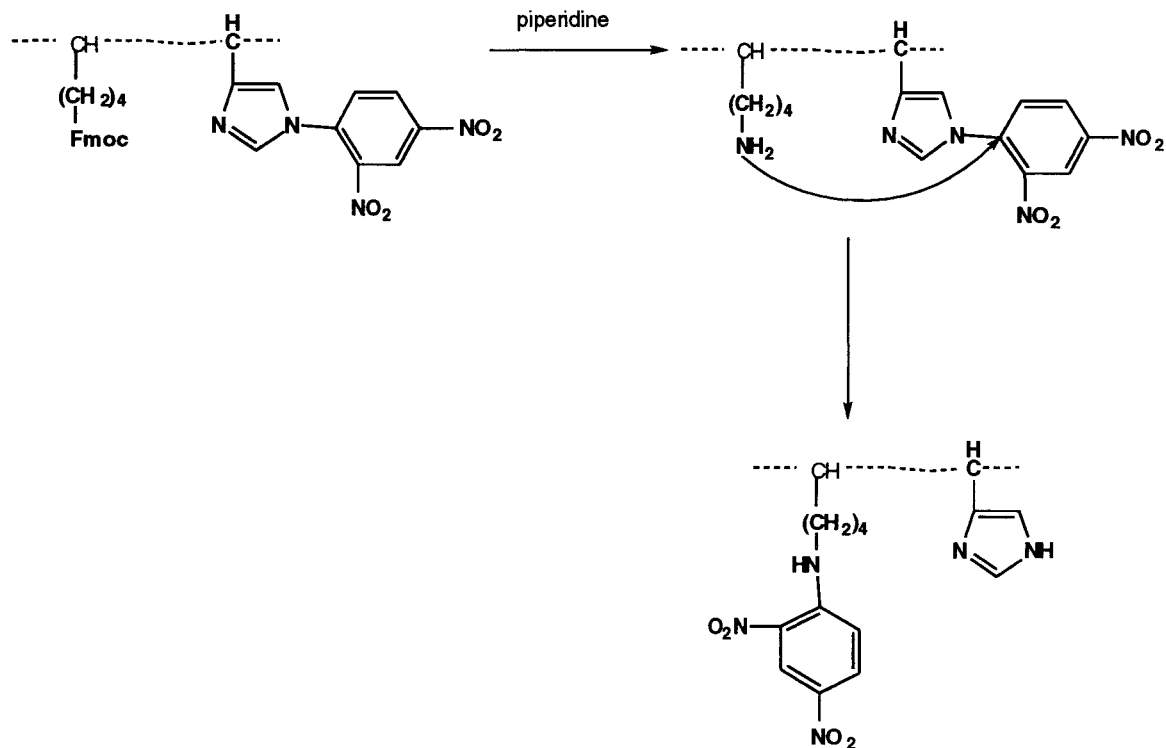


Figure 5 : HPLC et spectrométrie de masse correspondant au produit secondaire présentant un excédent de 166 unités de masse.

La compréhension du mécanisme a permis la mise au point d'un protocole grâce auquel cette réaction peut être évitée.



D'autre part, bien qu'inattendu ce produit secondaire dérivé constitue un analogue supplémentaire : Scyll-Lys<sup>27</sup>-Dnp.

### Articles:

« *Formation of N $\epsilon$ -Dnp Lysine during deprotection of N $\epsilon$ -Fmoc Lysine in N<sup>im</sup>-Dnp-Histidine-containing peptides* »

« *A side reaction involving Nim-Dnp histidine and lysine side chain* »

Dans ce deuxième article une erreur s'est glissée : inversion des 1 et 2 dans le tableau.

## ***Références:***

-Albericio F., Nicolas E., Rizo J., Ruiz-Gayo M., Pedroso E., Giralt E., Convenient syntheses of fluorenylmethyl-based side chain derivatives of glutamic and aspartic acids, lysine, and cysteine. (1990) 119-122.

-Auguste P., Hugues M., Gravé B., Gesquière J.C., Maes P, Tartar A., Romey G., Schweitz H., Lazdunski M., Leiurotoxin I (Scyllatoxin), a peptide ligand for  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels. *J. Biol. Chem.* (1990) **265**, 4753-4759.

-Chicchi G.G., Gimenez-Gallego G., Ber E., Garcia M.L., Winkvist R., Cascieri M.A., Purification and characterization of a unique, potent inhibitor of Apamin binding from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* venom. *J. Biol. Chem.* (1988) **263**, 10192-10197.

-Habermann E., Bee and wasp venoms. The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. *Science* (1972) **177**, 314-322.

-Inisan A.G., Meunier S., Fedelli O., Altbach M., Fremont V., Sabatier J.M., Thévan A., Bernassau J.M., Cambillau C., Darbon H., Structure-activity relationship study of a scorpion toxin with high affinity for apamin-sensitive potassium channels by means of the solution structure of analogues. *Int. J. Peptide Protein Res.* (1995) **45**, 441-450.

-Martins J.C., Zhang W., Tartar A., Lazdunski M., Borremans F.A.M., Solution conformation of Leiurotoxin I (Scyllatoxin) by  $^1H$  nuclear magnetic resonance *FEBS Lett.* (1990) **260**, 249-253.

-Meunier S., Bernassau J.M., Martin-Eauclaire M.F., Van Rietschoten J., Cambillau C., Darbon H., Solution structure of PO5-NH<sub>2</sub>, a Scorpion toxin Analog with high affinity for the apamin-sensitive potassium channel. *Biochemistry* (1993) **32**, 11969.



-Sabatier J.M., Fremont V., Mabrouk K., Crest M., Darbon H., Rochat H., Van Rietschoten J., Martin-Eauclaire M.F., Leiurotoxin I, a scorpion toxin specific for  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels. *Int. J. Peptide Protein Res.* (1994) **43**, 486-495.

-Sabatier J.M., Zerrouk H., Darbon H., Mabrouk K., Benslimane A., Rochat H., Martin-Eauclaire M.F., Van Rietschoten J., PO5, a new Leiurotoxin I-like scorpion toxin: synthesis and structure-activity relationships of the a-amidated analog, a ligand of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels with increased affinity. *Biochemistry* (1993) **32**, 2763-2770.

-Zerrouk H., Mansuelle P., Benslimane A., Rochat H., Martin-Euclaire M.F., Characterization of new leiurotoxin I-like scorpion toxin PO5 from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* *FEBS Lett.* (1993) **320**, 189-1992.

## Formation of N<sup>ε</sup>-Dnp Lysine during Deprotection of N<sup>ε</sup>-Fmoc Lysine in Nim-DNP-Histidine-containing Peptides

Jean-Claude Gesquière\*, Jamila Najib, Thierry Letailleur, Pierrette Maes, and André Tartar

Faculté de Pharmacie and Institut Pasteur, Laboratoire associé au CNRS, 1 rue A. Calmeue, 59019 Lille, France

Keywords: solid-phase peptide synthesis, side reaction, His(Dnp), Lys(Fmoc), dinitrophenyl.

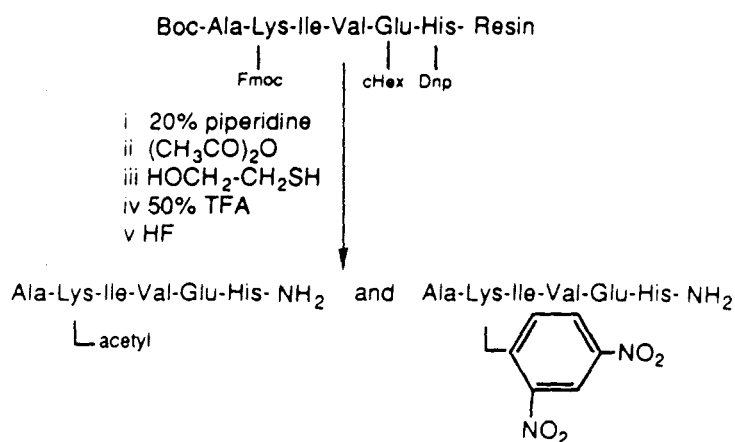
**Abstract:** *The 2,4-dinitrophenyl group used for histidine side chain protection is not stable during aminolytic removal of Fmoc protecting groups. In the presence of piperidine it reacts with ε-NH<sub>2</sub> of lysine with formation of N<sup>ε</sup>-Dnp Lysine but does not react with α-NH<sub>2</sub> group of the peptide chain.*

The fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) protecting group is commonly used in solid phase peptide synthesis as a temporary α-NH<sub>2</sub> protection<sup>1</sup>. In addition, it is also often used as an alternate orthogonal protection in the Boc-Benzyl strategy<sup>2</sup>. In this case, introduced on the ε-NH<sub>2</sub> of a lysine residue, it is stable to treatments performed during the cleavage of Boc groups (acidolysis with trifluoroacetic acid and neutralisation with diluted diisopropylethylamine), while it can be selectively removed from the fully protected peptidyl-resin. This strategy affords the possibility of introducing various labels such as the photo probe p-benzoylbenzoic acid<sup>3</sup>, the fluorescent 5-dimethylamino-1-naphthalenesulfonyl (dansyl) group<sup>4</sup>, to transform the ε-NH<sub>2</sub> group of the lysine into a guanidino group<sup>5</sup>, or even to facilitate the purification of protected peptide fragments<sup>6</sup>.

We have used this strategy to obtain specifically modified analogues of scyllatoxin, a 31 aminoacid long scorpion toxin: AFCNLRMCQLSCRSLLGKICIGDKCECVKH<sup>7</sup>. The synthesis was performed according to the Boc/Benzyl strategy, side chains being protected as follows: Cys(pMeBzl), Arg(Tos), Met(O), Ser(Bzl), Lys(CIZ) and His(Dnp). Glutamic acid in position 27 was replaced by a lysine which was introduced as its N<sup>ε</sup>-Fmoc protected derivative. At the end of the synthesis, 100 mg samples of the peptidyl resin were submitted to a treatment with 20% piperidine in NMP for 30 min in order to remove the Fmoc groups. The free side chain amino group of lysine in position 27 was then reacted with various acylating agents. In each case, after thiolysis and HF treatment, the expected compounds were found together with the same by-product which, analyzed by mass spectrometry (PDMS, TOF), demonstrated an excess of 166 mass units, related to the free, non acylated peptide.

Several observations led us to suspect that this by-product could correspond to the formation of N<sup>ε</sup>-Dnp-lysine: (i) an excess of 166 mass units is consistent with the presence of a dinitrophenyl group which could have remained on the histidine side chain or have reacted with another part of the peptide. (ii) synthesis of unmodified [Glu<sup>27</sup>]-scyllatoxin, although it involved a Dnp-protected histidine did not yield the same by-

product. (iii) the by-product was resistant to a second thiolytic step, indicating that it did not involve an incomplete deprotection of histidine. (iv) in each case, only the acylated peptide and the M+166 product were present, while it was not possible to detect a product simultaneously modified by the two groups, both acylated and showing a mass excess, indicating that the side reaction prevented acylation of the side chain of lysine. Moreover, when no acylation was performed, the M+166 peptide was the only contaminant to be detected. In order to confirm this side reaction, we have synthesized a smaller peptide : Ala-Lys-Ile-Val-Glu-His-NH<sub>2</sub>, using Boc-His(Dnp), Boc-Glu(OcHex), and Boc-Lys(Fmoc), thus providing the same association of protecting groups. The peptidyl resin was submitted to aminolysis with piperidine in order to deprotect the side chain of lysine<sup>8</sup> as indicated above, and was acylated by treatment with acetic anhydride.



After thiolysis, HF cleavage and deprotection of the peptidyl resin, reverse phase HPLC of the crude product showed two major peaks (Fig. 1) which were collected and submitted to mass analysis. Peak 1 corresponds to the expected acetylated peptide ;  $M+H^+ = 738.4$ , while peak 2 ;  $M+H^+ = 862.8$ , corresponds to a Dnp-modified peptide

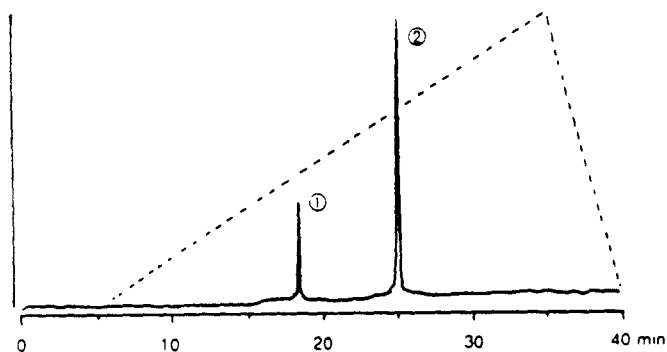


Fig 1 : HPLC of the crude peptide : Ala-Lys(acetyl)-Ile-Val-Glu-His  
 ① :  $M+H^+ = 738.4$  ② :  $M+H^+ = 862.8$  . For HPLC conditions see Ref. 9

The product corresponding to peak 2 was analyzed by Edman degradation (470 ABI peptide sequenator); during cycle 2 less than 5% of the expected quantity of PTH-lysine was observed. The presence of  $N^{\epsilon}$ -Dnp-lysine was further confirmed by aminoacid analysis after acidic hydrolysis of the crude peptide ( $N^{\epsilon}$ -Dnp-lysine is resistant to this treatment). The use of an authentic sample of  $N^{\epsilon}$ -Dnp-lysine allowed the quantification of the Dnp containing peptide to 80% of the total reaction products.

One possibility to avoid this side reaction is to use an other protection for the side chain of histidine, however none of the classical alternative protections is devoid of particular drawbacks. The  $N^{im}$ -tosyl group is of limited stability, being cleaved in weak acid conditions and particularly by HOBT<sup>10</sup>, while formaldehyde released during the cleavage of the  $N^{\pi}$ -Benzyloxymethyl group is responsible for various side reactions such as the cyclisation of N-terminus cysteine residues into a thiazolidine ring<sup>11</sup>.

Another possibility is to first remove the  $N^{im}$ -Dnp group by thiolysis, then to deprotect the  $N^{\epsilon}$ -Fmoc protection of the side chain of lysine<sup>12</sup> and to perform the acylation step. Although substantial  $N^{im}$ -acylation is likely to occur, the imidazole ring will be quantitatively desacylated during acidolytic deprotection and cleavage from the resin. Furthermore, in this case all the other side chains of the peptide remain protected, excluding the transfer of Dnp to a nucleophilic group. In order to check this possibility, the peptidyl-resin was submitted to thiolysis<sup>13</sup> and then to aminolysis<sup>14</sup>. Acylation was then performed, followed by treatment with 50% TFA and final cleavage and deprotection by HF in the presence of 10% para-cresol for 1 hour. No Dnp modified by-product could be detected under these conditions. Moreover when the acylation step was omitted, the obtained peptide was identical to an authentic sample of Ala-Lys-Ile-Val-Glu-His-NH<sub>2</sub> prepared following a classical Boc/Benzyl strategy<sup>15</sup> (Fig. 2).

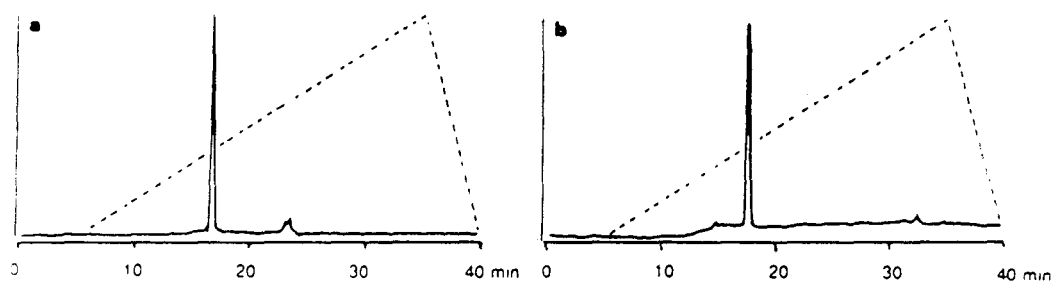


Fig 2 : RP HPLC profile of a : an authentic sample of Ala-Lys-Ile-Val-Glu-His-NH<sub>2</sub>, and b : of the product obtained according to the alternate strategy<sup>15</sup>.

In conclusion, we have observed a highly efficient transfer of the  $N^{im}$ -Dnp protecting group to the  $N^{\epsilon}$ -NH<sub>2</sub> group of lysine during the removal of Fmoc groups by piperidine. This reaction was unexpected and appears to be specific for  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> groups as i) it has never been detected during the synthesis of  $N^{im}$ -Dnp protected peptides when, after each neutralization and during the coupling step both the free  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> and  $N^{im}$ -Dnp are simultaneously present and could thus react with each other. ii) when Fmoc-Ala-Lys(CIZ)-Ile-Val-Glu(OcHex)-His(Dnp)-resin was submitted to the same initial treatments, no Dnp-modified peptide could be detected, confirming that the  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> group could not be involved in the Dnp transfer. The use of modified

deprotection conditions, in which Dnp was removed before cleavage of Fmoc group avoid the formation of the Dnp-modified peptide.

## REFERENCES AND NOTES

- Abbreviations used are : **Boc** : tert-butyloxycarbonyl, **pMeBzl** : para-methylbenzyl, **Tos** : paratoluenesulfonyl, **Bzl** : benzyl, **cHex** : cyclohexyl, **CIZ** : 2-chlorobenzoyloxycarbonyl, **DIEA** : diisopropylethylamine, **DMF** : N,N-dimethylformamide, **HF** : hydrogen fluoride, **MBHA** : methylbenzhydrylamine, **MeCN** : acetonitrile, **NMP** : N-methylpyrrolidone, **OD** : optical density, **PDMS TOF** : plasma desorption mass spectrometer / time of flight, **TFA** : trifluoroacetic acid
- Albericio F., Rizo J., Nicolás E., Ruiz-Gayo M., Cárdenas F., Carreño C., Andreu D., Pedrosa E., and Giralt E., in *Peptides : Chemistry, Structure and Biology*, Rivier J. E., Marshall G. R. Eds., Escom, Leiden, **1990**, pp 923-924
- Gorka J., Mc Court D. W., and Schwartz B. D., *Peptide Research*, **1989**, 2, 376-380
- Consalvo A.P., Tamburini P.P., Stern W., and Young S.D., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 39-42
- Theobald P., Porter J., Hoeger C., and Rivier J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 9624-9626
- Rizo J., Albericio F., Giralt E., and Pedrosa E., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 397-400
- Auguste P., Hugues M., Grave B., Gesquiere J.-C., Maes P., Tartar A., Romey G., Schweitz H., and Ladzunski M., *J. Biol. Chem.*, **1990**, 4753-4759
- We have checked the instability of N<sup>m</sup>-Dnp-Histidine during aminolysis : when Boc-His(Dnp)-resin is submitted to 20% piperidine in NMP for 1 hour, the side chain of histidine is fully deprotected. Removal of this Dnp protection can thus be efficiently performed by piperidine, and could represent an attractive alternative to thiolysis, with respect to toxicity of thiols reagents.
- HPLC conditions : reverse phase Nucleosil 100 - 5 C18. Gradient : 0%B = 0.05% TFA to 100 % B = 0.05% TFA in 60 % MeCN. O.D. measured at 215 nm and plot scaled to the tallest peak.
- Fujii, T., and Sakakibara, S., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1974**, 47, 3146-3151
- a. Gesquiere J.-C., Diesis E. and Tartar A.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 20,1402-1403
- b. Mitchell M. A., Runge T. A., Mathews W. R., Ichhpurani A. K., Harn N. K., Dobrowolski P. J., and Eckenrode F. M., *Int. J. peptide Protein Res.*, **1990**, 36, 350,355
- when the peptidyl resin was treated with 20% β-mercaptoethanol-10% DIEA in NMP, no cleavage of the Fmoc protecting group was observed after 2 hours
- thiolysis conditions : 20% β-mercaptoethanol, 10% DIEA in NMP, 2 hours, repeated twice
- aminolysis conditions : 20% piperidine in NMP for 30 min.
- obtained from Boc-Ala-Lys(CIZ)-Ile-Val-Glu(OcHex)-His(Dnp)-resin submitted to i) thiolysis, ii) 50% TFA, iii) HF cleavage.

(Received in France 6 January 1993; accepted 21 January 1993)

## A SIDE REACTION INVOLVING N<sup>m</sup>-Dnp HISTIDINE AND LYSINE SIDE CHAIN

Jean-Claude Gesquiere<sup>1\*</sup>, Jamila Najib<sup>1</sup>, Jean Marko<sup>2</sup> and André Tartar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>URA 1309 CNRS, Faculté de Pharmacie and Institut Pasteur  
1 rue Calmette, 59019 Lille, France

<sup>2</sup>Faculté de Pharmacie, 3 rue du Professeur Laguesse,  
59006 Lille, France

*The use of Boc-Lys(Fmoc) in the Merrifield solid phase synthesis results in fully protected peptide resins with lysine residues, which can be selectively side chain deprotected and labelled prior to HF cleavage. This strategy has been used for the synthesis of a peptide containing an histidine protected by an N<sup>m</sup>-Dnp group and, in these conditions, we have observed that the Dnp group is not stable during the removal of the Fmoc group. After HF cleavage, the major product (>80%) was identified by PDMS as a peptide in which the Dnp-group had been transferred to the amino side chain of lysine. This reaction is specific to the side chain of lysine as, in the same conditions, the α-amino groups of several amino acids have been tested and have not been found to be reactive. The side reaction can be avoided if the Dnp group is removed by thiolysis from the histidine side chain, prior to the removal of the Fmoc group from the lysine side chain.*

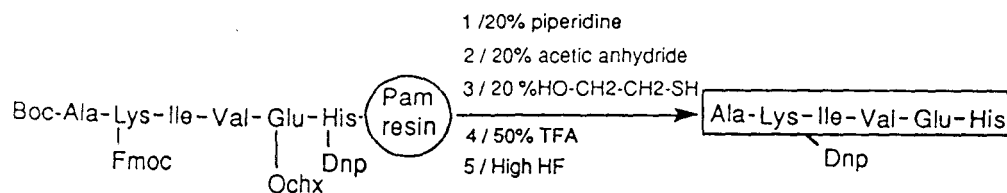
### INTRODUCTION

Boc-Lys(Fmoc) is commonly used in peptide synthesis in order to provide fully protected peptide resin from which the side chain of lysine can be easily and selectively deprotected<sup>1</sup>. This allows the introduction of various labels on the amino side chain of lysine prior to HF cleavage<sup>2,3</sup>. We have developed this strategy for the synthesis of peptides that had to be acylated on one of their lysine residues. When this was used with peptides containing one histidine residue, the side chain of which was protected by a dinitrophenyl group, we observed the formation of side products that had not been acylated and that differed from the original sequence by an increase of = 166 mass units.

### RESULTS AND DISCUSSION

In order to elucidate this side reaction, we have synthesised a short peptide, containing both Lys(Fmoc) and His(Dnp): Boc-Ala-Lys(Fmoc)-Ile-Val-Glu(OcHex)-His(Dnp)-MBHA<sup>4</sup>.

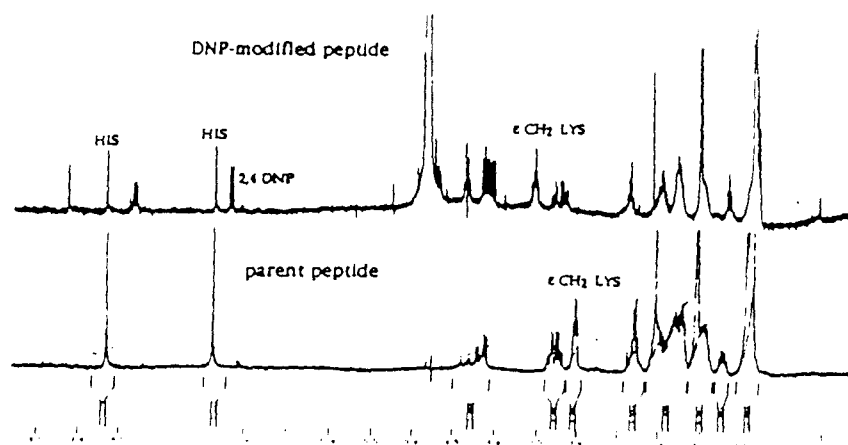
The complete peptidyl-resin was submitted to deprotection and acylation steps.



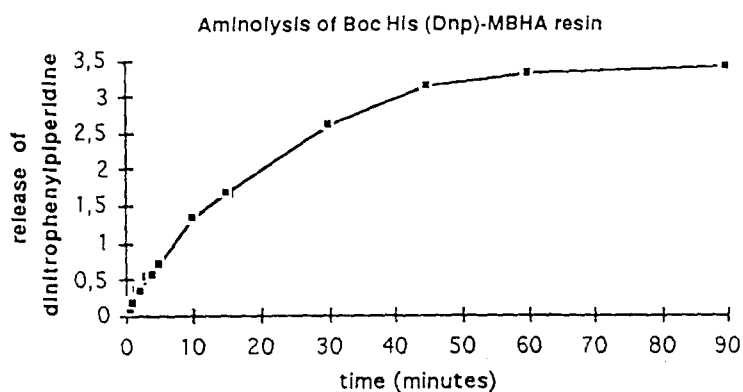
PDMS analysis of the major product (> 80%) showed a mass of 862.8. We attributed this product to a peptide that had not been acetylated but which had an added a Dnp group. Further treatment of the side product with HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SH did not lead to fully deprotected peptide, demonstrating that the Dnp group did not arise from a residually protected histidine. Moreover, the mass excess was only found on peptide which had not been acylated, that led us to suspect a reaction between the amino side chain of lysine and the Dnp-group from histidine during the aminolysis of  $\epsilon$ -Fmoc from lysine side chain.



The side product was separated by preparative HPLC and submitted to Edman degradation showing the sequence: Ala, Xxx, Ile, Val, Glu, His. Amino acid analysis demonstrated the absence of free lysine. The presence of N<sup>ε</sup>-Dnp lysine was shown using an authentic sample. NMR spectroscopy showed a shift of the signal corresponding to  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> of lysine from 3.1 to 3.6 ppm, demonstrating the presence of the Dnp group on the lysine residue.



The side reaction occurs during the treatment with piperidine, where His(Dnp) is fully deprotected in less than 90 min.

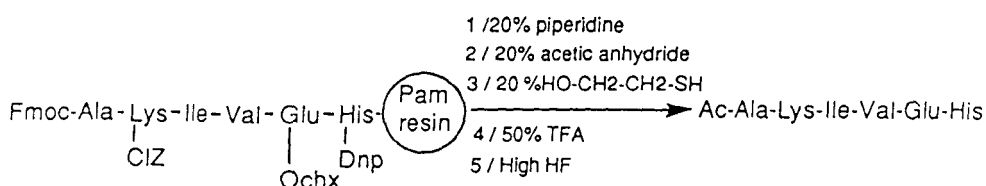


During the treatment with piperidine the ε-amino group of lysine can react in a nucleophilic mechanism to give a substituted dinitrophenyl group. As this reaction can occur to a large extent, we have checked for possible reaction between other nucleophilic groups of peptides and His(Dnp).

#### Reactivity of N<sup>α</sup> groups of peptides

Fmoc-Ala-Lys(CIZ)-Ile-Val-Glu(OcHex)-His(Dnp)-MBHA was synthesised using N<sup>α</sup>Fmoc-protection for Ala and N<sup>α</sup>-Boc for other amino acids.

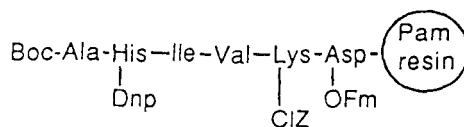
The peptidyl resin was submitted to the same 5 treatments as **1** and we have thoroughly checked for the formation of N<sup>α</sup>-Dnp alanine.



We have quantitatively obtained the acetylated peptide, demonstrating that the α-NH<sub>2</sub> of Ala remained deprotected and was then able to react with acetic anhydride in the second step. We have not observed any formation of N<sup>α</sup>-Dnp Alanine.

#### Reactivity of free side chain carboxylic groups

The Fluorenylmethyl group (Fm) is also used for the protection of carboxylic acids as their esters. This protection can be used for the protection of aspartic and glutamic acids and eventually for a selective deprotection as described for the side chain of lysine. In the basic conditions used for the removal of the Fm protection, the carboxylic acid can also act as a nucleophile. We have synthesised the peptidyl resin:

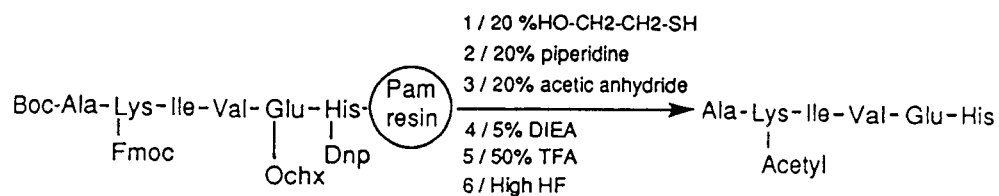


Before HF cleavage, this was submitted to a 20% piperidine treatment to deprotect the aspartic acid side chain. Despite the fact that a nucleophilic carboxylate ion is formed during this step, we could observe the formation of nothing other than the fully deprotected peptide: Ala-His-Ile-Val-Lys-Asp and did not detect any side products involving the Dnp group.

#### Use of lysine(Fmoc) and histidine(Dnp)

The side reaction involves the presence of deprotected lysine, Dnp groups and a basic medium. In order to avoid it, we have checked the stability of Boc Lys(Fmoc)-MBHA resin towards the thiolytic conditions used for the removal of Dnp groups from histidine. We have observed no release of fluorenylmethyl compound after a 2 hours treatment with 20% piperazine in DMF. We have thus synthesised the peptide, selectively acetylated on the lysine side chain, according to the following steps that totally avoided the side reaction.





### CONCLUSION

In basic medium, the side chain of lysine reacts with  $\text{N}^{\text{im}}$  Dnp histidine giving yield to  $\text{N}^{\text{e}}$ -Dnp lysine. This reaction seems to be limited to the free amino side chain and not to occur with the  $\alpha$ -amino group or carboxylic group.

When free side chain of lysine has to be used, Dnp must be removed prior to the deprotection of Lys(Fmoc).

### REFERENCES

1. Albericio F., Rizo J., Nicolás E., Ruiz-Gayo M., Cárdenas F., Carreño C., Andreu D., Pedrosa E., and Giralt E., in *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, Rivier J. E., Marshall G.R. Eds., Escrom, Leiden, 1990, pp 923-924.
2. Consalvo A.P., Tamburini P.P., Stern W., and Young S.D., *Tetrahedron Lett.*, 1989, 30, 39-42.
3. Theobald P., Porter J., Hoeger C., and Rivier J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 9624-9626.
4. Gesquière J.C., Najib J., Letailleur T., Maes P., and Tartar A., *Tetrahedron Letters*, 1993, 34, 1921-1924.

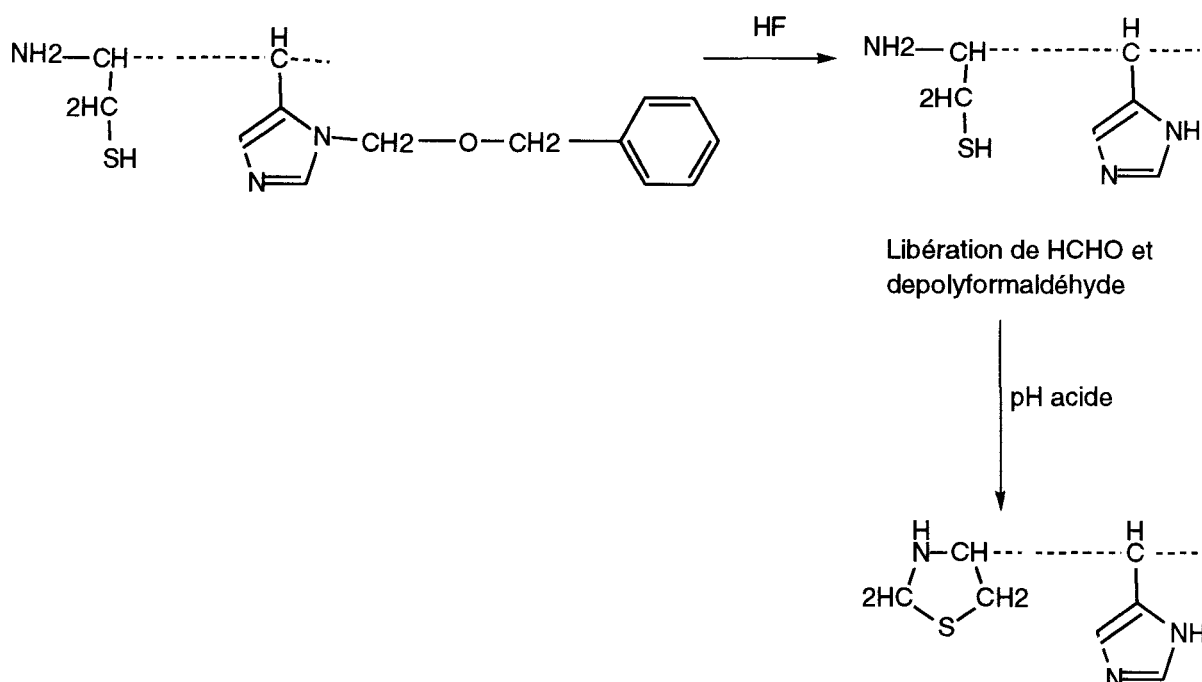
## MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION D'AUTRES REACTIONS SECONDAIRES

$\alpha$

Lors des diverse synthèses de peptides que nous avons effectuées, nous avons gardé la même approche, consistant à approfondir la caractérisation des produits obtenus. Grâce à cette démarche, nous avons pu mettre en évidence plusieurs réactions secondaires, faisant généralement intervenir plusieurs amino acides.

### I-FORMATION DE THIAZOLIDINES LORS DE L'UTILISATION DE PROTECTIONS DE TYPE BOM OU BUM AVEC DES PEPTIDES POSSEDANT UNE CYSTEINE N-TERMINALE

Cette réaction fait intervenir deux acides aminés simultanément avec, dans ce cas, la contrainte supplémentaire de la localisation d'une cystéine en position 1.



Caractérisée par un excès de 12 unités de masse, cette formation d'acide thiazolidine carboxylique est quasiment indécélable par analyse de la composition en acides aminés. La réaction, entre la cystéine N-terminale et le formaldéhyde libéré, intervient en partie pendant le clivage par l'acide fluorhydrique, mais également lorsque le peptide libéré est repris en solution aqueuse acétique ou trifluoroacétique. Nous avons montré qu'elle peut être évitée en opérant, durant ces deux étapes, en présence d'un excès important de cystéine libre qui va piéger le formaldéhyde libéré.

**Article:**

*« Investigations of the side reactions associated with the use of Bom and Bum groups for histidine protection »*

**II-CONTRIBUTION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE A LA  
CARACTERISATION DE REACTIONS SECONDAIRES EN SYNTHÈSE  
PEPTIDIQUE**

Nous avons, dans le cadre de la caractérisation de réactions secondaires en synthèse peptidique, décrit l'utilisation de la spectrométrie de masse, conjointement à l'utilisation de réactions chimiques simples, de manière à pouvoir identifier et localiser les différentes réactions secondaires observées.

**Article:**

*« Contribution of mass spectrometry to the determination of side reactions in peptide synthesis »*

### III-PERSPECTIVES

Deux autres réactions secondaires sont en cours d'investigation.

-La première met en jeu le tryptophane et la protection acétamidométhyle de la cystéine, elle a été observée pour la première fois lors de la synthèse de l' $\omega$ -agatoxine IVA. Cette réaction a lieu pendant l'étape de déprotection des Cys(Acm) par l'acétate mercurique et se traduit par la migration de l'Acm sur la chaîne latérale du résidu tryptophane.

-La seconde fait intervenir la protection de histidine par un groupement Bom, lors de la synthèse d'un peptide contenant des résidus tryptophane. On observe alors une dimérisation du peptide par l'intermédiaire d'un chaînon méthylène. Ce reste méthylène étant apporté par le formaldéhyde libéré lors du clivage du groupement Bom. La structure exacte du composé est en cours d'étude par spectroscopie RMN.



Table 1 Cleavage conditions and scavengers and associated side reactions for the Bom and Bum groups

Cleavage	Scavengers	$\frac{2}{1}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{1}$
		% $\frac{2}{1}$	% $\frac{1}{2}$ (thiol)	% $\frac{1}{1}$ (disulfide)
high HF	<i>p</i> -cresol	± 90		10
high TFMSA	thioanisole : EDT	± 90	10	
low/high TFMSA	<i>m</i> -cresol : EDT : DMS	± 90	10	
TFA	H <sub>2</sub> O	80 <sup>b</sup>	20	
TFA	EDT : H <sub>2</sub> O, 1 : 1	60	35	5
TFA	EDT : anisole, 1 : 1	37	59	4
TFA	phenol : EDT : thioanisole : H <sub>2</sub> O, 3 : 1 : 2 : 2	39	61	
TFA	EDT : anisole : cysteine, 1 : 1 : 1	55	45	

$$^a \% 1 = 100 \cdot \frac{\text{amount of } \frac{2}{1}}{\text{amount of } 1 + \text{amount of } 2}$$

<sup>b</sup> Together with large amounts of other side products

a molecular mass in excess by 48 units, corresponding to the oxidation of Thz to cysteic acid; the sulfonic acid derivative of Cys, could also be detected by PDMS analysis of the reaction mixture. Treatment of 2 with mercuric acetate yielded, immediately after precipitation of the mercuric complexes by H<sub>2</sub>S bubbling, almost quantitatively a product with the expected mass for the Cys-containing peptide and the same retention time in RPHPLC. However, when the excess of H<sub>2</sub>S was removed by N<sub>2</sub> bubbling, the peptide 1 reacted with the formaldehyde that was liberated and remained in the reaction mixture (or its polymeric form with H<sub>2</sub>S), to yield the Thz-containing peptide 2. This observation is consistent with the fact that cyclization does not occur during acidolytic treatments but only after extraction of the peptide from the resin when the decrease of the acidity allows the amino group to recover its nucleophilic character: 1 reacts quickly with one equivalent of HCHO to give nearly quantitatively 2. To avoid cyclization, a 10-fold excess of free cysteine was added just prior to N<sub>2</sub> bubbling in order to trap formaldehyde. In these conditions 1 could be quantitatively recovered from 2.

## References

1. Gesquière, J.C., Diesis, E. and Tartar, A., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 20(1990)1402.
2. Mitchell, M.A., Runge, T.A., Mathews, W.R., Ichhpurani, A.K., Harn, N.K., Dobrowolski, P.J. and Eckenrode F.M., *Int. J. Pept. Protein Res.*, 36(1990)350.
3. Kumagaye, K.Y., Inui, T., Nakajima, K., Kimura, T. and Sakakibara, S., *Peptide Res.*, 4(1991)84.
4. Veber, D.F., Milkowski, J.D., Varga, S., Denkwalter, R.G. and Hirschmann, R., *J. Am. Chem. Soc.*, 94(1972)5456.

## Contribution of Mass Spectrometry to the Determination of Side Reactions in Peptide Synthesis

JEAN-CLAUDE GESQUIERE, JAMILA NAJIB, FRÉDÉRIC CHIRAT, BENOIT DÉPREZ, HERVE DROBECQ, ERIC DIESIS AND ANDRE TARTAR

*URA 1309 CNRS and Institut Pasteur, 1 rue Calmette, 59019 Lille, France*

*Side reactions occurring in peptide synthesis can easily be elucidated using PDMS. Chemical reactions allow confirmation of the nature of the detected modification, while localization of the modified amino acid can be achieved by specific chemical or enzymatic cleavages of the peptide. In most cases, the use of PDMS can be performed directly on the reaction mixtures and do not need prior purification*

Californium-252 plasma desorption mass spectrometry associated with a time of flight detection (PDMS) provides a simple and efficient tool for the measurement of the molecular weight (MW) of peptides with an accuracy of  $\pm 1$  mass unit in the range up to 5000 Da. In the case of synthetic peptides, its application is not limited to the characterization of purified products, but, due to its high sensitivity (10 to 100 picomoles of sample are generally sufficient for a determination) it is of particular interest to study the various by-products generated during a synthesis.

In order to help their identification, we have written a program suitable for Apple Macintosh microcomputers, which, given the sequence of the expected peptide and the MW of an unknown by-product, allows performance of a trial and error search until a plausible combination of additional protecting groups and/or missing amino acids, matching this particular MW, is found.

In general, PDMS spectra are limited to molecular ion species, whereas structurally meaningful fragments are not obtained. However, PDMS allows the use of proteolytic enzymes and different chemical treatments to localize and identify the modification.

### Software

The program, written in Z Basic™ and presented as a stand-alone application, is suitable to perform calculations using the 20 naturally-occurring amino acids, as well as any nonnatural amino acid which is stored in a user-defined file. Add-on MW of most classical protecting groups, as well as cleavage by-products, are available from pop-up menus where they can be selected and included in the calculations. Addition of user defined modifications to the menus are also available. During the iterative process, the difference between the calculated and observed MW, as well as the changes which have been made to the initial structure, are displayed and a print-out of the results can be obtained. Hard copies of the computer screen are shown in Figure 1.

Results can be ordered in two main categories: products with lower or with higher MW than expected for the right peptide.

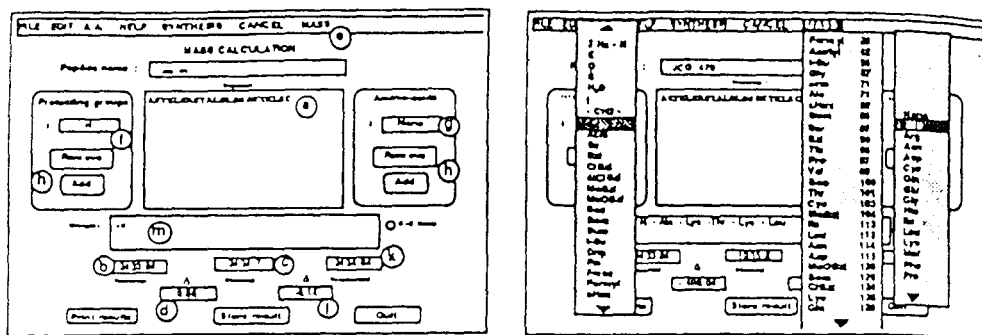


Figure 1. Showing (left) a hard copy the computer screen. The sequence is introduced in a and the corresponding MW is displayed in b. The operator introduces the measured MW in c allowing the difference with theoretical MW to be printed in d.

Modifications can then be introduced using the three menus e, f and g (shown together opened, on the right, as each appears when selected). An item that has been selected from the menus can then be added or removed and the recalculated MW appears in k together with its difference to the observed MW in l. All the modifications that have been considered in this recalculation are displayed in the field m.

The program also performs calculations including the formation of intra- or inter-molecular disulfide bonds.

### Molecular Weight Lower than Expected

Shorter peptides are generally due to termination reactions occurring during the build up of the peptide chain. The most frequent termination reactions to be detected are those corresponding to incomplete coupling, eventually followed by capping of the unreacted amino groups. An example is shown Figure 2 where the presence of a side product (MW = 1935.8 Da) could be attributed to an incomplete coupling of leucine to glutamic acid, followed by acetylation.

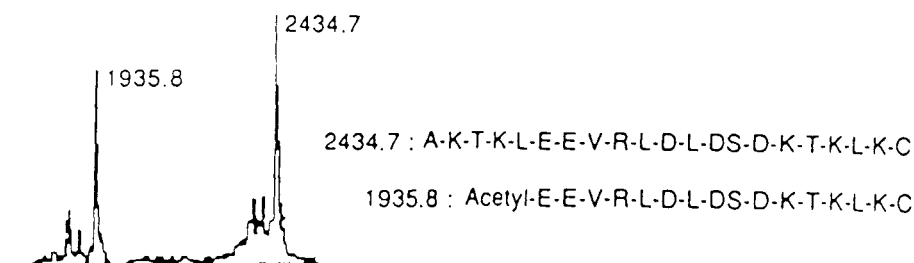


Figure 2. (synthesis: Boc/Benzyl; Double coupling + capping; HF cleavage).

The other major cause for the termination of growing chains is the formation of pyroglutamic acid (Pca) occurring during the coupling of glutamine residues, as well as during the coupling of Boc-Glu(OBzl). As shown in Figure 3, among the by-products characterized during the synthesis of the peptide 1, three fragments were identified, two of them, 2 and 3, corresponded to the cyclization of Gln residues [1], while the third one 4 was due to the cyclization of Boc Glu(OBzl), a reaction that has been described but is generally less suspected.



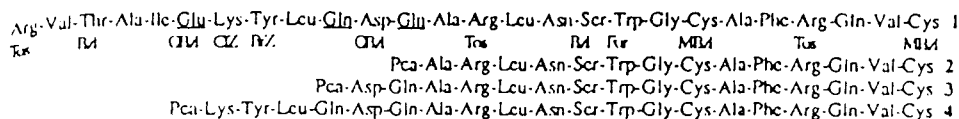


Figure 3. Fragments detected as by-products during the synthesis of peptide 1.

Unappropriate purification conditions can also lead to the formation of smaller fragments. A major cause is the use of aqueous acidic media such as 5% AcOH or 0.05% TFA during the purification of peptide containing the acid-labile Asp-Pro bond. The extent of this reaction is highly sequence dependent and can, in some cases, preclude the use of these media during gel-filtration or reversed-phase HPLC. Figure 4 shows the appearance of a fragment (1612 Da) corresponding to such a reaction only 2 hours after dissolution of the peptide in 5% AcOH.

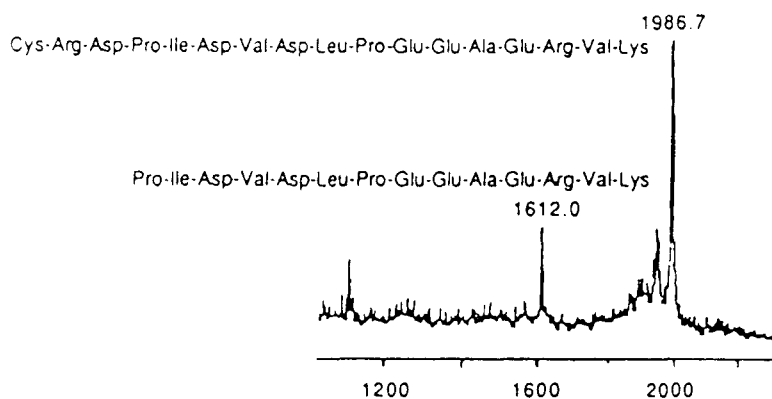


Figure 4. Cleavage of Asp-Pro bonds in aqueous acidic media.

### Molecular Weight Higher than Expected

In general, they correspond to an incomplete removal of a protecting group or to the modification of a side-chain by electrophilic species generated during acidic treatment. The exact identification of these by-products generally requires additional treatment such as enzymatic cleavages or group-specific chemical treatments, analysis of the MW of the resulting products using the Mass software allows one to identify and to localize the modification. Two examples of this strategy are given below.

#### A. IDENTIFICATION AND LOCALIZATION OF A CHLOROBENZYL DERIVATIVE

The peptide Glu-Trp-Arg-Phe-Asp-Ser-Arg-Leu-Ala-Phe-His-His-Val-Ala-Arg-Glu-Leu-His-Pro-Glu-Tyr-Phe-Lys-Asn-Cys-Hda (EWRFD SRLA FHHVARELHPEYFKNCh) was synthesized using a classical Boc/Benzyl strategy. PDMS analysis of the crude HF product, beside a small peak (3444.7 Da) corresponding to the expected MW, demonstrated a large peak at 3568.2 Da, corresponding to M+124. This value is consistent with an additional chloro-2-benzyl group that was released during acidic deprotection of Lys(CIZ) [2]. In order to localize this group, a small amount of the crude product was treated with *Staphylococcus aureus* V8 protease and directly analyzed by PDMS without further purification, showing five peaks (Figure 5). The 124 Da excess was found to be associated with the C-terminal fragment of the molecule. However, examination of the part of the

spectrum corresponding to the disulfide-bonded dimers showed that none of these products had a MW excess, although they correspond to the C-terminal fragments. This allows one to postulate that the by-product corresponds to S-alkylation of cysteine by the chloro-2-benzyl group which, when present, prevents the formation of the disulfide bond, thus explaining the lack of mass excess on the dimers.

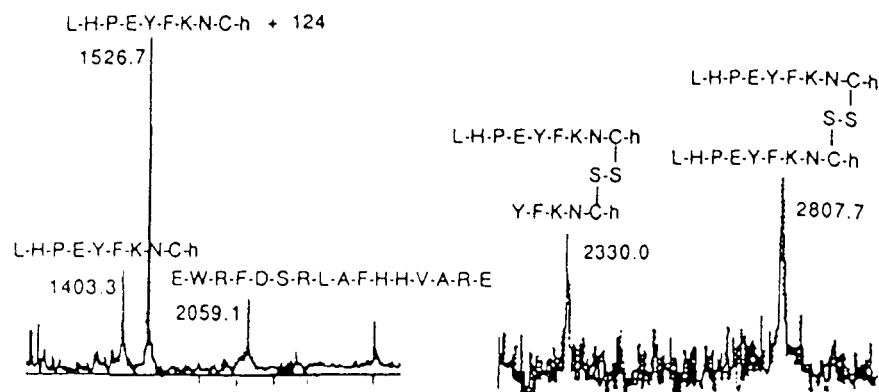
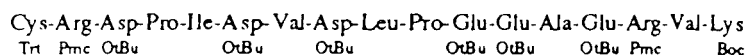


Figure 5. Identification and localization of a S-chlorobenzyl group on a cysteine.

## B. IDENTIFICATION AND LOCALIZATION OF A *t*-BUTYL SULFIDE

The peptide:



was synthesized using Fmoc/*t*Butyl strategy. PDMS analysis of the crude product after final cleavage and deprotection by TFA did not show the expected MW but a major peak corresponding to an excess of 58 Da, together with others peaks corresponding to under-protected Arg(Pmc). This major side product which corresponds to the presence of a *tert*-butyl group was separated by preparative reversed-phase HPLC (Figure 6).

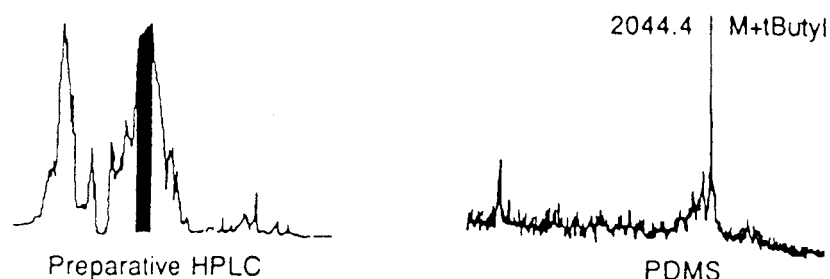


Figure 6. Isolation of the product corresponding to an excess of 58 Da.

The modified peptide was treated with TFA at room temperature for 12 hours and resubmitted to MW determination. No MW modification was detected, indicating that the *t*-butyl group was probably located on the cysteine side-chain, *t*-butyl sulfide being notably more resistant to acidolysis than the corresponding *t*-butyl ethers or *t*-butyl esters [3]. The peptide was thus treated with Hg<sup>++</sup> salts in TFA for 12 hours, allowing the deprotection of S-*t*-butyl cysteine as confirmed by MW determination (Figure 7), corresponding to the fully deprotected peptide ( $[M+H]^+ = 1991$  Da) together with  $[M+Hg]^+$  and  $[M+2Hg]^+$ . The formation of S-*t*-butyl cysteine can also be confirmed by treatment with 2 equivalents of 2-pyridinyl-sulfonyl chloride [4] during 10 min which converts the product to the fully deprotected disulfide involving the peptide and the pyridine sulfonyl moiety.

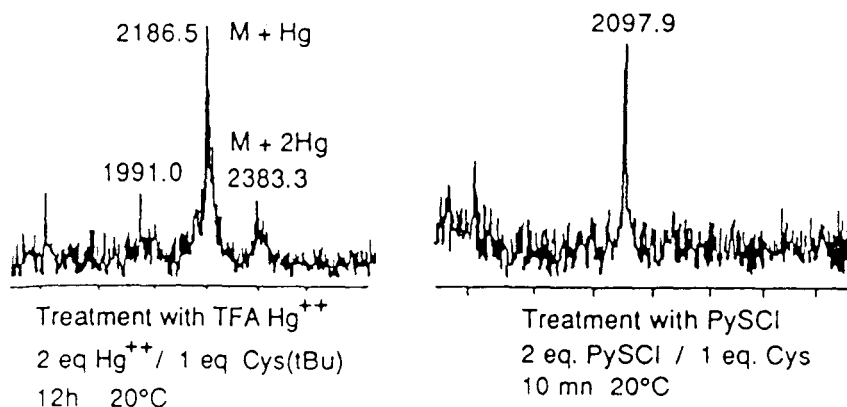


Figure 7. Identification of a *S*-*tert*-butyl group.

### Conclusion

The use of PDMS is generally restricted to the characterization of pure peptides and not for unknown compounds due to the absence of fragmentations. Nevertheless, its use in conjunction with specific cleavages or specific chemical reactions, together with the software we have shortly described here, provides a convenient method for the identification and the localization of side products formed during peptide synthesis.

### References

1. DI MARCHI, R.D., *et al.* 1982. *Int. J. Peptide Pro. Res.* **19**, 88.
2. ERICKSON, B.W., MERRIFIELD, R.B. 1973. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, (11), 3757.
3. NAKAGAWA, Y., NLSHIUCHI, Y., EMURA, J., SAKAKIBARA, S. 1980. In: *Peptide Chemistry* (K. Okawa, ed.), Protein Research Foundation, Osaka, pp. 41-47.
4. CASTELL, J.V., TUN-KYI, A. 1979. *Helv. Chimica Acta* **62**, (7), 2507.

## **VII-CONCLUSION GÉNÉRALE**

## CONCLUSION GENERALE

Dans ce mémoire, j'ai cherché à exposer l'ensemble du travail réalisé pendant trois ans. Ce travail a trois facettes:

- la première concerne l'étude structurale de la chlorotoxine et son analogue
- la deuxième facette correspond à la synthèse peptidique en phase solide de toxines de scorpion à chaîne courte et un autre modèle de toxine d'araignée.
- la troisième facette concerne la mise en évidence et la caractérisation de réactions secondaires observées lors de la synthèse de certains peptides.

La détermination de la structure de la chlorotoxine, par résonance magnétique nucléaire qui est une technique parfaitement adaptée pour cette molécule qui est une protéine de petite taille très stable en solution, a montré que la chlorotoxine possède le même motif structural hélice/feuillet commun aux autres toxines de scorpion à chaîne courte et à trois ponts disulfure. La différence entre la chlorotoxine et la charybdotoxine réside au niveau du coude  $\alpha$ - $\beta$  où on constate la présence d'un potentiel électrostatique positif dans le cas de la chlorotoxine et non dans le cas de la charybdotoxine ce qui se traduit probablement par une différence au niveau de l'activité biologique.

La détermination de la structure de l'analogue ClTx-Ala2-19 montre la conservation du motif structural commun ainsi que le potentiel électrostatique positif caractérisant le chlorotoxine. Cependant la rupture du pont disulfure supplémentaire perturbe l'interaction du brin N-terminal avec le brin C-terminal et induit une instabilité globale de la protéine. Le rôle de ce quatrième pont disulfure dans le cas de la charybdotoxine est compensé par des interactions entre les résidus hydrophobes N-terminaux et ceux du coude (Leu20, His21 et Thr 23). Nous avons voulu également étudier la structure d'un modèle de toxines d'araignée, l' $\omega$ -agatoxine IVA pour la comparer à celle de toxines de scorpion. Ce projet a été abandonné car une fois la synthèse en phase solide de cette toxine a

été achevée, la structure d'une toxine très homologue, l' $\omega$ -agatoxine IVB, a été publiée.

Dans ce mémoire nous avons synthétisé des toxines à trois (analogues de la scyllatoxine) et quatre (chlorotoxine, son analogue et l' $\omega$ -agatoxine IVA) ponts disulfure. Le nombre de combinaisons possibles de formation de ponts disulfure augmente exponentiellement avec le nombre de résidus cystéines, ceci rend très difficile l'organisation en structure active dans des conditions *in vitro*. Donc l'étape cruciale de la synthèse de ces toxines est l'étape de formation de ponts disulfure où on est en plus confronté à des problèmes de polymérisation et d'agrégation. L'un des buts de ce travail est de maîtriser cette étape en jouant sur plusieurs paramètres tels que : pH, température, force ionique, concentration en protéines et agents oxydants, afin de former les ponts disulfure corrects et de permettre au peptide linéaire de se retrouver dans la conformation active.

Lors de la synthèse des analogues de la scyllatoxine, une réaction secondaire a été observée, il s'agit de la migration du groupe dinitrophenyle protégeant l'histidine sur la chaîne latérale de la lysine pendant l'étape de déprotection de la Lys(Fmoc) par la piperidine. Un peptide modèle a été synthétisé, ce qui a permis de comprendre le mécanisme de cette réaction secondaire et proposé un moyen de l'éviter pour les synthèses ultérieures, en changeant l'ordre classique des étapes de déprotection.

Une autre réaction secondaire a été mise en évidence lors de la synthèse de l' $\omega$ -agatoxine IVA, il s'agit de la migration du groupe AcM protégeant la cystéine sur la chaîne latérale du tryptophane durant l'étape de déprotection des Cys(AcM) par l'acétate mercurique. Une alternative, pour éviter cette réaction secondaire, a été suggéré dans ce travail et qui consiste à utiliser un excès de tryptophane libre pendant cette étape de déprotection. Pour mieux comprendre le mécanisme de cette réaction, un peptide modèle est en cours d'investigation et sur lequel une étude RMN sera réalisé.

Une autre réaction secondaire a été observée pendant la synthèse d'autres peptides que les toxines citées dans ce travail, il concerne les peptides ayant une

cystéine N-terminale qui se transforme en thiazolidine par réaction avec le formaldéhyde provenant des groupes Bom ou Bum protégeant l'histidine.

Afin de faciliter la caractérisation de réactions secondaires en synthèse peptidique, nous avons décrit l'utilisation de la spectrométrie de masse conjointement à l'utilisation des réactions chimiques simples, de manière à pouvoir identifier et localiser les modifications observées.