UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

# THESE

Présentée pour obtenir le titre de Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille

par

# Nathalie MOKRZYCKI



# PURIFICATION, CARACTERISATION ET MODIFICATION DE TOXINES ANIMALES POUR L'ETUDE DE LA DIVERSITE DES CANAUX IONIQUES

Professeur André TARTAR Docteur Guy LIPPENS Professeur André MENEZ Docteur Michel HUGUES Professeur Michel SALZET Président Directeur de thèse Rapporteur Rapporteur Examinateur

## **REMERCIEMENTS**

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de "Synthèse, structure, fonction des biomolécules" à l'Institut Pasteur et Institut de Biologie de Lille. Il a été financé par une bourse du Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie. Une partie de ce travail a été réalisé dans le laboratoire de "Physiopathologie et de Pharmacologie Vasculaire" de l'Université de Bordeaux II, dirigé par Monsieur le Professeur Jean Mironneau.

#### Je tiens à remercier

- Monsieur le Professeur André Tartar de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de me faire l'honneur de présider cette thèse
- Monsieur le Professeur André Ménez d'avoir accepté d'examiner ce travail en tant que rapporteur
- Monsieur le Docteur Michel Hugues d'avoir accepté d'examiner ce travail en tant que rapporteur, et de m'avoir accueillie dans son laboratoire à Bordeaux
- Monsieur le Professeur Michel Salzet d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur
- Monsieur le Docteur Pierre Sautière pour son soutien, et pour m'avoir fait découvrir une vaste partie de la chimie des protéines
- Monsieur le Docteur Guy Lippens pour m'avoir accueillie dans son équipe et pour son soutien et ses encouragements

Je tiens à exprimer ma très sincère reconnaissance aux personnes qui ont participé à ce travail, et auprès desquelles j'ai beaucoup appris :

- Hervé Drobecq, pour ses précieux conseils et pour m'avoir initiée aux différentes techniques de laboratoire
- Eric Buisine, pour ses conseils et pour sa collaboration dans le sujet Lqh7.1
- René Wintje pour son aide en modélisation moléculaire, pour sa disponibilité et sa patience
- Christophe Dhalluin, pour m'avoir fait découvrir la structure d'une de "mes petites toxines" d'araignées
- Jean-Luc Morel, pour m'avoir fait découvrir le monde de l'électrophysiologie et avoir testé avec beaucoup de soin, toutes les toxines que je lui ai confiées
- Ghislaine Neuilly, pour m'avoir initiée aux techniques de pharmacologie, et pour son soutien

#### Je remercie chaleureusement

Corinne Rommens, pour sa disponibilité, sa patience, ses conseils et sa gentillesse

- Gérard Montagne pour sa pédagogie et sa disponibilité, Jean-Michel Wieruszeski pour son enthousiasme à prendre de très bons spectres RMN de toxines.
- Steven Brooks pour avoir pris le temps de m'aider en anglais et de régler de nombreux soucis administratifs, souvent dans l'urgence, Claudine pour son aide et sa patience

Christophe Boutillon pour ses conseils et Fabienne Jean pour sa disponibilité

- Monsieur le Professeur Christian Sergheraert et l'ensemble de son équipe, Elisabeth, Sandrine V, Sandrine D, Laurence, Sophie, Pascale, Valérie et Véronique
- Hélène Gras et toute son équipe, et plus particulièrement, Nathalie, Estelle, Dominique, Line et Cyrille

# **PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

## <u>Publications</u>

«Alternate Pooling for Optimizing RP-HPLC Fractionnation of Complex Peptide Mixtures.»

Nathalie MOKRZYCKI, Hervé DROBECQ, Hélène GRAS-MASSE and André TARTAR Journal of Chromatography A, (1999) 839; 57-69

«Isolation and Characterization of six Novel Calcium Channel Antagonist Polypeptides from The Venom of Spider *Segestria florentina*...»

Nathalie MOKRZYCKI, Hervé DROBECQ, John BOOT, Pierre SAUTIERE, Yvon DOLJANSKI, André TARTAR and Guy LIPPENS.

Biochemistry, (submitted).

«Distribution of mapacalcine receptors in the central nervous system of rat using the  $[^{125}I]$ -labeled mapacalcine derivative.»

Mourre C., Mokrzycki N., Richeux F., Creppy E. E., Neuilly G. and Hugues M. Brain research, (submitted)

## **Communication** Orale

«Etude de la structure tri-dimensionnelle en solution d'une toxine de scorpion inhibitrice de courants Chlores - Recherche d'un analogue radioactif conservant les propriétés d'inhibition.»

Nathalie MOKRZYCKI, Dragos HORWATH and Eric BUISINE

Au département D'Ingénieurie d'étude des Protéines, avril 1997 CEA Saclay

## Communications par affiches

«La Spectrométrie de Masse, un Outil Indispensable dans la Recherche et la Caractérisation de Nouvelles Toxines Animales dans les Venins.»

Nathalie MOKRZYCKI, Hervé DROBECQ, André TARTAR and Pierre SAUTIERE

14<sup>èmes</sup> Journées françaises de Spectrométrie de Masse 16-18 Septembre 1997 - LILLE - Villeneuve d'Ascq

«Une strategie alternative simple pour l'optimisation du fractionnement de mélanges peptidiques complexes.»

Nathalie MOKRZYCKI, Hervé DROBECQ, Hélène GRAS-MASSE and André TARTAR

11<sup>ème</sup> Réunion Peptides et Protéines 17-22 Janvier 1999 - AUSSOIS

«Caractérisation d'une famille de toxines de scorpion inhibitrices des conductances chlores activées par le calcium des myocytes vasculaires.»

Nathalie MOKRZYCKI, Jean-Luc MOREL, Guy LIPPENS, Hervé DROBECQ, Pierre SAUTIERE, Jean MIRONNEAU and Michel HUGUES.

6<sup>èmes</sup> Rencontres en Toxinologie 9-11 Décembre 1998 - PARIS

# SOMMAIRE

# **Sommaire**

Remerciements	3
Publications et Communications	5
Sommaire	7
Abréviations	13
Nomenclature des 20 acides aminés	15

## **INTRODUCTION GENERALE**

**CHAPITRE 1. Généralités** 

# PARTIE I.

Etude et Utilisation de Toxines agissant sur les canaux calciques voltagedépendants

17

21

1. 1. Diversité des canaux calciques voltage-dépendants	21
1. 1. 1. Les canaux calciques voltage-dépendants, une voie d'entrée du calcium dans la cellule	21
1. 1. 2. Bases moléculaires de la diversité des canaux calciques voltage-dépendants	23
1. 1. 3. Les différents sous-types de canaux calciques et leur classification	25
1. 1. 4. Conclusion	27
1. 2. Les toxines animales ligands des canaux calciques voltage-dépendants	29
1. 2. 1. Introduction	29
1. 2. 2. Les toxines de venins de cônes marins	30
1. 2. 3. Les toxines de venins d'araignées	32
1. 2. 4. Les toxines d'autres espèces animales	34
CHAPITRE 2. Etude d'une nouvelle famille de toxines agissant sur les	canaux
calciques neuronaux, issue du venin d'araignée Segestria florentina	37
2. 1. Introduction	37
2. 2. Origine et choix du venin d'araignée	38
2. 1. 1. Tests pharmacologiques	38
2. 1. 2. Détermination de la richesse des venins par chromatographie	39

2. 1	ι.	3.	Résultats

2. 3. Purification et caractérisation des antagonistes des canaux calciques neuronaux	
de type N-, P/Q- et R-, du venin de Segestria florentina.	41
2. 3. 1. Purification, structure et activité de six nouvelles toxines agissant	
sur les canaux calciques	41
"Isolation and Characterization of six Novel Calcium Channel Antagonist	
Polypeptides from The Venom of Spider Segestria florentina."	
Article soumis au périodique European Journal of Biochemistry	43
2. 3. 2. Détermination des ponts disulfure de la famille de toxines du venin de	
Segestria florentina	69
2. 3. 2. 1. Introduction	69
2. 3. 2. 2. Résultats	70
2. 3. 2. 3. Conclusion	72
2. 3. 3. Compléments d'information sur l'activité des toxines de Segestria florentina.	74
2. 3. 3. 1. Introduction	74
2. 3. 3. 2. Résultats et discussion	75
2. 3. 3. 3. Partie expérimentale	76
2. 3. 4. Structure tridimensionnelle d'une toxine du venin de Segestria florentina	7 <b>7</b>
2. 3. 4. 1. Introduction	77
2. 3. 4. 2. Structure tridimensionnelle de Sf17	79
2. 3. 4. 3. Comparaison de la structure de Sf17 avec les toxines d'araignées agissant sur	
les canaux calciques	82
2. 4. "Dock and Lock": mécanisme d'interaction des toxines de Segestria florentina	
avec les canaux calciques?	83
2. 4. 1. Introduction	83
2. 4. 2. Le mécanisme de double interaction à l'origine de la spécificité	84
2. 4. 3. Les toxines de Segestria florentina adoptent-elles un mécanisme de double interaction?	84
2. 4. 3. 1. Deux motifs structuraux communs, à égal distance dans Sf17 et l'ω-agaIVA	84
2. 4. 3. 2. Choix des analogues de Sf17	89
2. 4. 3. 3. Synthèse et repliement des polypeptides Sf17 hybride, Sf17 sans boucle	
et Sf17 boucle	91
2. 4. 4. Conclusion	104
2. 4. 5. Partie expérimentale	105
2. 4. 5. 1. Synthèses peptidiques des analogues de Sf17	105
2. 4. 5. 2. Caractérisation physico-chimique des analogues synthétiques de Sf17	108

CHAPITRE 3. Mise en évidence de la présence de canaux calciques sensible dans le cerveau de rat	mapacalcine
Mise au point de la purification du récepteur de la mapacalcine	113
3. 1. Introduction	113
3. 2. Mise en évidence de la présence de récepteurs de la mapacalcine	
dans le cerveau de rat	114
"Distribution of mapacalcine receptors in the central nervous system	
of rat using the <sup>125</sup> I-labeled mapacalcine derivative."	
article soumis au périodique, Brain research:	115
3. 3. Mise au point de la purification du récepteur de la mapacalcine	131
3. 3. 1 Introduction	131
3. 3. 2. Résultats et discussion	132
3. 3. 2. 1 Préparation d'un dérivé biotinylé de la mapacalcine conservant les propriétés	
biochimiques de la mapacalcine naturelle	132
3. 3. 2. 2 Mise au point de la purification du récepteur hépatocytaire de la mapacalcine	136
3. 3. 3. Conclusion	138
3. 3. 4. Partie expérimentale	139
3. 3. 4. 1. Matériels	139
3. 3. 4. 1. Méthodes	139
References	145

# PARTIE II.

Recherche d'un dérivé marqué à l'iode et biologiquement actif de Lqh7.1, nouvelle toxine de scorpion modulant les courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants de myocytes vasculaires

CHAPITRE 1. Généralités	163
1. 1. Les canaux chlorures	163
1. 1. 1. Introduction	163
1. 1. 2. Structure et classification des canaux chlorures	164
1. 2. Diversité des toxines de scorpions	166
1. 2. 1. Les toxines agissant sur les canaux sodiques	166

1. 2. 2. Les toxines agissant sur les canaux potassiques	169
1. 2. 3. Les toxines agissant sur les canaux calciques	170
1. 2. 4. Une toxine agissant sur les canaux chlorures	171
1. 2. 5. Les insectotoxines à chaîne courte de cible non définie	171

# CHAPITRE 2. Etude d'une nouvelle famille de toxines de scorpion ayant pour cible des canaux chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants 173

2. 1. Purification et caractérisation de deux nouvelles toxines de scorpion modulant	
des courants chlorures Ca2+-dépendants de myocytes vasculaires à partir d'un	n
venin de scorpion	173
2. 2. Structure tridimensionnelle de la toxine Lqh7.1	177
2. 2. 1. Introduction	177
2. 2. 2. Structure de Lqh7.1	180
2. 2. 3. Comparaison de la structure de Lqh7.1 avec celle de la chlorotoxine	181

CHAPITRE 3. Recherche d'un dérivé de Lqh7.1 marqué à l'iode	[ <sup>125</sup> I]	et
biologiquement actif	185	
3. 1. Introduction	185	
3. 2. Marquage à l'iode 125 de Lqh7.1. Perte d'activité de la molécule marquée	186	
3. 2. 1. Introduction	186	
3. 2. 2. Marquage de Lqh7.1		
3. 2. 3. Activité de Lqh7.1 marquée à l'iode 18		
3. 2. 3. 1. Test de fixation de Lqh7.1 marquée à l'iode sur les membranes de veine porte de b	œuf 188	
3. 2. 3. 2. Activité de la toxine marquée à l'iode en électrophysiologie	190	
3. 2. 3. 3. Conclusion 190		
3. 2. 4. Comparaison des spectres de dichroïsme circulaire de Lqh7.1 native et		
Lqh7.1 mono-iodée	190	
3. 2. 5. Conclusion	191	
3. 3. Synthèses d'analogues de Lqh7.1 et études biologiques	192	
3. 3. 1. Lqh7.1[F5Y/Y26F]	192	
3. 3. 1. 1. Introduction	192	
3. 3. 1. 2. Repliement de Lqh7.1[F5Y/Y26F]	193	
3. 3. 1. 3. Comparaison des spectres de dichroïsme circulaire de Lqh7.1 et		
de Lqh7.1[F5Y/Y26F]	193	

3. 3. 1. 4. Activité de Lqh7.1[F5Y/Y26F] en électrophysiologie	194
3. 3. 1. 5. Marquage et activité de Lqh7.1[F5Y/Y26F] marquée à l'iode	195
3. 3. 1. 6. Conclusion	195
3. 3. 2. Lqh7.1[H9Q/Q9Y/Y26F] - Lqh7.1[H9Y/Y26F] - Lqh7.1 [N33Y/Y26F]	
- Lqh7[Y(-1)/Y26F]	195
3. 3. 2. 1. Introduction	195
3. 3. 2. 2. Repliement des analogues de Lqh7.1	196
3. 3. 2. 3. Résultats électrophysiologiques	198
3. 4. Discussion	199
3. 5. Partie expérimentale	203
3. 5. 1. Marquage à l'iode de Lqh7.1 et test de liaison spécifique	203
3. 5. 1. 1. Matériels	203
3. 5. 1. 2. Méthode	203
3. 5. 2. Synthèses peptidiques des analogues de Lqh7.1	205
3. 5. 2. 1. Synthèses des analogues	205
3. 5. 2. 2. Caractérisation physiocochimique des analogues	209
References	211

# PARTIE III.

Strategie alternative pour la purification de constituants à partir de mélanges complexes

"Alternate pooling for optimizing high-performance liquid chromatographic fractionation of complex peptides mixtures."

Journal of chromatography A 1999 ; <u>839</u> : 57-69 225

# **CONCLUSION GENERALE**

# ABREVIATIONS

Da :	Dalton
DCM :	Dichlorométhane
DiEA :	Diisopropyléthylamine
DMF :	N,N-diméthylformamide
DMS :	Diméthylsulfure
DTT :	Dithiothréitol
EMBL:	European Molecular Biology Laboratory
ES/MS :	ElectroSpray Mass Spectrometry
GuCl :	Chlorure de guanidine
HPLC :	High Performance Liquid Chromatography
HF:	Acide fluorhydrique
HOBt :	Hydroxybenzotriazole
IC50 :	Concentration inhibitrice 50
NMP :	1-N-méthyl-2-pyrrolidone
NOE :	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PDI :	Protein Disulfide Isomerase
PDMS :	Plasma Desorption Mass Spectrometry
PEI :	Polyethylèneimine
PPI :	Prolyl Peptidyl Isomerase
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
RMS :	Root mean square
RP-HPLC :	Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography
SPPS :	Synthèse Peptidique en Phase Solide
TCEP :	Tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TFA :	Acide trifluoroacétique
TFE :	Trifluroéthanol

# NOMENCLATURE DES 20 ACIDES AMINES

Ala	А	Alanine
Arg	R	Arginine
Asn	Ν	Asparagine
Asp	D	Acide aspartique
Cys	С	Cystéine
Gln	Q	Glutamine
Gly	G	Glycine
His	Н	Histidine
Ile	Ι	Isoleucine
Leu	L	Leucine
Lys	Κ	Lysine
Met	Μ	Méthionine
Phe	F	Phénylalanine
Pro	Р	Proline
Ser	S	Sérine
Thr	Т	Thréonine
Trp	W	Tryptophane
Tyr	Y	Tyrosine
Val	V	Valine

**INTRODUCTION GENERALE** 

# **INTRODUCTION GENERALE**

Les toxines animales de nature polypeptidique font l'objet depuis le début du siècle d'un intérêt croissant parmi les scientifiques. En effet, les animaux venimeux produisent dans leur venin d'innombrables toxines d'action spécifique, dirigées contre des canaux ioniques. Aujourd'hui, très peu de ligands organiques sont capables d'égaler l'affinité et la spécificité d'une toxine pour son récepteur (Olivera et al., 1997). D'autre part, ces toxines, de petite taille, dont le nombre d'acides aminés varie généralement de 30 à 70 résidus, se prêtent à la synthèse peptidique par voie chimique et sont aisément modifiables par des groupements chimiques, facilitant leur détection, ainsi que la détection de la présence du canal cible (Najib et al., 1995; Lecomte et al., 1998). De plus, l'incroyable diversité de ces toxines fait des venins animaux une source inépuisable de ligands spécifiquement ciblés contre les canaux ioniques.

De nombreuses toxines agissant spécifiquement sur les canaux sodiques, potassiques et calciques ont été isolées des venins animaux. Du fait de leur haute spécificité, certaines d'entreelles sont devenues des outils de référence pour caractériser et classer les différents sous-types de canaux à l'intérieur d'une même famille (Olivera et al., 1994). Ce sont également de précieux outils de recherche pour comprendre le rôle de certains canaux ioniques et connaître leur structure moléculaire (Garcia et al., 1999). D'autre part, leur spécificité d'action physiologique fait de ces toxines des agents utilisables dans le traitement de la douleur et des convulsions, notamment dans les épilepsies (Bowersox et coll., 1994; Miljanich et Ramachandran, 1995). Aujourd'hui, un certain nombre de chercheurs visent à comprendre le mécanisme d'action de ces toxines. La connaissance des éléments essentiels à l'origine de la spécificité pourrait aboutir à la conception de petites molécules non peptidiques pour le traitement de certaines pathologies. C'est pourquoi, la caractérisation de nouvelles toxines permet d'étoffer la classification des canaux ioniques, mais également d'apporter une contribution importante dans la compréhension du mécanisme d'action des toxines animales.

Parmi les différentes familles de canaux ioniques, les canaux calciques ont largement bénéficié de la disponibilité de toxines spécifiques (Uchitel et al., 1997). Cependant, du fait de l'importance de ces canaux dans un grand nombre de fonctions physiologiques et du nombre toujours croissant de canaux clonés, des ligands permettant de les caractériser sont encore très recherchés (Nooney et al., 1997). De nombreuses toxines affectant les canaux calciques ont déjà été isolées à partir des venins de cônes marins. Il apparaît cependant, que les venins d'araignées représentent une source encore peu explorée de toxines ciblées spécifiquement contre les canaux calciques.

A la différence des autres canaux ioniques, les canaux chlorures sont très pauvres en ligands spécifiques de haute affinité, permettant de les caractériser et de les classer. L'importance des canaux chlorures dans toute une série de mécanismes de la physiologie de la

17

cellule n'a été évaluée que depuis peu de temps (Valverde et al., 1995). Aujourd'hui, seuls des ligands organiques de faibles affinité et spécificité sont connus pour affecter les canaux chlorures. Il s'avère cependant, que certains animaux venimeux ont élaboré des toxines spécifiques dirigées contre ces canaux ioniques. En effet, le ligand le plus affin est aujourd'hui la chlorotoxine, une toxine de scorpion (DeBin et al., 1993; Ullrich et Sontheimer, 1996). Ces venins sont donc une voie de recherche de ligands spécifiques des canaux chlorures.

Dans ce travail, nous avons cherché à exploiter la biodiversité des venins animaux pour l'étude des canaux calciques et des canaux chlorures. Pour cela, dans un premier temps, le venin d'araignée nommée *Segestria florentina* a fait l'objet d'une étude pour en caractériser les antagonistes calciques neuronaux. Ainsi, six nouvelles toxines agissant sur les canaux calciques, ont été caractérisées. Cette nouvelle famille de toxines animales nous a amené à proposer quelques hypothèses quant à l'origine de la spécificité des toxines animales. Par ailleurs, dans le cadre d'une collaboration avec le Docteur Michel Hugues à Bordeaux, nous avons testé les six antagonistes du venin de *Segestria florentina* sur les récepteurs sensibles à la mapacalcine. En effet, la mapacalcine, isolée du venin de l'éponge de mer *Cliona vastifica*, agit sur un nouveau sous-type de canal calcique insensible à tous les antagonistes calciques. Par la suite, et dans le souci d'exploiter le potentiel de la mapacalcine à caractériser un nouveau sous-type de canal calcique insensible à tous les antagonistes calciques. Par la suite, et dans le souci d'exploiter le potentiel de la mapacalcine à caractériser un nouveau sous-type de canal calcique insensible à tous les antagonistes calciques. Par la suite, et dans le souci d'exploiter le potentiel de la mapacalcine à caractériser un nouveau sous-type de canal calcique insensible à tous les nouveau sous-type de canal calcique, nous avons mis au point la purification de son récepteur. Tous ces travaux sont exposés dans la partie I.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à obtenir un ligand marqué à l'iode radioactif et biologiquement actif d'une nouvelle toxine de scorpion nommée Lqh7.1, agissant spécifiquement sur les canaux chlorures  $Ca^{2+}$ -dépendants. Le marquage à l'iode de Lqh7.1 conduisant à un ligand inactif, plusieurs analogues de cette toxine ont été synthétisés. Ces travaux sont exposés dans la partie II.

Enfin, une stratégie originale de purification de toxines à partir des venins, qui constituent des mélanges peptidiques complexes, a été évaluée. Cette nouvelle stratégie a été testée sur le fractionnement et la purification des différents constituants polypeptidiques du venin de serpent *Dendroaspis viridis*. Ces travaux font l'objet de la partie III.

Bowersox, SS, Valentino, KL, Luther, RR. Neuronal voltage-sensitive calcium channels. Drugs News Perpect 1994; <u>7</u>: 261-268

DeBin JA, Maggio JE, Strichartz GR. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. Am J Physiol 1993; 264 : C361-9

Garcia ML, Hanner M, Knaus H-G, Slaughter R, Kaczorowski G. Scorpion Toxins as Tools for Studying Potassium Channels. *Methods in enzymology* 1999 ; <u>294</u> : 624-639

Lecomte C, Sabatier JM, Van Rietschoten J, Rochat H. Synthetic peptides as tools to investigate the structure and pharmacology of potassium channel-acting short-chain scorpion toxins. *Biochimie* 1998; <u>80</u>:151-4

Miljanich GP, Ramachandran J. Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; <u>35</u>: 707-34

Najib J, Letailleur T, Gesquière JC, Tartar A. Solid-phase synthesis of omega-agatoxin IVA, a P-type Calcium blocker. J Pept Sci 1996; <u>2</u>: 309-317

Nooney JM, Lambert RC, Feltz A. Identifying neuronal non-L  $Ca^{2+}$  channels: more than stamp collecting? *Trends Pharmacol Sci* 1997; <u>18</u>: 363-71

Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem* 1994; <u>63</u>: 823-67

Olivera, BM Conus venom peptides, Receptors and Ion Channel Targets, and Drug Design: 50 Million Years of Neuropharmacology. *Molecular Biology of the Cell* 1997; <u>8</u>: 2101-2109

Uchitel OD. Toxins affecting calcium channels in neurons. Toxicon 1997; 35: 1161-91

Ullrich N, Sontheimer H. Biophysical and pharmacological characterization of chloride currents in human astrocytoma cells. *Am J Physiol* 1996; 270 : C1511-21

Valverde MA, Hardy SP, Sepulveda FV. Chloride channels: a state of flux. FASEB J 1995; 9: 509-15

.

·

PARTIE I. Etude et Utilisation de Toxines agissant sur les canaux calciques voltage-dépendants.

# **CHAPITRE 1. GENERALITES.**

#### 1. 1. Diversité des canaux calciques voltage-dépendants.

# 1. 1. 1. Les canaux calciques voltage-dépendants, une voie d'entrée du calcium dans la cellule.

Les variations de la concentration de calcium intracellulaire jouent un rôle essentiel dans un grand nombre de mécanismes cellulaires et physiologiques. Un influx calcique à l'intérieur de la cellule peut déclencher des phénomènes aussi différents que l'expression de gènes, la sécrétion de neurotransmetteurs ou la contraction musculaire (Yeager et al., 1987; Miller et al., 1988; Catterall et al., 1991 (a)). Tous ces mécanismes sont supportés par le gradient électrochimique de calcium qui règne de part et d'autre de la membrane cellulaire. En effet, la concentration du calcium à l'intérieur de la cellule au repos est très faible par rapport à la concentration extracellulaire, puisqu'elle est dix mille fois moindre. Pour que le calcium puisse déclencher ces mécanismes, il faut que la concentration de calcium intracellulaire augmente rapidement et de façon transitoire dans la cytoplasme. Ceci se manifeste telle "une décharge de calcium" dont l'amplitude et la fréquence dépendent directement du stimulus extracellulaire (Catterall et al., 1988; Berridge et al., 1993).

La principale voie d'entrée du calcium dans les cellules excitables, sont les canaux calciques voltage-dépendants. Ces canaux calciques s'ouvrent pour laisser passer le flux d'ions Ca<sup>2+</sup> sous l'effet d'une dépolarisation membranaire, lorsque le potentiel de membrane passe de sa valeur de repos (-80 mV) à environ -40 mV. Ces canaux calciques ont avant tout un rôle primordial dans la génération et la transduction des signaux électriques par les neurones et d'autres cellules excitables, telles que les cellules cardiaques et les cellules musculaires. Ils possèdent une fonction clef dans les couplages d'excitation-contraction et excitation-sécrétion (Tsien, 1983; Miller, 1988; Catterall, 1991 (a)).

Toute cette diversité de fonctions s'accompagne d'une très grande diversité de canaux calciques voltage-dépendants. Certains canaux calciques sont spécialisés dans le mécanisme de la contraction et se trouvent essentiellement sur les cellules musculaires (canaux calciques de type L-). D'autres sont impliqués dans le contrôle du mécanisme d'excitation-sécrétion et jouent un rôle très important dans la sécrétion de neurotransmetteurs (Westenbroek et al., 1992; Uchitel et al., 1992). Ces derniers sont très importants dans les neurones et au niveau des jonctions neuro-musculaires (Canaux calciques neuronaux) (Miller, 1992). Aujourd'hui, six sous-types de canaux calciques différents, nommés: T-, L-, N-, P-, Q- et R- ont déjà été

caractérisés (Nowycky et al., 1985; Bean (a et b), 1989; Tsien and Tsien, 1990; Tsien et al., 1991; Snutch and Reiner 1992; Hofmann et al., 1994). Néanmoins, de nombreuses études montrent que d'autres sous-types de canaux calciques non caractérisés, co-existent avec les canaux calciques déjà définis (Olivera et al., 1994; Nooney et al., 1997; Morel et al., 1997).

Chaque canal calcique se distingue par sa structure moléculaire, ses propriétés biophysiques et pharmacologiques, sa localisation tissulaire et son rôle fonctionnel. Toutefois, les critères les plus couramment utilisés, pour caractériser un canal calcique, sont les critères électrophysiologiques et pharmacologiques. Dans ce domaine, les ligands polypeptidiques naturels issus de venins animaux ont fortement contribué à classer les différents sous-types de canaux calciques (Zhang et al., 1993; Olivera et al., 1994; Mori et al., 1996).

Le tableau 1 présente les différents sous-types de canaux calciques voltage-dépendants connus.

Sous-unité α1	Type fonctionnel	<b>Propriétés</b> électrophysiologiques - activation - inactivation	Distribution tissulaire	Inhibiteurs sélectifs	
S			muscle squelettique	DHP	
С	L-	- haut seuil (-20 mV) - lente	ubiquitaire: muscle cardiaque, muscle lisse, cerveau	DHP ω-Aga IIIA (araignée)	
D			cerveau, coeur	DHP calciseptine (serpent) w-Aga IIIA (araignée)	
В	N-	- haut seuil (-30 mV) - intermédiaire	cerveau	ω-CTx GVIA, ω-CTx MVIIA (cône marin)	
A	P/Q-	- haut seuil (-30 mV) - intermédiaire	cerveau, coeur, rein	ω-Aga IVA/B (araignée) ω-CTx MVIIC (cône marin)	
Е	R-	- haut seuil (-30 mV) - +/- rapide	cerveau	SNX-482 (araignée)	
G	<b>-</b> Т-	- bas seuil (-60 mV) - rapide	ubiquitaire	kurtoxine (scorpion)	
Н					

Tableau 1	: Classification	des différents	s sous-types d	le canaux calci	ques voltage-	dépendants
r ableau r	···Classification	des annorentes	sous types a	o culture culoi	ques ronage .	rependunts

# 1. 1. 2. Bases moléculaires de la diversité des canaux calciques voltagedépendants.

Les premières informations concernant la structure des canaux calciques voltagedépendants ont été obtenues à partir des travaux sur le muscle squelettique, riche en canaux calciques de type L- (Tanabe et al., 1987; Takahashi et al., 1987; Ellis et al., 1988; Vaghy et al., 1988). Les divers travaux réalisés ont montré que les canaux calciques voltage-dépendants étaient des complexes glycoprotéiques ancrés dans la membrane plasmique. La structure générale des canaux calciques est illustrée par la figure 1. Ces canaux sont constitués de cinq sous-unités distinctes dont quatre sous-unités transmembranaires:  $\alpha_1$  (170 kDa),  $\alpha_2$  (143 kDa),  $\delta$  (27 kDa) et  $\gamma$  (32 kDa). La quatrième sous-unité, la sous-unité  $\beta$ , est cytoplasmique (52 kDa). Les sous-unités  $\alpha 2$  et  $\delta$  sont reliées par un pont disulfure (Catterall, 1988 (a); Varadi et al., 1995) (Figure 1). Chaque sous-unité possède une structure et une fonction spécifique détaillée ci-dessous.



Figure. 1. Structure sous-unitaire d'un canal calcique d'après Catterall (1988). Les sites de glycosylation et de phosphorylation sont représentés, ainsi que le pont disulfure reliant la sous-unité  $\alpha 2$  et  $\delta$ .

La sous-unité  $\alpha_1$  possède les fonctions principales du canal. Elle forme le pore du canal où transite le calcium, contrôle la sélectivité vis à vis des ions et assure le rôle de détecteur de variation de voltage. C'est cette même sous-unité qui possède le site de liaison aux ligands calciques (Striessnig et col;, 1990; Kalasz et al., 1993). Il a été montré qu'à elle seule, cette sous-unité était capable de diriger le passage du flux d'ions calcium (Perez-Reyes et al., 1989).

La structure de la sous-unité  $\alpha_1$  est proche de celle des canaux sodiques (Catterall et al., 1988 (b)). Elle est formée par la répétition de quatre domaines homologues (de I à IV). Ces domaines contiennent six segments hydrophobes hélicoïdaux ancrés dans la membranes (S1-S6) et sont reliés entre eux par des boucles (Figure 2). Chaque segment possède une fonction propre. Ainsi, la sélectivité entre les ions Ca<sup>2+</sup> et Na<sup>+</sup> se fait dans la région du pore du canal au niveau du double feuillet  $\beta$  anti-parallèle dénommé SS1 et SS2, entre le segment S5 et S6. C'est à ce même niveau que se trouve le site récepteur aux ligands calciques (Catterall and Striessnig, 1992; Kalasz et al., 1993; Watanabe et al., 1993). Le segment S4 de chaque domaine, chargé positivement constitue le détecteur de voltage, c'est à dire la structure sensible aux variations de potentiel (Stühmer et al., 1989).



Figure 2. Structure de la sous-unité  $\alpha 1$  des canaux calciques. Celle-ci correspond à la plus grande sous-unité représentée. Cette sous-unité contient quatre domaines hydrophobes transmembranaires (I-IV). Chaque domaine est constitué de six segments transmembranaires (S1-S6). Les sous-unités auxiliaires  $\alpha 2-\delta$  et  $\beta$  sont également représentées (Schéma d'après Nooney et al, 1997).

Les *sous-unités auxiliaires* modulent les cinétiques d'activation et d'inactivation du canal, ainsi que la densité du courant et l'interaction des ligands calciques (Hofmann et al., 1994; Varadi et al., 1991; Mori et al., 1991; Isom et al., 1994; Singer et al., 1991). Sur le plan fonctionnel c'est la sous-unité  $\beta$  qui exerce la plus grande influence sur les courants calciques.

D'autre part, la co-expression de  $\alpha 2/\delta$  avec la sous-unité  $\alpha 1$  augmente l'intensité du courant calcique (Nargeot et al., 1992).

Huit gènes codant pour la sous-unité  $\alpha 1$  ont été clonés. Les canaux de type L- sont codés par trois gènes différents selon leur localisation tissulaire,  $\alpha_1 S$ : dans le muscle squelettique,  $\alpha_1 C$ : dans le muscle cardiaque et les neurones, et  $\alpha_1 D$ : dans les cellules endocrines (Tanabe et al., 1987; Ellis et al., 1988; Mikami et al., 1989; Snutch et al., 1990). Les canaux de types N- sont codés par le gène  $\alpha_1 B$ , les canaux de type P/Q-, par le gène  $\alpha_1 A$  et les canaux de type R- par le gène  $\alpha_1 E$ . Récemment, deux gènes codant pour les canaux de type T- ont été clonés, les gènes  $\alpha_1 G$  et  $\alpha_1 H$  (Perez-Reyes et al., 1998).

Des études d'homologies ont montré que les gènes codant pour les canaux calciques de type L- ( $\alpha$ 1S,  $\alpha$ 1C,  $\alpha$ 1D) possédaient 60 à 70% d'homologie de séquence entre eux et seulement 40% avec les gènes codant pour les canaux calciques de type non-L ( $\alpha$ 1A,  $\alpha$ 1B,  $\alpha$ 1E). Quant aux canaux de type non L-, ils partagent 60% d'homologies entre eux (Zhang et al., 1993). Ces observations illustrent la grande diversité des canaux calciques, développée dans les pages suivantes.

## 1. 1. 3. Les différents sous-types de canaux calciques et leur classification.

La première classification des canaux calciques a été fondée sur des critères électrophysiologiques. Cependant, à ces critères biophysiques ce sont rapidement associés des critères pharmacologiques suite à la découverte de toxines animales spécifiques (Tsien et al., 1991; Miller et al., 1992; Zhang et al., 1993). En effet, pour certains canaux calciques, les critères électrophysiologiques ce sont révélés insuffisants. Les antagonistes calciques issus de venins animaux, du fait de leur très haute spécificité et affinité, ont été les seuls à pouvoir différencier certains sous-types de canaux calciques (Saccomano et Ahlijamian, 1994; Olivera et al., 1994; Uchitel et al., 1997). Ces toxines sont aujourd'hui des outils de référence couramment utilisés par les pharmacologues et les électrophysiologistes.

# Distinction des différents sous-types de canaux calciques selon des critères électrophysiologiques

Selon des critères électrophysiologiques, les canaux calciques sont répartis en deux catégories principales : les canaux activés à haut-voltage ou "HVA" (High-Voltage-Activated) et les canaux activés à bas-voltage ou "LVA" (Low-Voltage-Activated) (Sher et al., 1991).

Les canaux calciques "HVA" sont activés par de fortes dépolarisations et forment un groupe très hétérogène de canaux calciques. En effet, parmi ceux-ci on distingue des canaux qui possèdent une inactivation très lente, tel que les canaux de type L- (pour "long lasting"), et des canaux calciques qui ont une cinétique d'inactivation plus rapide. Ces derniers sont représentés par plusieurs sous-types de canaux calciques neuronaux: N-, P/Q- et R- (Nowycky et al., 1985; Fox et al., 1987; Neveu et al., 1993). Les différents canaux neuronaux possèdent des propriétés électrophysiologiques très proches. De ce fait, il est plus difficile de les différencier entre eux sur ces seuls critères biophysiques. Pour les distinguer, il a fallut attendre la caractérisation de ligands spécifiques issus des venins animaux (Miljanich et Ramachandran, 1995).

Les canaux calciques "LVA" ne sont représentés que par les canaux de type T-. Ils s'ouvrent à des potentiels très faibles, c'est à dire à des potentiels très proches du potentiel de membrane, et s'inactivent très rapidement (Sher et al., 1991). Ces canaux calciques possèdent des propriétés électrophysiologiques très différentes des canaux "HVA", ce qui permet de les distinguer aisément des autres sous-types (Carbone et Lux, 1984; Bean (b), 1989).

# Distinction des différents sous-types de canaux calciques selon des critères pharmacologiques

En plus de posséder des caractéristiques biophysiques précises, la plupart des canaux calciques présentent des sensibilités différentes vis-à-vis d'agents pharmacologiques organiques ou polypeptidiques. Dans ce domaine, les toxines spécifiques de venins animaux ont fortement contribué à la caractérisation des différents sous-types de canaux calciques "HVA".

Les canaux de type L- se distinguent très facilement des autres sous-types de canaux calciques par leur sensibilité aux dihydropyridines (Schramm et al., 1985; Triggle et Janis, 1987). Ils possèdent toutefois une sensibilité très importante vis-à-vis l' $\omega$ -Aga IIIA, qui est une toxine isolée du venin d'araignée Agelenopsis aperta (Mintz et al., 1991; Cohen et al., 1992). D'autre part, les canaux calciques de type L- " $\alpha$ 1D" peuvent être différenciés des autres sous-types de canaux de type L- par la calciseptine, toxine isolée du venin de serpent Dendroaspis polylepsis (De Weille et al., 1991). Les canaux calciques de type L- participent activement aux phénomènes d'excitation-contraction et se trouvent principalement à la surface des cellules musculaires et cardiaques.

Les canaux calciques neuronaux N-, P-, Q- et R- se distinguent entre eux par leur sensibilité vis à vis de toxines isolées de venins animaux de nature polypeptidique.

Les canaux de *type N*- (pour "Neither" T-, "Neither" L-), sont très bien caractérisés par une toxine de cône marin *Conus geographus*, l' $\omega$ -conotoxine GVIA ( $\omega$ -CgT-GVIA) (Olivera et

al., 1984). Cette toxine est devenue de ce fait le ligand de référence pour caractériser ce canal dans différents tissus.

Les canaux de type P- sont caractérisés par l' $\omega$ -agatoxine IVA et IVB ( $\omega$ -Aga IVA et IVB), qui sont des toxines isolées du venin d'araignée Agelenopsis aperta (Mintz et al., 1992 (a)). Ces canaux ont été nommés type P- (pour "Purkinje"), du fait de leur très forte densité au niveau des cellules de Purkinje du cervelet (Llinas et al., 1989; Regan et al., 1991; Mintz et al., 1992 (b), 1995).

Les canaux de type Q- ne possèdent pas de ligand spécifique tel que les canaux de type N- et P-, permettant de les caractériser facilement. Toutefois, ils présentent une sensibilité significative vis-à-vis de l' $\omega$ -conotoxine MVIIC ( $\omega$ -CTx-MVIIC), qui est une autre toxine extraite d'un venin de cône marin (*Conus magus*) (Hillyard et al., 1992). Ces canaux ont été caractérisés après le canaux de type P-, c'est pourquoi, ils ont été nommés type Q-. Par ailleurs, ils sont très proches des canaux de type P- (Sather et al., 1993; Zhang et al., 1993; Wheeler et al., 1994; Martin-Moutot et al., 1995). En effet, il semblerait que le canal de type Q- soit codé par le même gène que celui du type P-, le gène  $\alpha$ 1A (Nooney et al., 1997).

Enfin le *canal de type R*- (pour "Résistant"), ne possédait jusqu'à maintenant, pas de ligand spécifique (Zhang et al., 1993; Soong et al., 1993; Bourinet et al., 1996; Nooney et al., 1997). Ce canal résistant à tous les antagonistes calciques connus, a seulement très récemment trouvé un ligand spécifique. Celui-ci a été isolé d'un venin d'araignée, et nommé SNX-482 (Newcomb et al., 1998). Cependant, tous les canaux décrits comme des canaux de type R-dans différents tissus ne sont pas sensibles à cette toxine.

Quant aux *canaux de type T-*, qui sont très facilement reconnaissables par leurs propriétés électrophysiologiques, ils peuvent être aujourd'hui caractérisés par une toxine issue d'un venin de scorpion, la kurtoxine (Chuang et al., 1998). La fonction physiologique du type T- est encore mal définie. Toutefois, d'après son potentiel d'activation et sa cinétique, il est probable qu'il soit impliqué dans la génération d'activités répétitives de type pacemaker (Carbone et Lux, 1984; Nilius et al., 1985; Huguenard et al., 1996; Perez-Reyes et al., 1998). Ces canaux calciques se trouvent sur la plupart des cellules excitables et sont souvent coexprimés avec les canaux de type L-.

### 1. 1. 4. Conclusion

La caractérisation de tous les sous-types de canaux calciques voltage-dépendants n'est pas terminée. D'autre sous-types de canaux calciques existent, mais ne sont pas encore caractérisés au niveau moléculaire. C'est le cas par exemple, du récepteur du canal calcique inhibé par la mapacalcine (Morel et al., 1997). D'autres par contre, manquent de ligands spécifiques permettant de les caractériser au niveau pharmacologique. C'est le cas en particulier, des canaux de type R- (Bourinet et al., 1997). Les ligands pharmacologiques et en particulier les toxines animales ont apporté une contribution considérable dans la classification des canaux calciques voltage-dépendants. Ces toxines animales ont permis de disséquer les différentes composantes des courants calciques neuronaux et ainsi de caractériser les différents sous-types et de déterminer leur rôle (Turner et al., 1992; Turner et Dunlap, 1995; Saccamono et Ahlijamian, 1994; Olivera et al., 1994; Randall et Tsien, 1995). L'identification de nouvelles toxines agissant spécifiquement sur des canaux calciques serait d'un apport non négligeable pour améliorer nos connaissances et étendre la diversité des outils pharmacologiques.

## 1. 2. Les toxines animales ligands des canaux calciques voltage-dépendants.

## 1. 2. 1. Introduction.

Les canaux calciques voltage-dépendants représentent une cible de choix pour les toxines animales. En effet, ces canaux sont essentiels dans le mécanisme de la contraction musculaire et de la transmission synaptique. Certains animaux venimeux et notamment les cônes marins et les araignées, ont élaborés dans leur venin un grand nombre de toxines agissant spécifiquement sur les canaux calciques voltage-dépendants et plus particulièrement sur les canaux calciques neuronaux (Olivera et al., 1994). Ceux-ci représentent un point critique dans la transmission synaptique d'un signal éléctrique du neurone vers la cellule musculaire. Brièvement, lorsqu'un influx nerveux (potentiel d'action) propagé par un axone arrive à la terminaison nerveuse, celle-ci se dépolarise et entraîne l'ouverture transitoire des canaux calciques présynaptiques. L'entrée massive d'ions calcium dans le fente synaptique provoque la libération de l'acétylcholine qui se fixe sur les récepteurs nicotiniques localisés sur la fibre musculaire et provoque la contraction musculaire.

Bien que des toxines spécifiques de canaux calciques aient également été découvertes dans des venins de serpents ou encore dans des venins de scorpions (De Weille et al., 1991; Chuang et al., 1998), les venins de cônes marins et les venins d'araignées constituent les sources les plus connues et les plus riches en toxines ciblées contre les canaux calciques (Gray et al., 1988; Olivera et al., 1985, 1994). Le tableau 2 présente les toxines inhibitrices des canaux calciques, les plus connues.

Afin de distinguer les toxines spécifiquement ciblées contre les canaux calciques des autres toxines de ces venins, le nom des toxines isolées des venins de cônes marins et d'araignées est précédé de la lettre grecque " $\omega$ ". En effet, les cônes marins et les araignées possèdent dans leur venin une panoplie de toxines dirigées contre différentes cibles moléculaires (Olivera et al., 1990). Pour les distinguer, celles-ci ont été classées en fonction de leur cible. Ainsi, dans les venins cônes marins, on distingue les  $\omega$ -conotoxines dirigées contre les canaux calciques, des  $\mu$ -conotoxines et des  $\delta$ -conotoxines qui bloquent préférentiellement l'activité des canaux sodiques (Ohizumi et al., 1986 a, b; Cruz et al., 1985; Gonoi et al., 1987; Shon et al., 1995). Les  $\kappa$ -conotoxines quant à elles, bloquent les canaux potassiques (Shon et al., 1998) et les  $\alpha$ -conotoxines se fixent sur les récepteurs nicotiniques (Martinez et al., 1995; Favreau et al., 1999).

De même, dans le venin d'araignée le plus étudié, à savoir celui d'Agelenopsis aperta on trouve les  $\omega$ -agatoxines, antagonistes sélectifs des canaux calciques voltage-dépendants, mais aussi les  $\mu$ -agatoxines qui modulent l'activité de canaux sodiques et les  $\alpha$ -agatoxines, puissantes polyamines qui bloquent les récepteurs au glutamate (Adams et al., 1990).

29

Toutefois, à la différence des toxines de cônes marins et d'araignées, les noms des toxines agissant sur les canaux calciques provenant d'autres espèces animales, ne sont pas précédés de la lette " $\omega$ ". Les noms de ces toxines sont le plus souvent inspirés du nom des espèces qui les synthétisent ou du canal qu'elles affectent.

Toxine	espèce animale	Origine	sous-type de canal affecté	affinité
ω-CTx GVIA	cônes marins	Conus geographus	N- spécifique	10 à 100 pM
ω-CTx MVIIA		Conus magus	N- spécifique	10 à 100 pM
ω-CTx MVIIC			N-, P-, Q-	1nM pour type Q- 150 nM pour type N-
ω-CTx SVIB		Conus striatus	N-, P-, Q-	pour type IV-
ω-aga IVA/B	araignées	Agelenopsis aperta	P-	2-3 nM/très
SNX-325		Segestria florentina	N- spécifique	3 à 30 nM
SNX 482		Hysterocrates gigas	R-	15-30 nM
$\omega$ -grammatoxine SIA		Grammostola spatulata	N-, P-, Q-	
calciseptine	serpents	Dendroaspis polylepsis	L-	< 1 nM
calcicludine		Dendroaspis angusticeps	L- (N-, P-, Q-)	< 1 nM
kurtoxine	scorpion	Parabuthus transvaalicus	T-	15 nM

Tableau 2.	Toxines animales	agissant sur le	es différents	sous-types	de canaux	calciques	voltage-
	dépendants,	provenant de d	ifférentes es	pèces anima	ales		

## 1. 2. 2. Les toxines de venins de cônes marins

Plusieurs toxines présentant une spécificité très intéressante vis-à-vis des canaux calciques ont été isolées à partir de différents venins de cônes marins. Les toxines de cônes marins ou  $\omega$ -conotoxines, sont des petits polypeptides de 10 à 30 résidus d'acides aminés à trois ponts disulfure. Presque invariablement, les toxines de cônes marins, sont généralement beaucoup plus petites que les toxines isolées des autres espèces animales, qui contiennent de 35 à 100 résidus d'acides aminés (Olivera et al., 1990). Les séquences primaires des  $\omega$ -conotoxines sont très différentes entre elles. Seul l'arrangement des résidus de 6 cysteines dans la séquence est conservé. La figure 3 présente un alignement de séquences primaires de quelques  $\omega$ -conotoxines.

ω-CTx GVIA	1 5 C K S D G S S C	# SOTSYN	* CCr_s	# С N О Y T	* `KRCY	conus geographus
<b>ω-CTx MVIIA</b> <b>ω-CTx MVIIB</b> <b>ω-CTx MVIIC</b> <b>ω-CTx MVIID</b>	CKGKGAKC CKGKGASC CKGKGAPC CQGRGASC	S R L M Y D H R T S Y D R K T M Y D R K T M Y N	ССт G S ССт G S СС S G S СС S G S	C R S C N R C_ G R R C N R	GKC GKC GKC	conus magus
ω-CTx SVIA ω-CTx SVIB	CrssgsoC CklkgqsC	GVTSI_ RKTSYD	C C _ G R C C s G s	C yr C_ grs	с к С т с к С	conus striatus

Figure 3. Alignement de séquences de toxines issues de venins de cônes marins.  $\omega$ -CTx GVIA, *Conus geographus* (Olivera et coll., 1984),  $\omega$ -CTx MVIIA,  $\omega$ -CTx MVIIC,  $\omega$ -CTx-MVIIB et  $\omega$ -CTx-MVIID, *Conus magus* (McIntosh et coll., 1982; Hillyard et coll., 1992).  $\omega$ -CTx-SVIA et l' $\omega$ -CTx-SVIB, *Conus striatus* (Ramilo et coll., 1992; Newcomb et Palma, 1994).

#### Conus geographus

L' $\omega$ -conotoxine GVIA ( $\omega$ -CTx-GVIA) est la première toxine polypeptidique à avoir suscité un vif intérêt pour l'étude des canaux calciques. Cette toxine, isolée à partir du venin de cône marin, *Conus geographus* en 1984 par le groupe d'Olivera (Olivera et al., 1984), possède une sélectivité exceptionnelle vis-à-vis des canaux de type N- (Nowycky et al., 1985; Cruz et Olivera et al, 1986; McCleskey et al., 1987; Sher et Clementi, 1991; Tsien et al., 1991). De plus, son affinité pour ces canaux calciques atteint l'ordre du pM sur certaines préparations de membranes (Abe et al., 1986; Feigenbaum et al., 1988; Wagner et al., 1988; Barhanin et al., 1988). Cette petite toxine de 27 acides aminés à trois ponts disulfure représente aujourd'hui, l'outil pharmacologique le plus couramment utilisé en neuroscience pour caractériser les canaux calciques de type N-.

Depuis la découverte de l' $\omega$ -CTx GVIA les venins de cônes marins ne cessent d'être l'objet de nombreuses investigations en terme de recherche de ligands spécifiques des canaux calciques. Ainsi, d'autres toxines ont été isolées du même venin et d'autres venins de cônes marins.

#### <u>Conus magus</u>

L' $\omega$ -CTx MVIIA isolée du venin de *Conus magus* (McIntosh et al., 1982) possède la même affinité et la même sélectivité pour les canaux de types N- que l' $\omega$ -CTx GVIA (Yeager et al., 1987). La seule différence d'activité entre les deux toxines est leur vitesse de dissociation. Il a été montré que l' $\omega$ -CTx MVIIA se dissociait plus facilement de son récepteur que l' $\omega$ -CTx GVIA (Stoehr et Dooley, 1993). Cette propriété de l' $\omega$ -CTx MVIIA, fait de cette toxine un outil

très utilisé dans les expériences, où des déplacements ou des conditions d'équilibre sont nécessaires. Bien que l'activité des deux toxines soient très proches, l' $\omega$ -CTx MVIIA ne possède que 30% d'homologie de séquence avec l' $\omega$ -CTx GVIA.

Une autre toxine ayant un intérêt pharmacologique, l' $\omega$ -CTx MVIIC, a été isolée à partir de ce venin (Hillyard et al., 1992). Ce peptide de 26 résidus d'acides aminés est peu sélectif vis-à-vis des canaux de type N-, P- et Q-. Cependant, cette toxine est la seule capable d'inhiber avec une très haute affinité les canaux de type Q- (Hillyard et al., 1992; McDonough et al., 1996). De plus son affinité pour les canaux de type Q- dépasse fortement celle pour les canaux de type P- et N- (Kristipati et al., 1994). L' $\omega$ -CTx MVIIC trouve donc son intérêt dans la caractérisation des canaux de type Q-.

Deux variants de l'  $\omega$ -CTx MVIIA et de l' $\omega$ -CTx MVIIC, respectivement  $\omega$ -CTx-MVIIB et l' $\omega$ -CTx-MVIID, sont issus du même venin (McIntosh et al., 1982).

#### Conus striatus

Deux toxines l' $\omega$ -CTx-SVIA et l' $\omega$ -CTx-SVIB, avec une activité significative sur les canaux calciques ont été isolées du venin du venin de *Conus striatus* (Ramilo et al., 1992). L' $\omega$ -CTx-SVIB se lie aux canaux de type N- mais retient aussi une activité significative pour les autres canaux calciques P- et Q- (Newcomb et Palma, 1994).

#### 1. 2. 3. Les toxines de venins d'araignées.

Beaucoup moins étudiés que les venins de cônes marins, les venins d'araignées représentent une source naturelle non négligeable de toxines bloquant des canaux calciques. Les difficultés inhérentes à la collecte de ces venins semble en partie avoir freiné leur étude. Le venin de l'araignée *Agelenopsis aperta* est le seul à avoir été extensivement étudié (Jackson et Usherwood., 1988; Olivera et al., 1994). Les toxines agissant sur les canaux calciques issues de ce venin, ont été classées sous le terme d''ω-agatoxines". Depuis la découverte de toxines agissant sur les canaux calciques dans les venins d'araignées, d'autres toxines de ce groupe d'animaux ont été caractérisées.

A la différence, des toxines isolées de cônes marins, les toxines d'araignées sont beaucoup plus hétérogènes. Leur taille peut varier de 40 à 100 résidus d'acides aminés (Figure. 4). D'autre part, certaines de ces toxines seulement, possèdent un agencement des résidus de cystéines relativement similaire. C'est le cas des  $\omega$ -agatoxines IVA et IVB, et d'une toxine récemment isolée du venin de *Segestria florentina* : SNX 325 (Figure 4).

```
on-Agaila
A K A L P P G S V C D G N E S D C K CY G K WH K C R C P W K WH F T G E G P C T C E K G MK H T C I T K L H C P N K A E W G L D W
S P C

on-Agaila
S C I D I G G D C D G E K D D C Q C R R N O Y C S CY S L F O Y L K S O C K C V V O T S A E F Q O I C R R K A R K CY N S D P D K C E S H N K P K R R
S C I D I G G D C D G E K D D C Q C R R N O Y C S CY S L F O Y L K S O C K C V V O T S A E F Q O I C R R K A R K CY N S D P D K C E S H N K P K R R

on-Agaila
K K K C I A K D Y G R C K WG G T P _ _ _ _ C C R G R G C I C _ _ _ _ _ _ S I MG T N C E C K P R L I ME G L G L A
S N A A G I N B E D N C I A E D Y G K C T WG O T K _ _ _ C C R G R P C R C _ _ _ _ _ S N I G T N C E C T P R L I ME G L S F A
S N X-325 _ _ _ S C I E S _ _ G K S C T H S R S MK NG L C C P K S R C N C R Q I Q H R H D Y L G K R K Y S C R C S

S NX-482
G V D K A G C R Y M F G G C S V N D D _ _ C O R L G C _ _ H S L F S Y _ C A WD L T F S D
S N X A B C R Y M F G G C S V N D D _ _ C O R L G C _ _ H S L F S Y _ C A WD L T F S D
```

Figure 4. Séquences primaires de quelques toxines de venins d'araigneés agissant sur les canaux calciques voltagedépendants : l'ω-AgaIA, l'ω-Aga IIIA et les ω-AgaIVA et B ont été isolées à partir du venin d'Agelenopsis aperta (Adams et coll., 1990; Santos et al., 1992 ; Mintz et al., 1991, 1992) ; SNX-325 a été isolée du venin de Segestria florentina (Newcomb et coll., 1997) ; SNX-482 a été isolée du venin de Hysterocrates gigas (Newcomb et al., 1998).

## Les w-agatoxines d'Agélenopsis aperta

Les  $\omega$ -agatoxines sont classées en quatre types, de I à IV, selon leur activité et leurs homologies de séquences (Pocock et al., 1992).

Les  $\omega$ -agatoxines de type I et de type II présentent moins d'intérêt pharmacologique. En effet, ces toxines d'araignées ne bloquent que les canaux calciques présynaptiques des jonctions neuromusculaires chez les insectes, et n'affectent pas les canaux calciques des vertébrés (Scott et al., 1990). Les  $\omega$ -agatoxines de type I ( $\omega$ -AgaIA,  $\omega$ -AgaIB,  $\omega$ -AgaIC) sont des hétérodimères de 7 kDa et de 10 cystéines (Adams et al., 1990; Santos et al., 1992). Les  $\omega$ -agatoxines de type II ( $\omega$ -Aga IIA,  $\omega$ -Aga IIB) ont une masse moléculaire de 10 kDa et possèdent très peu de similitudes de séquence avec les toxines de type I (Bindokas et Adams 1989).

Par contre, les  $\omega$ -agatoxines de type III A, B, C, bloquent tous les canaux calciques des vertébrés. Elles inhibent à la fois des canaux de type L- et les canaux de type N- (Mintz et al., 1991; Cohen et al., 1992; Ertel et al., 1994). L' $\omega$ -aga IIIA possède la particularité d'inhiber avec une très bonne affinité (inférieure à 1 nM), les canaux de L- et de type N- (Mintz et al., 1994). Cette toxine est un long polypeptide de 76 acides aminés à 6 ponts disulfure.

Les  $\omega$ -AgaIVA et  $\omega$ -AgaIVB représentent aujourd'hui, les seules toxines capables d'inhiber sélectivement les canaux calciques de type P- (Mintz et al., 1992 (a)). Ces deux toxines possèdent une même affinité pour le canal, qui est de 2 à 3 nM. Ces deux toxines de 48 résidus d'acides aminés à 4 ponts disulfure partagent néanmoins, seulement 71 % d'homologie de séquence. Il a par ailleurs été montré, que l' $\omega$ -Aga IVB bloquait huit fois plus lentement le canal que sont homologue, l' $\omega$ -aga-IVA (Adams et al., 1993 ; Reily et al; 1994) et que cette différence d'activité provenait du remplacement des trois résidus basiques de l' $\omega$ -aga IVA, de la partie N-terminale par des résidus acides, dans l' $\omega$ -aga IVB.

### Autres toxines d'araignées agissant sur les canaux calciques

Récemment, Newcomb et al. ont isolé deux nouvelles toxines d'araignées agissant sur les canaux calciques voltage-dépendants, SNX-325 et SNX-482. SNX-325, isolée du venin d'araignée *Segéstria florentina*, agit sélectivement sur les canaux de type N- et inhibe ces canaux avec la même potentialité que les  $\omega$ -conotoxines (Newcomb et al., 1995). Cette toxine est proche des  $\omega$ -AgaIVA et  $\omega$ -AgaIVB. Elle possède 47 acides aminés et 8 résidus de cystéines dont l'arrangement dans la séquence est similaire à celui des  $\omega$ -Aga IVA/B. SNX-482 a été isolée à partir du venin de la tarentule *Hysterocrates gigas*. Cette toxine représente la première toxine animale décrite comme capable d'inhiber sélectivement les canaux de type R- (Newcomb et al., 1998). SNX-482 montre très peu d'homologies avec les autres toxines d'araignées et possède 41 résidus d'acides aminés dont 6 résidus de cystéines.

Enfin, le venin de la tarentule *Grammostola spatulata* est la source de l' $\omega$ -grammatoxine-SIA (Lampe et al., 1993; Keith et al., 1995) qui inhibe spécifiquement les canaux de type non-L, à savoir les canaux N-, P- et Q- (Piser et al., 1995). Cette toxine contient 36 acides aminés dans sa séquence dont 6 cystéines.

Tout ceci prouve que les venins d'araignées représentent une source importante de toxines agissant sur les canaux calciques.

#### 1. 2. 4. Les toxines d'autres espèces animales

Les cônes marins et les araignées ne sont pas les seuls venins à partir desquels ont été isolées des toxines ayant pour cible les canaux calciques. En effet, deux toxines ont été isolées des venins de serpent : la calciseptine qui agit sur les canaux de type L- et la calcicludine, qui agit de façon non spécifique sur tous les sous-types de canaux calciques. La calciseptine a été caractérisée à partir du venin de serpent *Dendroaspis polylepsis* (De Weille et al., 1991), et la calcicludine à partir du venin de serpent *Dendroaspis angusticeps* (Schweitz et al., 1994). Ces deux toxines possèdent 60 acides aminés et leur structure est verrouillée par 4 ponts disulfure.

D'autre part, d'un venin de scorpion, vient d'être isolée la première toxine agissant sur les canaux calciques de type T- (Chuang et al., 1998). Cependant, cette toxine nommée kurtoxine, isolée du venin de *Parabuthus transvaalicus*, possède aussi une activité résiduelle sur les canaux sodiques. Cette activié s'explique partiellement par ses nombreuses similitudes qu'elle partage avec les toxines de scorpions agissant sur les canaux sodiques.
Enfin, une toxine agissant sur un canal calcique insensible à tous les antagonistes calciques connus à ce jour, a récemment été isolée du venin de l'éponge de mer *Cliona vastifica* (Morel et al., 1997). Cette toxine, nommée mapacalcine, est une petite protéine homodimérique de 19 Kda, formée de deux chaînes polypeptidiques de 89 résidus d'acides aminés. L'activité inhibitrice des canaux calciques a été mise en évidence sur des canaux calciques de myocytes intestinaux de souris, mais il a été montré que des récepteurs de la mapacalcine étaient présents sur d'autres tissus, et en particulier dans le cerveau (Vidalenc et al., 1998; Mourre et al., soumis).

.

## CHAPITRE 2. ETUDE D'UNE NOUVELLE FAMILLE DE TOXINES AGISSANT SUR LES CANAUX CALCIQUES NEURONAUX, ISSUE DU VENIN D'ARAIGNEE SEGESTRIA FLORENTINA.

#### 2. 1. Introduction

Comme il a été décrit dans le chapitre 1, La famille des canaux calciques voltagedépendants est une famille de canaux ioniques extrêmement hétérogène. La grande diversité de cette famille a été mise en évidence par les approches pharmacologiques et électrophysiologiques, et confirmée par les techniques de biologie moléculaire (Tsien et al., 1991; Miller, 1992; Zhang et al., 1993; Mori et al., 1996). Nous sommes donc en présence, aujourd'hui, d'une grande variété de types et de sous-types de canaux calciques ayant parfois des propriétés électrophysiologiques semblables et pour lesquels il est difficile de définir un rôle physiologique précis. D'autre part, tous les canaux calciques ne sont pas encore répertoriés (Morel et al., 1997) et certains canaux ne sont pas encore bien définis, c'est notamment le cas des canaux de type R- (Ellinor et al., 1993; Nooney et al., 1997). L'utilisation de ligands spécifiques a déjà facilité la classification des différents sous-types des canaux calciques et a permis d'identifier de nouveaux sous-types. C'est pourquoi, la caractérisation de nouveaux antagonistes calciques pourrait aider à compléter la classification des canaux calciques.

Malgré leur grande richesse en toxines, les venins d'araignées restent les moins explorés à l'heure actuelle. Ils ont par ailleurs, déjà prouvé leur richesse en toxines spécifiquement ciblées contre les canaux calciques (Olivera et al., 1994; Uchitel et al., 1997). Alors que la faune mondiale comprend près de 40000 espèces d'araignées répertoriées, c'est à dire beaucoup plus que de scorpions (1400 espèces), seuls les venins d'une dizaine d'espèces d'araignées ont été étudiés et souvent partiellement. La seule espèce extensivement explorée est celle *d'Agelenopsis aperta*. Les difficultés inhérentes à leur collecte furent longtemps un facteur limitant dans l'exploration de ces venins. Il a fallut attendre le plein développement des techniques de la microchimie pour avoir une meilleure connaissance de leur composition. Aujourd'hui, la collecte du venin reste encore une étape critique. Une électrostimulation ne permet d'obtenir que quelques  $\mu$ l et parfois même moins d'un  $\mu$ l de venin. Il est nécessaire parfois de répéter la stimulation plus de 10000 fois avant de collecter suffisamment de venin pour des études poussées (Wallace, 1997).

En collaboration avec la société LATOXAN (Valence, FRANCE), nous avons cherché à exploiter la biodiversité des venins d'araignées, et de caractériser de nouveaux antagonistes calciques. Pour ce faire, plusieurs venins d'araignées ont dans un premier temps été étudiés. Une sélection a été réalisée et le venin de l'araignée Segestria florentina a fait l'objet de

recherche de nouveaux antagonistes polypeptidiques agissant sur les canaux calciques neuronaux de type N-, P/Q- et R-. Les différents constituants responsables de ces activités inhibitrices ont été isolés et caractérisés.

#### 2. 2. Origine et choix du venin d'araignée Segestia florentina.

Des études préalables ont été effectuées sur plusieurs venins d'araignées fournis par la société LATOXAN (Valance, France). Deux critères de sélection ont été utilisés, afin de retenir les venins les plus intéressants. Le premier critère fut l'activité antagoniste des venins sur les canaux calciques neuronaux de type N-, P/Q- et R-. Le second critère fut la richesse des venins en constituants polypeptidiques, déterminée par chromatographie analytique.

#### 2. 2. 1. Tests pharmacologiques.

Les tests pharmacologiques ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de physiologie de Lilly Research Center, en Angleterre. Un test pharmacologique simple et rapide a été utilisé pour cibler les venins ayant un potentiel antagoniste significatif sur le canaux calciques neuronaux, N-, P/Q- et R-. Ce test mesure l'entrée de calcium dans la cellule suite à une stimulation générée par une variation de concentration en K<sup>+</sup> extracellulaire.

Pour ce test, des cellules HEK 293 (Human Embryonic Kidney), ont été transfectées avec trois sous-types différents de canaux calciques voltage-dépendants humains:  $\alpha 1_A \alpha 2\delta\beta 4a$ ,  $\alpha 1_B \alpha 2\delta\beta 1b$  et  $\alpha 1_E \alpha 2\delta\beta 1b$  (Williams et al., 1992 et 1994). Les canaux calciques des cellules transfectées par  $\alpha 1_A \alpha 2\delta\beta 4a$  sont inhibés par l' $\omega$ -agaIVA et l' $\omega$ -CTx MVIIC et ont des propriétés électrophysiologiques correspondant à celles des canaux calciques P- et Q-. Les canaux calciques des cellules transfectées par  $\alpha 1_B \alpha 2\delta\beta 1b$  sont bloqués sélectivement par l' $\omega$ -CTx GVIA et possèdent les propriétés électrophysiologiques transfectées par  $\alpha 1_B \alpha 2\delta\beta 1b$  ne sont affectés par aucun des quatre constituants:  $\omega$ -agaIVA,  $\omega$ -CTx MVIIC,  $\omega$ -CTx GVIA, et nifédipine, laissant supposer que ces canaux calciques sont de type R-.

#### **Méthodes**

Les cellules HEK 293 sont maintenues dans une solution (Gibco 320-1965AJ), contenant du serum de veau foetal (5.5%) (Hyclone A-2151-L), de la pénicilline G (100 U/ml), de la streptomycine sulphate (100  $\mu$ g/ml) et de la généticine (1  $\mu$ g/ml). Les cellules sont déposées dans des plaques de 96 puits (2x10<sup>5</sup> cellules/puits) contenant de la poly-lysine à 10  $\mu$ g/ml, 18 heures avant l'expérience. Les cellules sont ensuite lavées avec une solution de

Tyrode's et chargées avec un agent fluorescent: le fluo-3AM (20  $\mu$ M), pendant 1 h. L'excès en fluo-3 est éliminé par lavages successifs avec la solution de Tyrode's. 10  $\mu$ g/ml ou 30  $\mu$ g/ml de venin sont ajoutés, avant la dépolarisation. Les cellules sont dépolarisées avec du KCl de concentration finale 70 mM. Dans l'expérience témoin, chaque lignée cellulaire révèle une augmentation de fluorescence en réponse à la dépolarisation ce qui correspond à une entrée de calcium dans la cellule de 400 à 800 nM. L'entrée de calcium est très rapide (quelques secondes), et la quantité de calcium intracellulaire retourne à l'état normal en 2 à 3 min. Ce signal transitoire de calcium est capté simultanément pour chaque puit. Les résultats sont enregistrés par le fluorimètre Fluoroskan II et sont analysés par le logiciel Excel 5 adapté à l'analyse des résultats par Visual Basic 3.0, C++.

#### 2. 2. 2. Détermination de la richesse des venins par chromatographie.

Chaque venin a été analysé par chromatographie analytique en phase inverse. Cette méthode de séparation, adaptée à la séparation de constituants de nature polypeptidique, est une technique très résolutive. Deux polypeptides très proches, ne différant que d'un seul résidu d'acide aminé, peuvent être séparés par cette technique de chromatographie. Elle permet donc d'avoir un aperçu de la richesse d'un mélange de constituants.

Les chromatographies ont été réalisées sur un colonne C18 Nucléosil analytique (4.6 mm x 250 mm; 5  $\mu$ m, 100 Å).

#### 2. 2. 3. Résultats

Huit venins ont été étudiés. Pour des raisons de confidentialité, ces venins nous ont été fournis avec des numéros (V45, V46, V47, V49, V50, V52, V53, V55). Le tableau 5 présente les résultats obtenus. Deux venins, V49 et V50, ont une activité significative d'inhibition des canaux calciques neuronaux N-, P/Q- et R-. Bien que le venin V50 soit moins riche en constituants, celui-ci possède une activité plus importante d'inhibition des canaux calciques, et notamment des canaux de type R-. Pour ces raisons, ce venin a été sélectionné. De plus, 400 mg de venin V50 étaient disponibles, contre seulement 100 mg pour le venin V49.

Tableau 3.
Richesse des venins déterminée par chromatographie, et pourcentage d'inhibition des canaux calciques neuronaux
N-, P/Q- et R Les résultats pharmacologiques sont exprimés en pourcentage d'inhibition du flux calcique à
travers les canaux calciques suite à une stimulation.

Venin	Richesse	α1A (type P/Q-) 30µg/ml %	α1B (type N-) 10 μg/ml %	α1E (type R-) 10 μg/ml %	Activité cumulée %
V45	*	12	0	0	_
V46	*	36	0	0	*
V47	***	34	0	0	*
V49	***	35	61	36	***
V50	**	43	97	61	***
V52	**	47	0	7	**
V53	-	39	6	0	*
V55	*	41	28	6	**

ennement riches

venins pauvres

Le venin V50 a donc fait l'objet d'une étude approfondie afin de caractériser les toxines dirigées contre les canaux calciques de type N-, P/Q- et R-. Par la suite, le nom de ce venin nous a été communiqué. Il s'agit du venin de l'araignée Segestria florentina.

2. 3. Purification et caractérisation des antagonistes des canaux calciques neuronaux de type N-, P/Q- et R-, du venin de Segestria florentina.

# 2. 3. 1. Purification, structure et activité de six nouvelles toxines agissant sur les canaux calciques.

A partir du venin de *Segestria florentina*, six nouveaux antagonistes polypeptidiques des canaux calciques neuronaux, N-, P/Q- et R- ont été purifiés et caractérisés. Ces constituants sont des polypeptides à quatre ponts disulfure, de taille allant de 45 à 49 résidus d'acides aminés. Ils ont été nommés selon leur ordre d'élution chromatographique: Sf12, Sf17, Sf18, Sf20, Sf21 et Sf22.

Des études d'homologies de séquence primaire avec d'autres toxines d'araignées et d'autres antagonistes polypeptidiques des canaux calciques ont montré que la structure primaire de ces antagonistes polypeptidiques était originale. Parmi ces nouveaux antagonistes, deux toxines présentent des caractéristiques inhibitrices intéressantes: Sf17 du fait de sa spécificité relative pour les canaux de type N-, et Sf20 du fait de sa potentialité à inhiber les canaux de type R-.

Les travaux effectués sur ce venin d'araignée, ont été soumis au périodique "European Journal of Biochemistry".

"Isolation and Characterization of six Novel Calcium Channel Antagonist Polypeptides from The Venom of Spider Segestria florentina."

NATHALIE MOKRZYCKI, HERVE DROBECQ, JOHN BOOT, PIERRE SAUTIERE, YVON DOLJANSKI, ANDRE TARTAR AND GUY LIPPENS.

Isolation and Characterization of Six Novel Calcium Channel Antagonist Polypeptides from the Venom of the Spider Segestria florentina.

Nathalie Mokrzycki<sup>1</sup>, Hervé Drobecq<sup>1</sup>, John Boot<sup>2</sup>, Pierre Sautière<sup>1</sup>, Yvon Doljanski<sup>3</sup>, André Tartar<sup>1</sup>, Guy Lippens<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR 8525, Institut de Biologie de Lille-Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette - BP 447 - 59021 LILLE -FRANCE-<sup>2</sup>Lilly Research Center Ltd., Windlesham, Surrey GU20 6PH, UK <sup>3</sup>Latoxan - AP1724 - f-05150 ROSANS - FRANCE

Correspondence to G. Lippens

Running title : Ca<sup>2+</sup> channel antagonists from *Segestria florentina* venom

Keywords: spider toxins, calcium channel, antagonist polypeptides.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: HPLC, high performance liquid chromatography; PVDF, polyvinylidene difluorure; HF, hydrogen fluoride; TCEP, Tris (2-carboxyethyl) phosphine, TFA, trifluoroacetic acid.

#### ABSTRACT

We describe the isolation of a new family of calcium channel antagonists isolated from the venom of the *Segestria florentina* spider. The six polypeptides ranging in size from 45 to 49 amino acid residues and characterized by height cysteine residues, forming four disulfide bridges, distinguish themeselves from the previously described  $\omega$ -agatoxins IVA and IVB by the insertion of a loop between cysteine VI and VII. Functional characterization against N-, P/Q-, and R-type calcium channels allowed evaluation of their relative affinity and specificity and revealed that one antagonist is a promising ligand against the R-type calcium channels.

#### INTRODUCTION

The calcium (Ca) ion has a pivotal role in many physiological mechanisms, and the transient increase of intracellular Ca concentration is the trigger for a number of functions including gene expression, muscle contraction, neurotransmitter release or gating of other channels [1]. This diversity of tasks is regulated by an equally diverse panoply of channel proteins [2-4]. Vertebrate voltage-gated Ca channels have been classified according to their pharmacological and electrophysiological properties and to their tissue localization [2]. To date, six different types have been well identified in native cells, classified into T-, L-, N-, P-, Q- and R-type Ca channels [5, 6]. They have been divided according to their electrophysiological behaviour into two broad categories of "low voltage-activated" (T-type channels), and "high voltage-activated" Ca channels (L-, N-, P-/Q- and R- types channels), [2, 7]. Concurrently, molecular cloning has revealed the existence of eight distinct Ca channel  $\alpha_1$  subunits ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,

 $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{1E}$ ,  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$ ,  $\alpha_{1S}$ ), that are the pore forming subunits and the receptors for antagonist drugs [8]. Pharmacological subtyping of the vertebrate Ca channels and correlation with the different cloned Ca channels have been strongly facilitated by selective agents available for each channel type. L-type Ca channels are distinguished from the other neuronal Ca channels (N-, P-/Q-, R-) by their sensitivity to dihydropyridines (DHPs) [1], whereas the discrimination between the various neuronal Ca channels (N-, P-, Q-) has been strongly facilitated by the discovery of highly potent and selective peptide toxins derived from cone snail and spider venoms [9,10].

First discovered in the venom of predatory cone snail *Conus geographus* [11, 12], the  $\omega$ -conotoxin GVIA ( $\omega$ -CgTx) remains the most potent and selective antagonist of the N-type Ca channel, and is widely used as the standard ligand for characterizing the voltage-sensitive N-type Ca channels [13, 14]. Other inhibitors of Ca channel were also characterized in cone snail venom, such as the  $\omega$ -conotoxin MVIIA (specific to N-type) and MVIIC (specific to P/Q-type) isolated from the venom of *Conus magus*, and SVIB extracted from the venom of *Conus striatus* (specific to P/Q-type) [15-18]. Spider venoms have recently attracted considerable interest, and a detailed study of the venom of the American funnel-web spider, *Agelenopsis aperta*, has yielded the  $\omega$ -agatoxins IVA and IVB, two selective inhibitors of the P-type Ca channels, [19-22], as well as  $\omega$ -agatoxins IIIA, B, C, acting in a less selective manner on both L- and N-type Ca channels [23-25]. An N-type Ca channel antagonist has been isolated from the venom of the R-type Ca channel was characterized in the venom of the African tarantula *Hysterocrates gigas* [27].

We propose in this paper to further explore the natural bio-diversity available in the venom of the *Segestria florentina* spider for peptides that act on three subtypes of neuronal Ca channels: N-, P/Q- and R-type. We have identified and characterized at the structural and

functional level six novel antagonist polypeptides of Ca channels. The comparison of this new family with the  $\omega$ -agatoxins gives further insight into the mechanism of channel blocking. We believe that this new family of ligands with differential activities and specificities will be very helpful to enhance the discrimination between the different Ca channel subtypes and to provide molecular tools to assess the structural features of the channels.

### MATERIALS AND METHODS

#### Venom source

Crude venom from *Segestria florentina* spider collected in central Asia was obtained from LATOXAN (Valence, France) as a lyophilized powder.

All reagents and solvents were of the highest purity available. Carboxypeptidases A (E.C.3.4.17.1) and B (E.C.3.4.17.2) treated with phenylmethylsulfonylfluoride were purchased from Sigma and Worthington. Carboxypeptidase P (E.C.3.4.17.16) sequencing grade was purchased from Boehringer Mannheim. Pepsin (E.C.3.4.23.1) and thermolysin (E.C.3.4.24.4) were obtained from Boehringer Mannheim. Trypsin (E.C.3.4.24.4) treated with tosylphenylalanyl-chloromethane and chymotrypsin (E.C.3.4.21.1) treated with tosylphenylalanyl-chloromethane.

#### **Purification procedure**

Crude venom (200 mg) was dissolved in 5.5 ml of 1% acetic acid and filtered through a 1  $\mu$ m acrodisc before loading onto a Sephadex G-50 Fine column (26 x 1000 mm). The column was equilibrated and eluted with 1% acetic acid at a flow-rate of 40 ml/h. The elution was monitored at 280 nm. The fractions containing the peptides of interest were then pooled and lyophilized. This peptidic fraction was further submitted to a reversed-phase HPLC<sup>1</sup> on a C18 Nucleosil column (10 x 500 mm, 5  $\mu$ m particule size, 100 Å pore size), equilibrated at 50°C in 0.05% TFA. Elution of peptides monitored at 280 nm was performed with a linear gradient of 30-80% solvent B (solvent A = 0.05% TFA; solvent B = 60% CH<sub>3</sub>CN and 0.045% TFA) for two hours at a flow-rate of 2.5 ml/min. The peptides named Sf (from *Segestria florentina*) were numbered according to the order of elution.

#### Capillary electrophoretic analysis

Capillary electrophoresis was carried out on an HPCE 270 A capillary electrophoresis system (Applied Biosystem), in 20 mM sodium citrate buffer pH 2.5 at 30 kV and 30°C for 10 min, using a 50-cm capillary, 50  $\mu$ m in diameter. Samples were injected under 5-in. vacuum. Electrophoretic separation was monitored at 200 nm.

#### Mass spectrometry analysis

Plasma desorption mass spectra were recorded on a Bio-Ion 20  $^{252}$ Cf fission fragment ionization time-of-flight mass spectrometer. Aliquots of approximately 10-20  $\mu$ l of HPLC fractions were deposited onto a nitrocellulose backed aluminium foil. The spectra were accumulated during 10<sup>6</sup> fission events (about 15-20 min).

Electrospray mass spectra of spider venom polypeptides were performed on a Api I Perkin Elmer Sciex in the positive mode. The proteins were dissolved in a 20% acetonitrile solution containing 0.1% formic acid, at a concentration of 20 pmoles/ $\mu$ l.

## Protein sequence determination

Amino acid analyses were performed on a Beckman 6300 amino acid analyzer after hydrolysis in 6 M HCl under vacuum at 110°C for 24 h in the presence of 0.25% phenol. Sequencing of the S-carboxamidoethylated peptides was carried out on a gas phase sequencer (Applied Biosystem 470 A). Phenylthiohydantoin derivatives of amino acids (PTH-AA) were identified and quantified on a PTH-amino acid analyzer (Applied Biosystem 120 A). Preparation of Scarboxamidoethylated peptides were performed by reduction of disulfide bridges with 50 mM dithiothreitol in 0.2 M ammonium bicarbonate buffer pH 8.0, containing 6 M guanidinium chloride, under argon at 70°C for 30 min, followed by alkylation of thiol groups with 2 M acrylamide for 45 min at room temperature. The carboxamidoethylated proteins were desalted on a ProSorb<sup>TM</sup> cartridge (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division) designed for the rapid concentration and clean-up of dilute polypeptide or protein onto a PVDF membrane suitable for sequencing.

## C-terminal sequence analysis

The pure polypeptides were reduced and alkylated with acrylamide as described above and desalted on an Applied Biosystem 120 A equipped with C18 Nucleosil column 201HS (2,1 mm x 150 mm). Samples were evaporated and dissolved in 100  $\mu$ l of 0.1 M ammonium bicarbonate buffer pH 8.0. The alkylated polypeptides were then digested with carboxypeptidases A or B for 4h, or carboxypeptidase P for 1h, at 37°C using an enzyme-to-substrate ratio of 1 : 50 by mass. Sf17 was treated with the carboxypeptidase B, because of its basic C-terminal residue (Arg), and Sf20 that contains a hydrophobic C-terminal residue (Ile), with the carboxypeptidase A. Sf12 and Sf18, with a proline or glutamine C-terminal residue, were treated with the carboxypeptidase P and the Sf21 and Sf22 having a serine residue were treated with carboxypeptidase A and P. The amino acids released were analyzed on a Beckman 6300 amino acid analyzer.

## Peptide synthesis and purification

Sf17 polypeptide was synthesized on a automated peptide synthesizer ABI model 430 A (Applied Biosystems Inc.) using a standard solid-phase t-Boc-benzyl strategy with 0.25 mmol of Boc-(Tos)Arg-PAM starting resin (0.60 mmol/g). The peptide chain was assembled by coupling 1 mmol Boc-protected amino acids in the presence of O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphate (HBTU). Side-chain protecting group was as follows : Arg(Tos), Asp(Ochex), Cys(MeBzl), Glu(Ochex), His(Bom), Lys(2-Cl-Z), Met(O), Ser(Bzl), Tyr(Br-Z).

The peptide was cleaved from the resin and simultaneously deprotected according to a low and high HF procedure [28]. The resin (1g) was treated with anhydrous HF (2.5 ml) in the presence of *p*-cresol (0.75g), *p*-thiocresol (0.25g) 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 (0.50g), p-thiocresol (0.50g) and 10 ml of anhydrous HF, and the mixture was allowed to react at 0°C for 2 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 precipitated with 10 ml of trifluoroacetic acid in 200 ml diethyl ether. The crude product was dissolved in 6 M Guanidine Hydrochloride (Gdn HCl) solution containing dithiothreitol (DTT) at 10 mg per ml and purified by reversed-phase HPLC on C18 Nucleoprep column (10 x 500 mm, 5 µm particule size, 100 Å pore size). Homogeneous fractions containing the expected peptide were selected by analytical HPLC and capillary electrophoresis and subsequently pooled and lyophilized. The reduced product was dissolved in 0.1 M Tris pH 8.5 buffer at a final concentration of 20  $\mu$ M and oxidized in the presence of 4 mM/2 mM, reduced/oxidized glutathion [29] at 4°C for 20 h. The solution was then acidified by adding trifluoroacetic acid to bring the final pH to 4.0. The solution was then filtered through 0.45 µm Millipore filter HAWP and loaded onto a C18 Nucleoprep column (10 x 500 mm, 5 µm particule size, 100 Å pore size). The purification of the folded peptide was performed with a linear gradient of acetonitrile in 0.05% TFA at 50°C at a flow-rate of 2.5 ml/min. Pure fractions co-eluting in analytical reversed-phase HPLC performed on a C18 Nucleosil column with a linear gradient from 0 to 60% of solvent B for 60 min and co-migrating in a capillary electrophoresis (see capillary electrophoretic method), with the native peptide were pooled and lyophilized.

#### Transfected HEK293 cell culture

Human embryonic kidney (HEK) 293 cell lines were stably transfected with cDNAs encoding human VDCC subunits as previously described [30]. The electrophysiology and pharmacology of these lines has been reported elsewhere [31, 32]. Briefly the 10-13 ( $\alpha_{1A-2}$ ,  $\alpha_{2b}\delta$ ,  $\beta_{4a}$ ) was selectively blocked by  $\omega$ -aga IVA and  $\omega$ -CTx MVIIC and had pharmacological and electrophysiological properties corresponding to both P-, and Q-type Ca channels. The G1A1 cell line ( $\alpha_{1B-1}$ ,  $\alpha_{2b}\delta$ ,  $\beta_{1b}$ ) was selectively blocked by  $\omega$ -CTx GVIA and possessed electrophysiology and pharmacology similar to N-type Ca channels and the E-52-3 cell line ( $\alpha_{1E-3}$ ,  $\alpha_2\delta$ ,  $\beta_{1b}$ ) was not affected by relatively high concentrations of either  $\omega$ -aga IVA,  $\omega$ -CTx MVIIC,  $\omega$ -CTx GVIA or nifedipine.

#### K+-stimulated calcium assay

HEK 293 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco 320-1965 AJ) supplemented with bovine calf serum (5.5%) (Hyclone A-2151-L), penicillin G (100 U/ml), streptomycin sulphate (100  $\mu$ g/ml) and geneticin (1  $\mu$ g/ml). The cells were plated out into polylysine coated (10  $\mu$ g/ml) 96-well plates (2x10<sup>5</sup> cells/well) 18 h prior to experiment. The cells were then washed with Tyrode's solution and loaded with the Ca sensitive dye fluo-3AM (20

 $\mu$ M) for 1 h. Excess dye was removed by washing with Tyrode's solution and 1  $\mu$ g, 3  $\mu$ g or 10  $\mu$ g *Segestria florentina* polypeptide added to the wells prior to depolarisation with [K<sup>+</sup>]<sub>0</sub>. Cells were depolarized by exposure to either KCl, final concentration 70 mM, for the 10-13 and G1A1 cell lines or KCl final concentration 40 mM (E-52-3). Each cell line exhibited a rise in fluorescence in response to [K<sup>+</sup>]<sub>0</sub> corresponding to a rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> of 400-800 nM. The rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> peaked within seconds and returned to basal levels over a period of 2-3 min. The transient nature of the Ca<sup>2+</sup> signal [30] indicated that it was necessary to inject [K<sup>+</sup>]<sub>0</sub> and capture the data simultaneously for each well. This was achieved using a Fluoroskan II fluorimeter with an injection port incorporated into the read head. A window based microplate software (Genesis Labsystems UK Ltd) was used to control a micro-injector (activation and volume) to inject [K<sup>+</sup>]<sub>0</sub> into each well and capture the kinetics of the Ca<sup>2+</sup> signal in real time. The data generated by genesis is analysed by a custom built application using Visual Basic 3.0, C++ and Excel 5.

### Electrophysiology

The whole-cell patch-clamp technique [33] was used to record transmembrane calcium currents in single HEK 293 cells stably expressing  $\alpha_{1B}$  Ca channels construct. Transfected cells were voltage-clamped at a holding potential of -100 mV and depolarised to a test potential of 0 mV for a duration of 50 msec every 30 sec. Currents were recorded using either a List EPC-7 or Axopatch 1D amplifier and filtered by an eight-pole, low pass Bessel filter and stored on computer. Leak currents and any uncompensated capacitance transients were subtracted from the current records using standard hyperpolarising P/4 protocols.

The pipette solution for voltage-clamp experiments contained (in mM): CsCl, 135; MgCl<sub>2</sub>, 1; HEPES, 10; trisphosphocreatinine, 14; MgATP, 3.6 and 50U/ml creatinine phosphokinase, adjusted to pH 7.1 with CsOH. Extracellular solution contained (in mM): tetraethylammonium (TEA) chloride, 143; CaCl<sub>2</sub>, 5; MgCl<sub>2</sub>, 1; HEPES, 10; glucose, 10, adjusted to pH 7.4 with TEA hydroxide.

After stable whole-cell currents had been obtained, cells were superfused with 1 mg/ml Sf17 (S)/(N). reductions were measured as a percentage of control current.

#### RESULTS

## Fractionation and screening of crude Segestria florentina spider venom, for polypeptides that exhibit activity on Ca channels

Initial fractionation of 200 mg of crude Segestria florentina venom (see Methods) yielded three major fractions. After discarding the fraction (I), that contained high molecular materials (>10kDa), corresponding to enzymes and mucines, and fraction (III), that included low molecular mass components, corresponding to salts and polyamines, 66 mg of fraction (II), that contained compounds with molecular masses ranging between 3500 and 7000 Da, were submitted to a second step of fractionation by reversed-phase HPLC. Twenty two fractions of polypeptides were tested for their activity on cloned human Ca channels, using a calcium blocking assay on HEK293 cells stably transfected with different human voltage-dependent Ca channel subunits (VDCCs)  $\alpha_{1A}\alpha_2\delta\beta_{4a}$ ,  $\alpha_{1B}\alpha_2\delta\beta_{1b}$ ,  $\alpha_{1E}\alpha_2\delta\beta_{1b}$ , encoding respectively for the P-/Q-, N- and R-type channels [34-36]. Six fractions were found to be active on at least one of the channel sub-types, and the results are summarized in Table 1. At the highest dose tested, the last two polypeptides, Sf21 and Sf22, showed little selectivity, and are the only components found in our fractionation that act on the Q-type channels. Sf12 and Sf17 were the most selective blockers, acting specifically against the N-type channels. Finally, at the lowest dose used, Sf20 proved selective against the badly characterized R-type channels, and provides as such a new interesting molecular tool. In order to alleviate the possibility of cross-contamination of the fractions after reversed phase HPLC, we confirmed the purity of the pharmacologically active fractions by capillary electrophoresis (Fig. 2).

#### Primary structure determination of Segestria florentina polypeptides

The amino acid sequences of the isolated polypeptides, directly determined by Edman degradation, were consistent with the data provided by electrospray mass spectrometry and amino acid analysis (Fig. 3). The electrospray mass spectrometry yielded molecular weights for Sf12; Sf17; Sf18; Sf20; Sf21 and Sf22 of 4977.7; 4715.6; 4668.8; 5208.0; 5351.2 and 5385.3 Da, respectively. In each peptide the difference (8 A.M.U) between the calculated molecular mass and the measured molecular mass is indicative of the presence of four disulfide bridges. The C-terminal sequences of the polypeptides were investigated by hydrolysis with carboxypeptidases. The results indicate the presence of free carboxylic group at the C-terminal end of Sf12, Sf17, Sf18, Sf20 peptides (data not shown). The serine residue from the Sf21 and Sf22 polypeptides was not released after 1 h with the carboxypeptidase P and resisted equally two hours of carboxypeptidase A.

#### Synthesis and activity of Sf17 polypeptide

Of the six peptides characterized in the venom of Segestria florentina, the peptide Sf17 displayed the best combination of potency and selectivity towards the N-type Ca channel. In order to obtain larger quantities giving access to more detailed studies of its selectivity towards the various Ca channels and future structural studies, the peptide Sf17 was synthesized using the Boc strategy. The folding of the peptide was performed in the presence of a redox couple composed of reduced/oxidized glutathion (4mM/2mM) for 20 hours at 4°C. The oxidized peptide was purified by reversed-phase HPLC and its purity was verified by analytical HPLC, by amino acid analysis and electrospray mass spectrometry. The identity between the natural and synthetic product was further confirmed by their coelution in capillary electrophoresis (Fig. 4), confirming furthermore the carboxylic C-terminal structure of the latter. Both synthetic and natural polypeptide forms were tested on the N-type Ca channel as described previously, and produced a concentration dependent reduction of Ca flux in the  $\alpha_{1B}$  cell line (Table 2) with estimated IC50s of 4.1 µg/ml and 5.5 µg/ml respectively. Synthetic Sf17 was tested on three other subtypes of Ca channels : P-/Q-, R- and L- type, using HEK293 cells stably transfected with human VDCCs subunits :  $\alpha_{1A}\alpha_2\delta\beta_{4a}$ ,  $\alpha_{1E}\alpha_2\delta\beta_{1b}$  and  $\alpha_{1D}\alpha_2\delta\beta_{3a}$ . The pharmacology of the  $\alpha 1_{D}$  cell line corresponds to the L-type VDCC and is reported elsewhere [31]. There was no discernable effect on the cloned  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1E}$  and  $\alpha_{1D}$  cell lines at concentration up to 10 µg/ml. This was further confirmed by patch clamp electrophysiology. Both natural and synthetic Sf17 reduced the calcium current in the  $\alpha 1_B$  cell line (84+/- 4.4; n=3 and 57 +/- 4.2; n=3 respectively at 3  $\mu$ g/ml) (Fig. 5), but had no effect on the  $\alpha$ 1<sub>E</sub> current at 10  $\mu$ g/ml. These data confirm that the polypeptide antagonist Sf17 is a selective inhibitor of N-type VDCCs.

#### DISCUSSION

Whereas the venoms of snakes, scorpions and cone snails have attracted a large research effort leading to the discovery of numerous ion channel blockers, the venoms of spiders have only recently attracted attention, partially because of technical problems in collecting the venom. The only spider venom that has been extensively screened is the one of the American funnel web spider *Agelenopsis aperta*, yielding a series of  $\omega$ -agatoxins, that proved to be of high interest as selective blockers of the P-type Ca channels (for  $\omega$ -Aga IVA and IVB) [20, 22] and less selective blockers, for the L- and N-type Ca channels (for  $\omega$ -Aga IIIA, IIIB and IIIC) [25]. Very recently, a novel selective Ca channel antagonist peptide, SNX-325, has been isolated from the venom of the spider *Segestria florentina* [26]. It is a selective blocker of the N-type Ca channels at nanomolar concentrations, which is comparable to the blocking potency of the N-channel selective  $\omega$ -conopeptide,  $\omega$ -conotoxin GVIA, isolated from the cone snail *Conus geographus* venom [14, 37]. The importance of Ca channels in a large number of biological functions, and the ever growing number of cloned ion channels, have motivated us to further screen the venom of the *Segestria florentina* spider for new specific and potent Ca channel blockers.

The Segestria florentina spider venom was initially investigated on the basis of a molecular weight criterium, in order to isolate polypeptides within a typical mass range from 3.5 to 7 KDa, thereby discarding fractions corresponding to low molecular mass organic polyamine compounds and large biomolecules such as mucines and enzymes. The low molecular weight polypeptidic part was further fractionated by reversed-phase HPLC and six novel polypeptides, that block the induced Ca flux through three subtype of cloned Ca channels, were isolated and characterized. These polypeptides, distinctly different from the first peptide toxin SNX-325 isolated from the Segestria florentina venom, form a group of relatively hydrophobic polypeptides, ranging in size from 45 to 49 amino acid residues and containing eight cysteine residues that share the same positional arrangement in the sequence (Fig. 3). Between these polypeptides, the most closely related are Sf17, Sf18, Sf21 and Sf22 with sequence homologies above 80 % (Fig. 3). Sf21 and Sf22 differ by only one residue at position 41, with a leucine replaced by a phenylalanine residue. The fact that this slight difference enables their separation in reversed-phase HPLC suggest at least a partial surface exposure of this residue. Sf17 and Sf18, with only three mutations on a total of 45 residues,  $Asp^{16} / Asn^{16}$ , Met<sup>34</sup> / Ile<sup>34</sup> and Arg<sup>45</sup> / Gln<sup>45</sup>, can also be seen as isoforms of the same peptide. The major difference between both groups of peptides lies in the higher number of aromatic and hydrophobic residues for Sf21 and Sf22, and the presence of two acidic residues in the Nterminal region. Whereas for this first four polypeptides most of the charged residues are located in the N-terminal part of the sequence and a very high number of hydrophobic residues are clustered between the Cys VI and Cys VII in the C-terminal part, the charged and hydrophobic residues are more evenly spread throughout the sequence of Sf12. In this sense, the Sf12 ressembles more closely to SNX-325 polypeptide isolated from the same venom, which equally was more charged and more hydrophilic than the other members of the family. The loss in the Sf20 polypeptide of the Lys-Gly-Lys motif following the Cys II, together with the presence of two adjacent tryptophan residues between Cys II and Cys III and the cluster of basic residues His-Arg-Arg at the center of the sequence, further individualises this peptide. Despite these differences, the conservation of the cysteine patterns and the presence of a hydrophobic residue, leucine or isoleucine, after the Cys I, proline residue after the Cys VI, and three conserved glycine residues, suggest a similar spatial organization of all six sequences. The C-terminal structure determined as a free carboxylic group for Sf12, Sf17, Sf18 and Sf20 polypeptides, leading us to the hypothesis that an acidic C-terminus is another common characteristic of these polypeptides.

The remarkable chromatographic behaviour of the native and reduced *Segestria florentina* polypeptides, noted during the Sf17 polypeptide synthesis, suggests that the folded polypeptides are more hydrophobic than the equivalent linear polypeptides with reduced cysteine bonds, in contrast to the general case where hydrophobic residues are buried and hydrophilic residues exposed at the surface of the folded proteins. Others polypeptides such as  $\delta$ -Conotoxin GmVIA [38] and  $\delta$ -Conotoxin TxVIA [39, 40], isolated respectively from the venom of *Conus gloriamaris* and *Conus textile* and both acting on Na channels, have a similar behaviour. It was ascribed to the disulfide bonding framework forcing hydrophobic residues outward towards the solvent. Despite this anormalous physicochemical behaviour, no difficulties were encountered during the folding of the synthetic Sf17 polypeptide, suggesting that the formation of hydrophobic core is not necessary for the correct assembly of disulfide bonds.

The Segestria florentina polypeptides share the same cysteine pattern with the neuronal Ca channel blocking  $\omega$ -agatoxins isolated from Agelenopsis aperta venom, and with a variety of other bioactive peptides found in different spider venoms, such as  $\mu$ -agatoxins that specifically modify the sodium flux through Na channels [41], curtatoxins from Hololena curta venom, that are paralytic insectotoxins [42], or the Ntx 3-1 and Ntx 3-2 toxins from Phoneutria nigriventer venom active on the mammalian central nervous system [43]. Compared to the conotoxins, that equally block certain Ca channels, or to  $\omega$ -atracotoxin-HV1, an insecticidal peptide toxin isolated from the spider Hadronyche versuta [44], they can be equally aligned on the basis of the cysteine residues. This last alignment clearly shows the presence of an additional disulfide bridge formed by Cys VI and Cys VII in the first group of polypeptides. Despite a limited global sequence identity, the hydrophobic residue after the first cysteine residue appears as a common feature for almost all polypeptides, except for the  $\omega$ -conotoxin GVIA. Whereas no striking homology other than the cysteine pattern relates certain polypeptides with those of Segestria florentina, a similar Lys-Gly-Lys motif displayed as in Sf17, Sf18, Sf21, Sf22, can be found in the  $\omega$ -agatoxin sequences in the form of Arg-Gly-Arg, though at a different location in the

sequence. Still, the differential folding of both families of polypeptides might bring these groups in a similar three-dimensional environment

All toxins were assessed for their ability to inhibit the Ca flux through three different cloned human Ca channels,  $\alpha_{1A}\alpha_2\delta\beta_{4a}$ ,  $\alpha_{1B}\alpha_2\delta\beta_{1b}$  and  $\alpha_{1E}\alpha_2\delta\beta_{1b}$ , corresponding to pharmacological P-/Q-, N- and R-type neuronal Ca channels. Correlation of the potencies and specificities with their sequence gives some interesting informations about the structure-activity relationship. Despite their structural differences, Sf12 and Sf17 display the same selectivity towards N-type Ca channels, with a two fold higher potency for the latter, whereas, Sf18, the most closely related polypeptide to Sf17, with only three mutations (Asp<sup>16</sup>Asn, Met<sup>34</sup>Ile, Arg<sup>45</sup>Gln), loses a factor of two in blocking potency of N-type Ca channels, and is simultaneously less selective for the latter, as R-type channels are equally blocked at the highest dose of 10 µg/ml. As numerous studies of structure-activity relationships of animal toxins have already shown the importance of charged and especially basic residues for the receptor interaction [45], we can hypothesize that the C-terminal Arg side chain participates in the strength and selectivity of the interaction between Sf17 and the N-type Ca channel.

The Sf20 polypeptide inhibits both N- and R-type Ca channel at high concentrations. However, at lower concentrations only the R-type current is affected with a good potency. The R-type current is at this moment still relatively underdefined, partially because of lack of specific antagonists. The first selective peptide antagonist of the class E Ca channel names SNX-482, was only recently characterized in the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas* [27]. It was shown that SNX-482 potently blocks the R-type Ca current through a cloned and a native R-type current in rat secretory nerve endings, but has no effect on R-type current in several rat central neuron preparations, including the cultured cerebellar granule cells. Our Sf20 polypeptide is very different from the SNX-482 polypeptide, with sequence homology limited to its six disulfide bridged cysteines (Fig. 3). It therefore will be a useful tool to shed further light on the molecular nature of the R-type current. Sf21 and Sf22 polypeptides differ by only one amino acid residue and both display similar activities. They lack specificities and block the three subtypes of Ca channels at the higher doses used. Sf21 and Sf22 are effective blockers of the  $\alpha_{1E}$  encoded Ca current, but only at the highest concentration, when they lose their selectivity and Sf18 at the highest dose is twice as effective against the N-type Ca channels.

 $\omega$ -agatoxins IVA and IVB, isolated from the venom of Agelenopsis aperta, appear to be close neighbours to the Segestria florentina polypeptides, both in terms of sequence homology and shared biological activity. Both families are closely related in size, share four disulfide bonds and block neuronal Ca channels, with a high selectivity for the P-type current for the  $\omega$ agatoxins [20]. An additional ressemblance at the level of the primary structure is the similar distribution of the basic and hydrophobic residues over the sequence: we observe a dispersion of basic residues in the N-terminal half of the sequences, including the Lys-Gly-Lys motif in

Sf17, Sf18, Sf21 and Sf22 that can be compared to the Arg-Gly-Arg motif in the  $\omega$ -agatoxins, whereas the hydrophobic residues are primarly found in the C-terminal half. However, the location in the sequence of this hydrophobic fragment is very different in the two families: they form a long hydrophobic tail in the  $\omega$ -agatoxins, following the last cysteine residue, whereas they are clustered between the Cys VI and the Cys VII in the Segestria florentina polypeptides. This segment is crucial for the pharmacological activity of the  $\omega$ -agatoxin, as the C-terminal truncated polypeptide displays a drastic reduction of its activity on the P-type channel [46]. However, in the NMR structure of  $\omega$ -agatoxin IVA, the C-terminal hydrophobic segment was shown to adopt a disordered conformation in aqueous solution (Fig. 6, a). It therefore seems a reasonable hypothesis that the fragment binds through an induced fit mechanism, adopting a well-defined conformation upon interaction with it receptor. In the Segestria florentina polypeptides, the hydrophobic segment, isolated from the two central strands by the disulfide bond between Cys VI and Cys VII, is predicted with a high degree of certainty to adopt a helix conformation [47] (Fig. 6, b). Because this evidently relies on the hypothesis that the overall architecture is conserved between the agatoxins IV A/B and the here described family of Ca channel antagonists, we have started a detailed structural study by NMR on Sf17 and Sf20. The resulting structures of the Segestria florentina polypeptides might well complete the picture of the antagonist interaction with Ca channels, and help to explain their intriguing selectivity towards the different subtypes.

## ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr M. Kouach for electrospray mass spectrometry analyses and Dr. B. Small for supportive electrophysiological studies.

#### REFERENCES

- 1. Tsien, R.W., Lipscombe, D., Madison, D.V., Bley, K.R. and Fox, A.P. (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* 11, 431-438
- 2. Tsien, R.W., Ellinor, P.T. and Horne, W.A. (1991) Molecular diversity of voltagedependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Pharmacol Sci* 12, 349-354
- 3. Miller, R.J. (1992) Voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels. J Biol Chem 267, 1403-1406
- 4. Varadi, G., Mori, Y., Mikala, G. and Schwartz, A. (1995) Molecular determinants of Ca<sup>2+</sup> channel function and drug action. *Trends Pharmacol Sci* **16**, 43-49
- Zhang, J.F., Randall, A.D., Ellinor, P.T., Horne, W.A., Sather, W.A., Tanabe, T., Schwarz, T.L. and Tsien, R.W. (1993) Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32, 1075-1088
- Mori, Y., Mikala, G., Varadi, G., Kobayashi, T., Koch, S., Wakamori, M. and Schwartz, A. (1996) Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels. *Jpn J Pharmacol* 72, 83-109
- 7. Carbone, E. and Lux, H.D. (1984) A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* **310**, 501-502
- 8. Catterall, W.A. and Striessnig, J. (1992) Receptor sites for Ca2+ channel antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 13, 256-262
- 9. Cruz, L.J. and Olivera, B.M. (1986) Calcium channel antagonists. Omega-conotoxin defines a new high affinity site. *J Biol Chem* 261, 6230-6233
- 10. Olivera, B.M., Miljanich, G.P., Ramachandran, J. and Adams, M.E. (1994) Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem* **63**, 823-8267
- 11.Gray, W.R., Olivera, B.M. and Cruz, L.J. (1988) Peptide toxins from venomous Conus snails. Annu Rev Biochem 57, 665-700
- Olivera, B.M., Rivier, J., Clark, C., Ramilo, C.A., Corpuz, G.P., Abogadie, F.C., Mena, E.E., Woodward, S.R., Hillyard, D.R. and Cruz, L.J. (1990) Diversity of Conus neuropeptides. *Science* 249, 257-63
- 13.Olivera, B.M., Cruz, L.J., de Santos, V., LeCheminant, G.W., Griffin, D., Zeikus, R., McIntosh, J.M., Galyean, R., Varga, J., Gray, W.R., and Rivier, J. (1987) Neuronal calcium channel antagonists. Discrimination between calcium channel subtypes using omegaconotoxin from Conus magus venom. *Biochemistry* 26, 2086-2090
- 14. Hirning, L.D., Fox, A.P., McCleskey, E.W., Olivera, B.M., Thayer, S.A., Miller, R.J. and Tsien, R.W. (1988) Dominant role of N-type Ca<sup>2+</sup> channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science* 239, 57-61

- 15. McIntosh, M., Cruz, L.J., Hunkapiller, M.W., Gray, W.R. and Olivera, B.M. (1982) Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail Conus magus. Arch Biochem Biophys 218, 329-334
- 16.Hillyard, D.R., Monje, V.D., Mintz, I.M., Bean, B.P., Nadasdi, L., Ramachandran, J., Miljanich, G., Azimi-Zoonooz, A., McIntosh, J.M., Cruz, L.J., Imperial, J.S. and Olivera, B.M. (1992) A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 9, 69-77
- 17. Ramilo, C.A., Zafaralla, G.C., Nadasdi, L., Hammerland, L.G., Yoshikami, D., Gray, W.R., Kristipati, R., Ramachandran, J., Miljanich, G., Olivera, B.M. and Cruz, L. J. (1992) Novel alpha- and omega-conotoxins from Conus striatus venom. *Biochemistry* 31, 9919-9926
- 18. Sather, W.A., Tanabe, T., Zhang, J.F., Mori, Y., Adams, M.E. and Tsien, R.W. (1993) Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel alpha 1 subunits. *Neuron* **11**, 291-303
- 19. Mintz, I.M., Adams, M.E. and Bean, B.P. (1992) P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 9, 85-95
- 20. Mintz, I.M., Venema, V.J., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Bean, B.P. and Adams, M.E. (1992) P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Nature* **355**, 827-829
- 21. Adams, M.E., Mintz, I.M., Reily, M.D., Thanabal, V. and Bean, B.P. (1993) Structure and properties of omega-agatoxin IVB, a new antagonist of P-type calcium channels*Mol Pharmacol* 44, 681-8
- 22. Teramoto, T., Kuwada, M., Niidome, T., Sawada, K., Nishizawa, Y. and Katayama, K. (1993) A novel peptide from funnel web spider venom, omega-Aga-TK, selectively blocks, P-type calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun* **196**, 134-140
- 23. Mintz, I.M., Venema, V.J., Adams, M.E. and Bean, B.P. (1991) Inhibition of N and L-type Ca<sup>2+</sup> channels by the spider venom toxin omega-Aga-IIIA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6628-6631
- 24. Venema, V.J., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Hathaway, G.M. and Adams, M.E. (1992) Antagonism of synaptosomal calcium channels by subtypes of omega-agatoxins. *J Biol Chem* 267, 2610-2615
- 25. Ertel, E.A., Warren, V.A., Adams, M.E., Griffin, P.R., Cohen, C.J. and Smith, M.M. (1994) Type III omega-agatoxins: a family of probes for similar binding sites on L- and N-type calcium channels. *Biochemistry* **33**, 5098-5108
- 26.Newcomb, R., Palma, A., Fox, J., Gaur, S., Lau, K., Chung, D., Cong, R., Bell, J.R., Horne, B., Nadasdi, L., and Ramachandran, J. (1995) SNX-325, a novel calcium antagonist from the spider Segestria florentina. Biochemistry 34, 8341-8347
- 27. Newcomb, R., Szoke, B., Palma, A., Wang, G., Chen, X., Hopkins, W., Cong, R., Miller, J., Urge, L., Tarczy-Hornoch, K., Loo, J.A., Dooley, D.J., Nadasdi, L., Tsien,

R.W., Lemos, J. and Miljanich, G. (1998) Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula Hysterocrates gigas. *Biochemistry* 37, 15353-15362

- 28. Tam, J.P., Heath, W.F. and Merrifield, R.B. (1983) SN 1 and SN 2 mechanisms for the deprotection of synthetic peptides by hydrogen fluoride. Studies to minimize the tyrosine alkylation side reaction. *Int J Pept Protein Res* **21**, 57-65
- 29. Chang, J.Y., (1994) Biochem J 300, 643-50
- 30. Williams, M.E., Brust, P.F., Feldman, D.H., Patthi, S., Simerson, S., Maroufi, A., McCue, A.F., Velicelebi, G., Ellis, S.B. and Harpold, M.M. (1992) Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calciumchannel. *Science* 257, 389-395
- 31. Boot, J. R., O'Brien, A. and Tran, S. (1997) Brit. J. Pharmacol. 122, 89.
- 32. Pinto, A., Gillard, S., Moss, F., Whyte, K., Brust, P., Williams, M., Stauderman, K., Harpold, M., Lang, B., Newsom-Davis, J., Bleakman, D., Lodge, D. and Boot, J. (1998) Human autoantibodies specific for the alpha1A calcium channel subunit reduce both P-type and Q-type calcium currents in cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8328-33
- 33. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85-100
- 34. Williams, M.E., Feldman, D.H., McCue, A.F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S.B. and Harpold, M.M. (1992) Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* **8**, 71-84
- 35. Williams, M.E., Marubio, L.M., Deal, C.R., Hans, M., Brust, P.F., Philipson, L.H., Miller, R.J., Johnson, E.C., Harpold, M.M. and Ellis, S.B. (1994) Structure and functional characterization of neuronal alpha 1E calcium channel subtypes. J Biol Chem 269, 22347-22357
- 36.Zahl, N., Simerson, S., Deal, C., Williams, M., Hans, M., Prodanovich, P., McCue, A., Sionit, P., Velicelebi, G., Brust, P., Johnson, E., Harpold, M. and Ellis, S. (1994) Soc. for Neuroscience abstracts 20, 11
- 37.Olivera, B.M., McIntosh, J.M., Cruz, L.J., Luque, F.A. and Gray, W.R. (1984)
  Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from Conus geographus venom. Biochemistry 23, 5087-5090
- 38. Shon, K.J., Hasson, A., Spira, M.E., Cruz, L.J., Gray, W.R. and Olivera, B.M. (1994) Delta-conotoxin GmVIA, a novel peptide from the venom of Conus gloriamaris. *Biochemistry* 33, 11420-11425
- 39. Hillyard, D.R., Olivera, B.M., Woodward, S., Corpuz, G.P., Gray, W.R. and Ramilo, C.A. (1989) A molluscivorous Conus toxin: conserved frameworks in conotoxins. *Cruz LJ Biochemistry* 28, 358-61

- 40. Fainzilber, M., Kofman, O., Zlotkin, E. and Gordon, D. (1994) A new neurotoxin receptor site on sodium channels is identified by a conotoxin that affects sodium channel inactivation in molluscs and acts as an antagonist in rat brain. *J. Biol. Chem.* **269**, 2574-80
- 41.Skinner, W.S., Adams, M.E., Quistad, G.B., Kataoka, H., Cesarin, B.J., Enderlin, F.E. and Schooley, D.A. (1989) Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, Agelenopsis aperta. *J Biol Chem* **264**, 2150-2155
- 42. Stapleton, A., Blankenship, D.T., Ackermann, B.L., Chen, T.M., Gorder, G.W., Manley, G.D., Palfreyman, M.G., Coutant, J.E. and Cardin, A.D. (1990) Curtatoxins. Neurotoxic insecticidal polypeptides isolated from the funnel-web spider Hololena curta. *J Biol Chem* 265, 2054-2059
- 43. Cordeiro, M. do N., de Figueiredo, S.G., Valentim, A. do C., Diniz, C.R., von Eickstedt, V.R., Gilroy, J. and Richardson, M. (1993) Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider Phoneutria nigriventer (Keys). *Toxicon* **31**, 35-42
- 44. Atkinson, R. K., Howden, M.E.H., Tyler, M. I. and Vonarx, E.J. (1993) Insecticidal toxins derived from funnel web (Atrax or Hadronyche) spiders. *International Patent Application* ID 34443/93.
- 45.Loret, E.P., del Valle, R.M., Mansuelle, P., Sampieri, F. and Rochat, H. (1994) Positively charged amino acid residues located similarly in sea anemone and scorpion toxins. *J Biol Chem* **269**, 16785-16788
- 46.Kim, J.I., Konishi, S., Iwai, H., Kohno, T., Gouda, H., Shimada, I., Sato, K., and Arata, Y. (1995) Three-dimensional solution structure of the calcium channel antagonist omega-agatoxin IVA: consensus molecular folding of calcium channel blockers. *J Mol Biol* 250, 659-671
- 47.Rost, B. and Sander, C. (1993) Improved prediction of protein secondary structure by use of sequence profiles and neural networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7558-62

FIG. 1 : Preparative reversed-phase HPLC chromatogram of the peptidic fraction from Segestria florentina spider venom. The peptidic fraction obtained after the gel filtration of the crude venom (66 mg) was fractionated on a C18 Nucleosil column (10 x 500 mm; 5  $\mu$ m; 300 Å), using a linear gradient of acetonitrile/water (0.42%/min) in constant 0.045% TFA. The column was kept at 50°C. Polypeptides antagonist of neuronal Ca channels, Sf12, Sf17, Sf18, Sf20, Sf21, Sf22 are indicated by horizontal bars.

FIG. 2 : *Capillary electrophoretic profile of the six Ca channel polypeptide antagonists obtained by reversed-phase HPLC*. The electrophoretic migration was carried out in 20 mM sodium citrate buffer pH 2.5 at 30 kV and 30°C for 10 min. (a) Sf12, (b) Sf17, (c) Sf18, (d) Sf20, (e) Sf21, (f) Sf22 polypeptides

FIG. 3 : Amino acid sequences of Sf12, Sf17, Sf18, Sf20, Sf21, Sf22 Segestria florentina polypeptides and comparaison with several other peptides isolated from different venoms. SNX-325, N-type Ca channel blocker isolated from the Segestria florentina spider venom [26],  $\omega$ -agatoxins IVA and IVB from Agelenopsis aperta venom, that block P-type Ca channels [20], SNX-482 from the Tarantula Hysterocrates gigas [27],  $\omega$ -ACTx-HV1 ( $\omega$ -atracotoxin-HV1) insecticidal peptide toxin isolated from Hadronyche versuta venom [46], and  $\omega$ -CTx GVIA ( $\omega$ -conotoxin GVIA) from Conus geographus venom and specific antagonist of N-type Ca channels [13, 14]. Strict identity between the six polypeptides is shaded in dark, homology between Sf21 and Sf22 is indicated by light boxes.

FIG. 4 : *Analytical reversed-phase HPLC profile* of (a) the native Sf17 polypeptide, (b) the synthetic Sf17 polypeptide, (c) the coelution of the native with the synthetic Sf17 polypeptide.

Fig. 5 : Sf17 blocks  $Ca^{2+}$  currents through  $\alpha 1_B$  encoded channels. HEK-293 cells stably expressing the human  $\alpha 1_B$  subunit were patch clamped as described in Methods. Cells were hold at a V<sub>h</sub> of -100 mV and depolarizing steps were delivered every 30 sec to avoid current rundown. The extracellular solution contained 5 mM  $Ca^{2+}$ . After a stable recording was obtained (control) natural Sf17 (nSf17) was perfused at a concentration of 3 µg/ml until stable block was achieved.

FIG. 6 : (a) Three-Dimensional structure of  $\omega$ -aga IVA. The hydrophobic stretch in the C-terminus of  $\omega$ -aga IVA is found in the loop between Cys VI and Cys VII in *Segestria florentina* polypeptides, and is predicted to be in an a helical conformation. (b) Secondary structure prediction of Sf<sub>17</sub> polypeptide.





FIGURE 2

3	7
Ĕ	]
Ë	)
Ç	2
Ĺ	-

,

5617	C.		].	ŇŤ	v	ŕ	. 6	1		* *		1	8	n		f.	ļ	<u> </u>	].		NT			]		l	8				6	Ъ	<b>.</b>			X	Į,		2	۰Į	7	.[	]_										
5117	N U		1	14	r.				Ч	r (	) ^	. IVI	3	υ.	- 1	<u> </u>	- 1	C (	-   ]	9	1N		-  `	'n	Ľ	-	•	A	<u>[]</u> -	. L	. 0	r		A N	4 1	Y	L, I	VI P	L U	1	υp	ր	1										
Sf18	GK	C	L	N	ĸ.	_ G	B	v	С	ĸĊ	) K	. M	Ŝ	N .	_ P	-	-	С	S	G	N		_  C	H	C	-	8	A	P _	Į	8	Р	i ,	4 1	1	Q	LI	MA	G	Y	C	i  C	Q	2									
Sf21	EDK	c  c	L	ĸ	N.	_ 6	B	v	С	K (	; K	F	S	E.	_ P	-		С	S	G	Q	Υ_	_  c	H	C	D	S		<b>P</b>	L	. S	1	ł,	<b>a</b> 1	F	Q	L	À L	G	Y	ск	(c	H	Т	S								
Sf22	EDK	c	L	ĸ	N.	_ 6	; E	۷	С	ĸċ	; K	F	<b>S</b>	E .	_ P	<u> </u>	-	с	: s	G	Q	Υ_	_  c	H	С	D	S	-	P _	Ĺ	. <b>S</b>	I	ì,	A I	F	Q	L,	A F	G	Y	CK	:  c	н	Ť	Ŝ								
SF20	GD	c	I	P	К.	G	; E	s	С	_ (	L	v	w	w	G P	_	-	С	: T	G	H	RI	2 0	D	c	Р	D	- -	P (	2 1	S	F	vo	ι ς	. ү	N	A	E A	G	N	Ск		:h										
Sf12	RE	c	L	A	DI	ΕT	E	_	С	_ (	<b>)</b>	I	N	H	NK	ζ_	_	С		G	S		_  c	L	С	Р	N	G	P F	łL	, R	Р	мι	D N	11	~	L.		G	ĸ	c		G	P	к	Р							
SNX-325	GS	c	I	E :	s_	_ G	K	S	С	τŀ	I S	R	S	M	KΝ	G	L	со	;   P	к	s	R_	_  c	N	c	R	Q	1 (	QE	I R	н	D	ΥI	. 0	; к	R	к	y s	_	_			s										
ω–aga IVA	ккк		1	A	кι	DΥ	' G	R	c	кv	V G	G	т	P .		_	_	с	R	G	R	G_	_  c	: IT	C	s	1	м	GΤ	[ N	ı _	·			_	-			_	_	C E		ĸ	P	R	L	I	MB	E G	L	GI	LA	
ω–aga IVB	EDN	ı c	1	A	ΕI	ΟY	G	к	c	ту	V G	G	T	К.			_	со	R	G	R	Ρ.	.  c	R	C	s	М	1 (	бŢ	n N	ı _	_			_	-			_	_[	CE	c	т	P	R	L	I	M F	EG	L	S I	FA	
SNX-482	GVDKAG	c	R	Y	M	FG	G	• _ :	с	s١	/ N	D	D				_	c	ᆡ티	R	L	G.	_ c	н	s	L	F	s	Υ_			_				_						_ c	A	N	D /	L	T	FS	s D	)			
ω-ACTx HV1	SPT	c	1	P	s o	зÇ	) P	_	С	ΡY	'N	E	N			_	-	со	:  s	Q	S		_  c	: T	F	к	Ε	NI	ΕN	1 G	i N	т	vı	ĸĸ	R	_			_			c	D	,									
								i																																													
ωCTx GVIA		c	ĸ	S I	x	3 S	S	-	c	s >	Т	s	Y	N .		_		<u>c</u> (		S	-			N	x	Y	т	к	R _			-			_	-			-			C	Y										

65







66



FIGURE 6 b

AA GKCLNKGEVCKGKMSDPCCSGNCHCSAPLSPIAMIQLMAGYCNCR PHD sec EE HHHHHHHHH Rel sec 971698841023779766367742357877587999998257799

FIGURE 6 a

-

## 2. 3. 2. Détermination des ponts disulfure de la famille des toxines de *Segestria florentina*.

#### 2. 3. 2. 1. Introduction.

Les toxines animales font partie de la classe des petites protéines à multiple ponts disulfure qui compte également : les défensines d'insectes et les inhibiteurs de protéases (Pallaghy et al., 1994; Harrison et Sternberg, 1996). Généralement, les toxines animales contiennent 3 à 4 ponts disulfure pour un nombre d'acides aminés compris entre 30 et 70. Les ponts disulfure de ces polypeptides jouent un rôle central à la fois dans l'établissement et dans le maintien de la structure tridimensionnelle des toxines (Thornton, 1981; Creighton, 1988). De ce fait, l'activité de ces petites protéines dépend fortement de l'arrangement correct des ponts disulfure. La connaissance de l'appariement des ponts disulfure dans une protéine est donc essentielle pour relier significativement la structure et la fonction.

Le nombre de ponts disulfure possible augmente exponentiellement avec le nombre de résidus de cystéines engagées (Anfinsen et Scheraga, 1975). A titre d'exemple, trois ponts disulfure peuvent donner 15 arrangements différents (Chung et al., 1995). Afin de déterminer l'arrangement des ponts disulfure d'une protéine, plusieurs méthodes peuvent être utilisées (Smith et Zhou, 1990). La "méthode enzymatique" consiste à cliver spécifiquement la protéine native à l'aide de protéases, dans le but d'obtenir des fragments peptidiques ne contenant qu'un pont disulfure isolé. Ces fragments peptidiques sont ensuite analysés par les techniques de microséquençage et de spectrométrie de masse, afin de déterminer la position des deux cystéines connectées. Il existe également une "méthode chimique", qui consiste à réduire sélectivement les ponts disulfure à l'aide de phosphines trivalentes (Gray, 1993). Les phosphines trivalentes offrent l'avantage de travailler à pH acide, limitant ainsi les échanges de surviennent dans des conditions alcalines. ponts disulfure qui La Tris(2carboxyéthyl)phosphine (TCEP) est particulièrement utilisée à pH 2-3. Les intermédiaires obtenus sont rapidement alkylés et soumis au séquençage. Enfin, les données de RMN peuvent également apporter des informations très importantes sur l'agencement des ponts disulfure. En effet, selon Klaus et al., l'observation de contacts H $\beta$ -H $\beta$  ou H $\beta$ -H $\alpha$ , est significative de la présence d'un pont disulfure entre deux cystéines (Klaus et al., 1993).

Dans le soucis de déterminer l'agencement des ponts disulfure des toxines de la famille de *Segestria florentina*, la méthode par coupure enzymatique et la méthode de Gray ont été testées. Des informations obtenues par RMN ont permis de conclure sur l'agencement des ponts disulfure.

#### 2. 3. 2. 2. Résultats

#### a. Méthode de Gray

#### Matériel et méthodes

Deux solutions réductrices de TCEP, de 10 et de 20 mM, ont été préparées extemporairement dans de l'acide citrique à 0,17 M. Une gamme de pH de 2 à 5, a été réalisée avec une solution de NaOH 1 M. Parallèlement, une solution de protéine à 1 mg/ml a été préparée.

Pour chaque essai,  $100 \ \mu$ l de la solution de protéine ont été dilués dans 1 ml de solution de TCEP. Des aliquots ont été prélevés à des temps itératifs et injectés sur une colonne C18 Nucleosil (4,6 x 250 mmm). La température de la colonne était maintenue à 50°C avec un débit de 1 ml/min. Un gradient d'acétonitrile approprié a été utilisé pour chaque protéine, afin de permettre la séparation des différents intermédiaires.

#### <u>Résultats</u>

Le traitement des protéines par la la TCEP, dans différentes conditions de pH (2 à 4) et de température (4°C, 20°C, 40°C), n'ont pas permis d'attribuer les différents ponts disulfure. En effet, seul la toxine totalement réduite, ou un mélange de toxine native et totalement réduite, ont été obtenus. Ceci montre, que la réduction du premier pont disulfure provoque très facilement la réduction des trois autres ponts restants (Figure 5). Quelque soit la toxine soumise à la méthode de Gray, les mêmes résultats ont été obtenus.



Figure 5. HPLC analytique de la toxine Sf18 (a) avant réduction à la TCEP (20 mM), (b) après 5 min de réduction à la TCEP, (c) après 15 min de réduction à la TCEP. Colonne C18 Nucleosil (4,6 x 250 mm), gradient 36 à 56 % d'acétonitrile en 60 min, débit 1ml/min, 50°C.
### b. Méthode enzymatique

### Matériels et méthodes

La pepsine (E.C.3.4.23.1) et la thermolysine (E.C.3.4.24.4), ont été obtenues par Boehringer Mannheim. La trypsine (E.C.3.4.24.4), traitée par la TPCK (tosylphenylalanylchloromethane) et la chymotrypsine (E.C.3.4.21.1), traitée avec la TLCK (tosyllysylchloromethane), ont été obtenues par Sigma.

20 nmoles de toxine ont été digérées par la pepsine avec un rapport enzyme/substrat de 1/10 (poids/poids), dans 5 % d'acide formique, à 37°C pendant 15 heures. Le produit de la digestion pepsique a ensuite été évaporé et directement digéré par un mélange contenant la trypsine, la chymotrypsine et la thermolysine. Ces enzymes ont été utilisées avec un rapport enzyme/substrat de 1/10 (poids/poids). La digestion a été menée dans un tampon de bicarbonate d'ammonium 0,2 M, à pH 7,8, pendant 15 heures.

Les fragments peptidiques obtenus ont été séparés par HPLC en phase inverse sur une colonne narrowbore C18 Vydac 201HS (2,1 mm x 150). Un gradient de 0 à 40 % de B en 90 min a été utilisé. Le débit était de 150  $\mu$ l/min et la température de la colonne a été maintenue à 50°C.

### <u>Résultats</u>

Le nombre de sites de clivage possible étant faible dans les séquences de toxines de Segestria florentina, un cocktail de trois enzymes (trypsine, chymotrypsine et thermolysine), a dans un premier temps été utilisé. Malgré ces conditions drastiques, de faibles rendements de clivage ont été obtenus, empêchant la détermination des ponts disulfure.

Dans un deuxième temps, la pepsine a été utilisée. Cette enzyme est connue pour cliver à pH acide, les séquences peptidiques de part et d'autre des résidus de leucine et des résidus aromatiques, tel que phénylalanine. Après coupure par la pepsine, seul le fragment peptidique 34-41 (-IAIFQLAL-) de la toxine Sf21, a pu être libéré. En espérant avoir rendu plus accessible les sites de clivage pour d'autres enzymes, l'idée a donc été de poursuivre la digestion à partir de l'hydrolysat pepsique avec : la trypsine, la thermolyine et la chymotrypsine. Dans ces conditions, deux fragments majeurs, de 2055,7 Da et de 1888,14 Da, ont été obtenus (Figure 6). Ces polypeptides ont été analysés par microséquençage.

Dans les deux cas, deux possibiltés d'appariement subsistent puisque chacun des fragments possède 4 cystéines (Figure 6).



Figure 6. Fragments peptidiques obtenus après coupure par la pepsine, la trypsine, la thermolysine et la chymotrypsine de la toxine Sf21. Les peptides obtenus ont été séparés par chromatographie en phase inverse, sur une colonne C18 Vydac 201HS (2,1 x 150 mm) avec un gradient de 0 à 40 % d'acétonitrile en 90 min et un débit de 150  $\mu$ l/min.

Les informations obtenues par coupure enzymatique, ont été corrélées avec les données obtenues par RMN pour le peptide Sf17. Les résultats de RMN indiquent la présence d'un pont entre les cystéines I et IV et un pont entre les cystéines VI et VII. D'autre part, les deux toxines appartenant à une même famille de toxine, celles-ci sont susceptibles de posséder le même appariement des ponts disulfure.

Ceci nous amène à proposer l'arrangement de ponts disulfure pour la toxine Sf21 présenté dans la figure 7.



Figure 7. Agencement des ponts disulfure de la toxine Sf21.

#### 2. 3. 2. 3. Conclusion.

Le manque de sites de clivage spécifiques et l'impossibilité d'obtenir des intermédiaires partiellement réduits, ont rendu difficile la détermination des ponts disulfure de la famille des toxines de *Segestria florentina*. La présence de cystéines adjacentes et de cystéines séparées par un seul résidu d'acide aminé a contribué à rendre plus difficile cette détermination. Les mêmes

difficultés dans la détermination des ponts disulfure de l' $\omega$ -Aga IVA et B ont été rencontrées. Ces toxines contiennent une distribution similaire des cystéines dans la séquence avec deux cystéines adjacentes et des cystéines séparées par un seul résidu (Adams et al., 1993).

Finalement, la position des ponts disulfure a été obtenue par corrélation des résultats obtenus par RMN et par des coupures enzymatiques. Le schéma de distribution des cystéines dans les séquences des toxines de *Segestria florentina* est similaire à celui d'autres toxines isolées de venins d'araignées et en particulier de la toxine SNX-325 isolée du même venin (Newcomb et al., 1995). Dans ce groupe de toxines, les cystéines III et IV sont adjacentes et un seul résidu sépare les cystéines V et VI, et VII et VIII.

D'autre part, l'arrangement des ponts disulfure est également semblable à celui des  $\omega$ conotoxines qui ne possèdent que trois ponts disulfure. Le quatrième pont absent dans les  $\omega$ conotoxines, relie les cystéines VI et VII dans les toxines d'araignées (Chung et al., 1995).

Bien qu'aucun pont disulfure n'ait pu être déterminé par la méthode de Gray, il est toutefois intéressant de noter le comportement chromatographique original des toxines de *Segestria florentina*. En effet, toutes les toxines possèdent un temps de rétention plus faible lorsqu'elles sont totalement réduites que lorsqu'elles sont repliées (Figure 5). Ceci indique, que ces toxines sont plus hydrophobes dans leur forme native et que les résidus hydrophobes s'exposent à la surface des toxines. Cette observation est en accord avec celle faite sur les deux isoformes Sf21 et Sf22. En effet, malgré une seule différence dans leur séquence, ces deux toxines sont séparées par RP-HPLC. Dans ces deux isoformes, une leucine est remplacée par une phénylalanine. Il est donc concevable, que pour ces toxines certains résidus hydrophobes exposés à la surface de la toxine, soient essentiels pour l'activité biologique.

# 2. 3. 3. Compléments d'information sur l'activité des toxines de Segestria florentina.

#### 2. 3. 3. 1. Introduction.

L'existence d'un nouveau sous-type de canal calcique a récemment été mis en évidence grâce à une toxine issue de l'éponge de mer *Cliona vastifica* (Morel et al., 1997) (Partie I, chapitre 3). Cette toxine nommée mapacalcine, est en effet capable d'inhiber spécifiquement un canal calcique voltage-dépendant insensible à tous les antagonistes organiques et peptidiques connus à ce jour à savoir : les dihydropyridines, l'w-Ctx GVIA, l'w-Ctx MVIIC et l'w-Aga IVA/B. De façon similaire au canaux calciques sensibles à la mapacalcine, les canaux calciques de type R- sont insensibles à tous les antagonistes calciques connus (Randall et Tsien, 1995; Bourinet et al., 1996; Tottene et al., 1996; Nooney et al., 1997). De ce fait, les propriétés biophysiques des canaux de type R- ont été comparées à celles des canaux sensibles à la mapacalcine (Morel et al., 1997). Cependant, il semble que les caractéristiques biophysiques de ce canal soient assez différentes de celle du canal calcique sensible à la mapacalcine. Pour le moment, le canal de type R- reste encore mal défini. D'autre part, peu d'informations sur le canal sensible à la mapacalcine sont disponibles.

Une toxine isolée du venin *Segestria florentina*, nous donne ainsi l'occasion d'apporter une contribution à l'avancée des recherches sur ces canaux calciques. En effet, la toxine Sf20 possède une bonne potentialité à inhiber les canaux calciques de type R-, exprimés par le gène  $\alpha$ 1E. L'idée a donc été de déterminer par un test simple de compétition, si la toxine Sf20 était capable de déplacer la mapacalcine de son récepteur de haute affinité sur les membranes de cerveau de rats (Kd = 0,8 nM). Dans un deuxième temps nous avons chercher à savoir si la toxine la plus sélective des toxines de *Segestria florentina*, Sf17, était également capable de déplacer la mapacalcine.

# 2. 3. 3. 2. Résultats et discussion

Pour chaque toxine le test de compétition à été réalisé avec 0,01 nM de [<sup>125</sup>I]mapacalcine et 1  $\mu$ M de toxine, en prenant comme témoin la mapacalcine (1  $\mu$ M). Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4. Résultats obtenus après compétition entre 0,01 nM de [<sup>125</sup>I]-mapacalcine et 1 µM de toxine. Les résultats sont exprimés en nombre de coups par minute (cpm).

	Quantité de radioactivité retenue par le filtre (cpm)
<sup>125</sup> I mapacalcine (0,01 nM)	4994,7
+ membranes	
<sup>125</sup> I mapacalcine (0,01 nM) + mapacalcine (1 $\mu$ M)	1347,9
+ membranes	
<sup>125</sup> I mapacalcine (0,01 nM) + Sf17 (1 $\mu$ M)	5356,9
+ membranes	
<sup>125</sup> I mapacalcine (0,01 nM) + Sf20 (1 $\mu$ M)	5290,2
+ membranes	

Le pourcentage de liaison spécifique de la mapacalcine sur ces membranes de cerveau de rats a été déterminé, et est de 73 %. Ce pourcentage a été obtenu en soustrayant la liaison non spécifique, de la liaison totale.

Les résultats obtenus montrent qu'à 1  $\mu$ M, les toxines Sf17 et Sf20 ne sont pas capables de déplacer la [<sup>125</sup>I]-mapacalcine (0,01 nM) de son récepteur, alors que la mapacalcine naturelle est capable de la déplacer. En effet, après compétition avec la mapacalcine à 1  $\mu$ M, la quantité de cpm sur le filtre chute de 4994,7 à 1347,9. Ceci indique, que la mapacalcine déplace la [<sup>125</sup>I]-mapacalcine. Avec les toxines Sf17 et Sf20 (1  $\mu$ M), la quantité de cpm sur les filtres ne chute pas, et est respectivement de 5356,9 et 5290,2. Ceci montre, que les deux toxines de *Segestria florentina* ne déplacent pas le [<sup>125</sup>I]-mapacalcine.

## Conclusion

Les toxines Sf17 et Sf20 ne déplacent pas la mapacalcine de son récepteur, sur les membranes de cerveaux de rats. Ces résultats nous amènent à proposer deux hypothèses:

Soit la mapacalcine possède le même site d'interaction avec les canaux calciques, que les toxines de *Segetria florentina*. Dans ce cas, le canal calcique inhibé par la mapacalcine n'est pas un canal calcique de type R-, exprimé par le gène  $\alpha 1E$  et d'autre part, ce test apporte une confirmation sur la sélectivité de Sf17 pour les canaux de type N-.

Soit la mapacalcine ne possède pas le même site d'interaction. Dans ce cas, il n'est pas à exclure que ces toxines puissent avoir un effet sur les canaux calciques sensibles à la mapacalcine. Pour répondre à cette question, il est nécessaire de tester l'effet physiologique de ces toxines sur les courants calciques mapacalcine-sensibles.

### 2. 3. 3. 3. Partie expérimentale

Les tests de compétition ont été menés dans un volume final de 1 ml, dans un tampon standard (mM) contenant: 50 Tris/HCl à pH 7,4, 130 NaCl, 5,6 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 0,24 MgCl<sub>2</sub>, 11 glucose et 0,2 % d'albumine bovine.

Des aliquots de membranes de cerveau de rats ont été incubés pendant 120 min à 4°C avec 0,01 nM de mapacalcine marquée à l'iode 125. Parallèlement, des aliquots de membranes ont été incubés en même temps, avec 0,01 nM de [<sup>125</sup>I]-mapacalcine et 0,1  $\mu$ M de mapacalcine ou de toxine.

Après incubation 450  $\mu$ l de chaque solution ont été filtrées sur des filtres de fibre de verre (GF/C de 25 mm de diamètre préincubés dans du tampon Tris/HCl 10 mM à pH 7,4 contenant 0,5% de PEI). Les filtres ont été lavés par 2 x 5 ml de tampon de lavage (Tris/HCl 10 mM à pH 7,4). La radioactivité retenue par les filtres a été comptée par un compteur de rayons gamma (Packard).

# 2. 3. 4. Structure tridimensionnelle d'une toxine du venin de Segestria florentina.

# 2. 3. 4. 1. Introduction

L'accessibilité à la structure tridimensionnelle a été d'un grand secours pour comprendre les mécanismes d'action des toxines animales (Goldstein et al., 1994; Stampe et al., 1994). Les données obtenues sur la forme de la toxine, la distribution des charges ou de l'hydrophobicité ainsi que l'accessibilité des résidus au solvant, sont à l'origine des avancées dans ce domaine (Giangiacomo et al., 1992; Park et Miller., 1992; Goldstein et Miller., 1993; Goldstein et al., 1994; Ellinor et al., 1994; Pallaghy et al., 1999).

Aujourd'hui, Les structures tridimensionnelles d'un certain nombre de toxines animales de différentes espèces ont été résolues, soit par RMN, soit par radiocristallographie. De même, les structures d'un certain nombre de toxines agissant sur les canaux calciques, telles que les  $\omega$ conotoxines et les  $\omega$ -agatoxines, sont connues. On compte parmi celles-ci, l' $\omega$ -CTx GVIA (Pallaghy et al., 1993; Davis et al., 1993; Skalicky et al., 1993; Sevilla et al., 1993; Pallaghy et Norton., 1998), l' $\omega$ -CTx MVIIC (Nemoto et al., 1995; Farr-Jones et al., 1995), l' $\omega$ -CTx MVIIA (Basus., 1995; Kohno et al., 1995), l' $\omega$ -CTx MVIID (Civera et al., 1999), l' $\omega$ -CTx SVIB (Nielson et al., 1996), l' $\omega$ -Aga IVA (Kim et al., 1995) et l' $\omega$ -Aga IVB (Yu et al., 1993; Adams et al., 1993; Reily et al., 1995).

Curieusement, toutes ces toxines adoptent un motif structural commun. Ce motif structural est constitué d'un feuillet  $\beta$  à 3 brins antiparallèles de topologie (+2x, -1), décrite par Richardson en 1981 (Richardson, 1981) (Figure 8). Comme les autres toxines animales, leur structure tertiaire est stabilisée par plusieurs ponts disulfure (3 à 4 ponts disulfure). Il est à noter, que dans la nature, d'autres polypeptides n'ayant pas les mêmes fonctions que les toxines animales, adoptent également ce motif très stable, connu sous le nom de *"inhibitor cystine knot"*. C'est entre autre, le cas des inhibiteurs de protéases, ou encore des phénoloxydases (Harrison et al., 1996; Pallaghy et al., 1994; Norton et Pallaghy; 1998; Daquinag et al., 1999). Ce motif *"inhibitor cystine knot"* semble stabiliser les polypeptides qui exerçent une activité inhibitrice sur des récepteurs beaucoup plus grands, tels que les canaux ioniques ou les protéases.

77



Figure 8. Représentation schématique de la topologie (+2x, -1) décrite par Richardson (1981), du feuillet de trois brins antiparallèles caractéristique d'inhibiteurs polypeptidiques.

Les structures tertiaires des " $\omega$ -toxines" les plus étudiées, sont celles de l' $\omega$ -CTx GVIA et de l' $\omega$ -aga IVA et B (Figure 9). Brièvement, L' $\omega$ -CTx GVIA possède trois segments courts organisés en un feuillet  $\beta$ . Sa structure tertiaire est stabilisée par trois ponts disulfure (Pallaghy et Norton, 1998). Malgré la différence de taille et les faibles homologies de séquence, la structure tertiaire de l' $\omega$ -aga-IVA est très proche de celle de l' $\omega$ -CTx GVIA. Celle-ci est également composée de trois segments organisés en un feuillet  $\beta$  (Kim et al., 1995). Les différences les plus significatives entre les deux toxines, se situent dans les parties N- et Cterminales. En effet, l' $\omega$ -Ctx GVIA possède des extrémités N- et C-terminales plus courtes que celles de l' $\omega$ -Aga IVA, qui elles adoptent une structure désordonnée en solution (Kim et al., 1995). De plus, l' $\omega$ -Aga IVA possède un pont disulfure supplémentaire, qui a pour rôle de stabiliser la boucle située entre le brin  $\beta$ 2 et le brins  $\beta$ 3. Dans le cas de l' $\omega$ -CTx GVIA, cette même boucle forme un tournant en "épingle à cheveux", très stable (Pallaghy et al., 1993).



Figure 9. Structure tridimensionnelle de l' $\omega$ -Aga IVA (a) et de l' $\omega$ -Ctx GVIA (b). Les deux structures ont été générées par le programme Molscript (Kraulis et al., 1991) à partir des fichiers PDB des deux toxines.

Les toxines isolées du venin de *Segestria florentina*, forment une nouvelle famille de toxines d'araignées, pour laquelle aucune structure tridimensionnelle en solution n'a été décrite. La structure de la toxine SNX-325, isolée du même venin et appartenant à la même famille, n'a pas encore été résolue (Newcomb et al., 1995). Des études d'homologie de séquence avec d'autres toxines d'araignées, montrent que ces toxines sont différentes et qu'elles adoptent une distribution des résidus de cystéines originale. L'étude de la structure tridimensionnelle d'une de ces toxines, devrait apporter une contribution très importante dans l'étude des relations structure-activité des toxines animales. La structure tridimensionnelle d'une toxine de cette famille a donc été déterminée dans notre laboratoire (Christophe Dhalluin, thèse 1996). Du fait de sa spécificité pour les canaux calciques de type N-, la toxine Sf17 a été choisie pour ces études structurales.

### 2. 3. 4. 2. Structure tridimensionnelle de Sf17.

La détermination de la structure de Sf17 a été réalisée à partir de 6 mg de toxine synthétique. Les spectres de RMN ont été obtenus avec des concentrations finales de 2,5 mM et 4,7 mM à pH 2,9 sans ajustement préalable. L'acquisition des données a été réalisée à 4°C et à 30°C par un spectromètre Bruker DMX-600. Les structures ont été calculées par le programme X-PLOR (Brünger et al., 1992).

#### Structure secondaire de Sf17

Le principal élément de structure secondaire de Sf17, est un feuillet de trois brins  $\beta$  antiparallèles (Figure 10). Les segments Gly7-Lys11, Asn22-Ser26 et Tyr41-Arg45, représentent respectivement les brins  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3. La partie N-terminale de la toxine, du résidu Lys2 au résidu Asn5, adopte une structure étendue non connectée au feuillet  $\beta$ .

A la différence des structures de l' $\omega$ -CTx GVIA et de l' $\omega$ -aga IVA, un second élément de structure secondaire a été observé. En effet, le segment de 5 résidus: Ile32-Gln36, forme un petit domaine en hélice  $\alpha$  (figure 10).

Des données sur l'attribution des ponts disulfure ont été obtenues, par des calculs statistiques et par la présence de contacts NOE entre les protons  $\beta/\beta$  et/ou, entre des protons  $\alpha/\beta$  de deux cystéines (Klaus et al., 1993): Cys3 $\beta$ /Cys19 $\beta$  et Cys3 $\beta$ /Cys19 $\alpha$ ; Cys18 $\beta$ /Cys44 $\alpha$ , et Cys25 $\beta$ /Cys42 $\alpha$  et Cys25 $\alpha$ /Cys42 $\beta$ . Des contacts NOE entre les cystéines 10 et 23 n'ont pas été observés. Ces données, corrélées à celles obtenues à partir des coupures enzymatiques sur la toxine Sf21, ont permis d'affirmer que la combinaison des ponts disulfure de l'état natif de Sf17, était la suivante:

79



### Cys3-Cys19; Cys10-Cys23; Cys18-Cys44; Cys25-Cys42

Figure 10. Localisation des éléments de structure secondaire dans la séquence de la toxine Sf17.

#### Structure tertiaire de Sf17

La structure tridimensionnelle de Sf17 est constituée d'un segment N-terminal (Lys2-Asn5) de structure étendue, d'un feuillet de trois brins antiparallèles  $\beta$ 1 (Gly7-Lys1),  $\beta$ 2 (Asn22-Ser26) et  $\beta$ 3 (Tyr41-Arg45), d'une petite boucle (Gly12-Gly21) contenant à ses extrémités, deux tournants: (Gly12-Ser15) et (Cys18-Gly21), et d'une large boucle (Ala27-Gly40), contenant 14 résidus dont 5 forment une hélice  $\alpha$  (Ile32-Gln36). Cette dernière boucle relie les brins  $\beta$ 3 et  $\beta$ 4. Une structure tridimensionnelle en ruban de Sf17, est présentée sur la figure 11.



Figure 11. Structure tridimensionnelle de Sf17. La structure a été obtenue par le programme Molscript (Kraulis et al., 1991). Le feuillet  $\beta$  à 3 brins antiparallèle est représenté en orange, l'hélice  $\alpha$  est représenté en violet.

Le feuillet  $\beta$  antiparallèle de la toxine Sf17 est une structure de topologie (+2x, -1) (Richardson et al., 1981) (Figure 12). Ce feuillet représente une région riche en cystéines: cinq cystéines de la séquence se trouvent dans le feuillet:

- Le pont disulfure Cys10-Cys23 connecte les brins  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3,

- Les brins  $\beta$ 3 et  $\beta$ 4 sont connectés par le pont Cys25-Cys42.

- Les ponts disulfure Cys3 et Cys19 et Cys18 et Cys44 connectent la première boucle Gly12-Gly21 à la partie N-terminale et au brin  $\beta$ 4, respectivement. Le pont Cys3-Cys19 est à l'extérieur de la protéine tandis que les trois autres ponts participent au cœur de la protéine.



Figure 12. Représentation schématique du feuillet de trois brins antiparallèles de la toxine Sf17, selon la topologie (+2x, -1) de Richardson.

# 2. 3. 4. 3. Comparaison de la structure de Sf17 avec les toxines d'araignées agissant sur les canaux calciques.

La toxine Sf17 possède un feuillet  $\beta$  à trois brins antiparallèles classique des toxines d'araignées et des cônes marins (Pallaghy et al., 1994). La figure 13 présente la comparaison entre la structure tridimensionnelle de Sf17 et celles des toxines  $\omega$ -Aga IVA et  $\omega$ -CTx GVIA.



Figure 13. Comparaison des structures tridimensionnelles de Sf17, de l' $\omega$ -Aga IVA et de l' $\omega$ -Ctx GVIA. Les structures ont été générées par le programme molscript.

Cependant, la toxine Sf17 présente une différence structurale importante par rapport aux autres toxines antagonistes des canaux calciques. Cette différence se situe dans la longueur de la boucle reliant les deux brins  $\beta 2$  et  $\beta 3$ , du feuillet  $\beta$ . En effet, la boucle de Sf17 est constituée de 14 résidus (Ala27-Gly40), alors que celles de l' $\omega$ -aga IVA et de l' $\omega$ -CTx GVIA ne sont constituées que d'un petit nombre de résidus, respectivement 6 et 5 (Davis et al., 1993; Kim et al., 1995; Reily et al., 1995). Dans l' $\omega$ -Aga IVA, cette boucle très courte n'adopte pas de structure particulière. Dans l' $\omega$ -CTx GVIA, elle forme un tournant de type  $\beta 1$  (Kim et al., 1995; Davis et al., 1993). Par contre, dans la toxine Sf17 cette boucle, dont la flexibilité a été observée dans les structures tridimensionnelles, adopte une petite région en hélice  $\alpha$  de 5 résidus. Cette hélice commence au résidu Ile32 et se termine au résidu Gln36 et est constituée d'une majorité de résidus hydrophobes (-Ile32-Ala-Met-Ile-Gln36-).

La présence d'une région en hélice  $\alpha$  n'a encore jamais été observée dans les structures de toxines d'araignées et de cônes marins, contrairement aux toxines de scorpions ou de serpents (Omecinsky et al., 1996). Il est possible d'imaginer que cette petite hélice  $\alpha$  ait un rôle déterminant dans l'interaction entre la toxine et son récepteur.

# 2. 4. "Dock and Lock": mécanisme d'interaction des toxines de *Segestria florentina* avec les canaux calciques?

### 2. 4. 1. Introduction

Bien que de nombreux travaux aient permis de déterminer les éléments essentiels qui influencent l'affinité des toxines pour leur récepteur (Auguste et al., 1992; Park et Miller, 1992; Sabatier et al., 1993; Haack et al., 1993; Lampe et al., 1993; Sato et al., 1993; Stampe et al., 1994; Kim et al., 1995; Nadasdi et al., 1995; Lew et al., 1997), relativement peu de travaux ont étudié la question essentielle de la sélectivité des toxines animales (Nadasdi et al., 1995; Nielson et al., 1996; Sato et al., 1997; Nielson et al., 1999). Les toxines animales isolées du venin de *Segestria florentina* nous ont donné l'opportunité de commencer un travail de recherche visant à mieux comprendre le mécanisme d'action et l'origine de la sélectivité de certaines toxines animales. Pour cela, des hybrides de Sf17 ont été élaborés. Cependant, les tests biologiques permettant de valider nos hypothèses n'ont pas pu être réalisés, du fait de nouvelles priorités de la société Eli Lilly en Angleterre, avec laquelle nous avons collaboré tout au long de ces études. Les premiers travaux réalisés sont exposés ci-dessous.

Olivera et al, qui travaillent sur les toxines de cônes marins, ont récemment suggéré que la spécificité de certaines toxines animales devait provenir d'un *mécanisme de double interaction* avec le récepteur membranaire ou le canal ionique (Olivera et al., 1997). Ce mécanisme, nécessitant non pas un seul site spécifique d'interaction mais deux sites spécifiques, serait à l'origine d'un plus haut pouvoir de discrimination entre les isoformes d'une même famille de récepteurs. Ce nouveau concept concernant ce mode d'interaction n'a pas encore été démontré. Jusqu'à maintenant, un mécanisme d'interaction ne faisant participer qu'un seul site de la toxine est décrit et généralement un petit nombre de résidus est incriminé pour l'interaction avec le canal, le reste de la protéine servant essentiellement de support pour l'activité (Pillet et al., 1993; Stampe et al., 1994; Goldstein et al., 1994; Dauplais et al., 1997).

### 2. 4. 2. Le mécanisme de double interaction à l'origine de la spécificité

Selon Olivera et al, au cours de leur évolution, les cônes marins auraient subit des pressions de sélection assez intenses pour générer des toxines de plus en plus efficaces. La nécessité d'immobiliser une proie toujours plus rapidement aurait été un critère de sélection parmi les toxines générées dans les venins. En effet, sécréter une toxine qui agit directement sur la cible clef pour la paralysie de la proie, sans se fixer sur des cibles inopinées, est le moyen le plus efficace pour la paralyser rapidement (Olivera et al., 1997).

En observant la structure tridimensionnelle de l' $\alpha$ -MII, toxine spécifiquement ciblée contre des récepteurs nicotiniques neuronaux de type  $\alpha_3\beta_2$  (Shon et al., 1997), Olivera suggère un mécanisme de double interaction entre le récepteur et la toxine. Ce mécanisme de double interaction serait à la base d'un pouvoir de discrimination de  $\alpha$ -MII, entre les récepteurs nicotiniques du muscle squelettique et des neurones. La distribution particulière des différents types d'acides aminés de cette toxine, crée deux faces distinctes, dont l'une contient des acides aminés hydrophobes et l'autre des acides aminés hydrophiles. Cette toxine serait un ligand à deux têtes nommé *"Janus-Ligand"*, qui adopterait un mécanisme de double interaction appelé *"Dock and Lock"*.

Un peu plus tard, Hill et al. suggèrent plus précisément l'importance des résidus hydrophobes exposés à la surface de cette toxine (Hill et al., 1998). Ils proposent un mécanisme d'action, avec une première interaction, longue distance de type électrostatique, impliquant le résidu chargé d'acide glutamique en position 11. Cette première interaction entraînerait la seconde interaction, entre les résidus hydrophobes et le récepteur.

2. 4. 3. Les toxines de *Segestria florentina* adoptent-elles un mécanisme de double interaction?

# 2. 4. 3. 1. Deux motifs structuraux communs, à égal distance dans Sf17 et l' $\omega$ -Aga IVA

Les toxines du venin de *Segestria florentina* montrent peu d'homologie avec les toxines de venins d'araignées décrites dans la littérature et agissant sur les canaux calciques. Cependant, la comparaison de la séquence de la toxine de Sf17 qui agit sur les canaux calciques de type N-, avec celles des  $\omega$ -aga IVA et B, qui elles ont pour cible les canaux calciques de type P-, montre une distribution similaire des différents types de résidus d'acides aminés dans la structure primaire. Les acides aminés hydrophiles se trouvent dans la première moitié de la chaîne polypeptidique et les acides aminés hydrophobes dans la seconde moitié (Figure 14).

Plus précisément, l'alignement des séquences des deux polypeptides met en évidence: (i) qu'un segment hydrophobe de longueur équivalente (11 résidus d'acides aminés) situé en Cterminal de l'ω-Aga IVA/B se retrouve entre la Cys VI et la Cys VII dans Sf17. (ii) qu'un tripeptide aux extrémités basiques, respectivement "KGK" ou "RGR" se trouve à égal distance du segment hydrophobe dans la séquence de Sf17 et  $\omega$ -agaIVA/B (figure 14). D'autre part, les études structurales montrent, que le segment hydrophobe et le tripeptide basique de Sf17 sont proches dans l'espace. De même, le segment C-terminal de l' $\omega$ -Aga IVA décrit comme très flexible, peut se rapprocher facilement du motif basique "RGR" (Figure 15).



Figure 14. Alignement des séquences primaires des toxines Sf17 et  $\omega$ -Aga IVA/B, en fonction des résidus de cystéines. L'alignement des séquences montre que les motifs basiques et hydrophobes sont à égale distance dans la séquence des deux toxines.



Figure 15. Superposition de 14 structures de l' $\omega$ -aga IVA, indiquant que la structure C-terminale de la toxine est très flexible (Kim et al., 1995).

La redondance des motifs chargés et hydrophobes, à égale distance dans les deux toxines nous fait penser que ces deux éléments, chargés et hydrophobes, sont impliqués dans l'interaction avec le canal et que le mécanisme d'action de ces toxines est similaire au mécanisme de type "Dock and Lock" suggéré par Olivera et al (Olivera et al., 1997).

Les potentiels électrostatiques des toxines Sf17 et  $\omega$ -Aga IVA ont été calculés. La figure 16 montre, que les motifs "KGK" et "RGR" forment un important potentiel positif à la surface des deux toxines. Dans la structure de Sf17, ce potentiel positif est proche du segment hydrophobe qui adopte une hélice  $\alpha$ . Dans l' $\omega$ -Aga IVA, un conformère pour lequel la partie C-terminale hydrophobe se rapproche le plus du motif "RGR", a été utilisé pour calculer le potentiel électrostatique.



Figure 16. Potentiels électrostatiques de Sf17 (a) et de l' $\omega$ -Aga IVA (b), calculé par le logiciel GRASP (Nicholls et al., 1991). Les potentiels positifs sont représentés en bleu et les potentiels négatifs sont représentés en rouge. Les régions hydrophobes, sont représentées en blanc.

Ainsi, dans ce mécanisme "Dock et Lock", l'initialisation de l'interaction aurait pour origine des interactions longues distances, de type électrostatique faisant intervenir le motif "RGR" ou "KGK". La seconde interaction serait une interaction beaucoup plus fine avec le segment hydrophobe, qui aboutirait à la "fonctionnalisation" de l'interaction, c'est à dire à l'effet physiologique.

En résumé, dans le cas de ces toxines d'araignées le processus d'interaction et de "fonctionnalisation" de la toxine se déroulerait en deux étapes (schéma 1): (1) initialisation de l'interaction, avec le rapprochement d'une face spécifique de la toxine avec un site récepteur spécifique du canal. Cette première interaction serait une interaction de type éléctrostatique. (2) La première interaction aurait pour conséquence de faciliter la seconde interaction entre une autre région de la toxine et le second site récepteur du canal. Les deux parties de la protéine ainsi fixées sur le récepteur, aboutiraient à la "fonctionnalisation" du motif récepteur/ligand et à l'effet physiologique, qui dans le cas des toxines d'araignées est une inhibition du canal calcique.



Schéma 1. Mécanisme "Dock et Lock", pour une toxine antagoniste d'un canal ionique. Le triangle en jaune correspond à la première face de la toxine qui interagit avec le canal. Le parallépipède en bleu correspond à la deuxième face de la toxine interagissant avec le canal.

Dans le cas de l' $\omega$ -Aga IVA, l'importance du segment hydrophobe C-terminal pour l'inhibition des canaux calciques de type P-, a été étudiée par Kim et al (Kim et al., 1995). En effet, la toxine dépourvue des huit derniers résidus d'acides aminés, est 100 fois moins active que la toxine native (Kim et al., 1995).

L'importance des résidus basiques contenus dans le motif "RGR" n'a pas encore été clairement évaluée. Cependant, Kim et al suggèrent que les résidus Asp8, Arg21, Arg23 et Arg39 sont essentiels pour l'activité, du fait de leur proximité avec le segment hydrophobe C-terminal flexible (Kim et al., 1995).

Par ailleurs, il a été démontré que la délétion des trois résidus de lysines en position Nterminale de l' $\omega$ -Aga IVA n'affectait pas l'affinité de la toxine pour le canal calcique de type P-(Nishio et al., 1993). D'autre part, l' $\omega$ -Aga IVB, qui possède des résidus acides à la place des résidus basiques dans cette partie N-terminale, possède la même affinité que l' $\omega$ -Aga IVA. Cette différence importante dans la structure primaire, semble n'affecter que la cinétique d'inhibition des toxines. En effet, l'ω-Aga IVB bloque les canaux calciques de type P- huit fois plus lentement que l'ω-Aga IVA (Nishio et al., 1993; Reily et al., 1994).

Dans le cas de Sf17, nos expériences montrent que les résidus hydrophobes situés entre les CysVI et VII sont exposés à la surface de la toxine. En effet, la toxine repliée est plus hydrophobe que la toxine linéaire. D'autre part, la majorité des résidus hydrophobes, se trouvent entre les CysVI et VII (cf. Partie 1, Chapitre 2, détermination des ponts disulfure des toxines de *Segestria florentina*).

Afin de confirmer les hypothèses émises quant au mode d'action des toxines Sf17 et  $\omega$ -Aga IVA, des toxines hybrides de Sf17 ont été élaborées.

1. Dans un premier temps, nous avons cherché à connaître le degré de sélectivité qu'engendrait le segment hydrophobe et le tripeptide basique vis-à-vis des canaux calciques, d'après l'hypothèse suivante: si le segment hydrophobe C-terminal et le tripeptide basique "RGR" de l'ω-Aga IVA/B sont essentiels pour diriger les toxines vers les canaux de type P-, alors l'insertion de ce segment hydrophobe à la place du segment hydrophobe de Sf17 et la permutation de "KGK" en "RGR", devraient changer la sélectivité de Sf17 des canaux de type N- vers les canaux de type P-. Nous avons donc inséré dans la toxine Sf17, le segment hydrophobe de l'ω-Aga IVA et muté le motif "KGK" en "RGR". Cet analogue de Sf17 a été nommé: <u>Sf17 hybride</u>.

2. Pour démontrer "l'interdépendance" des deux motifs structuraux, l'idée a été de scinder la toxine Sf17 en deux, avec d'une part la partie portant uniquement le motif "KGK", à savoir le feuillet  $\beta$  antiparallèle à trois brins: <u>Sf17 sans boucle</u>, et d'autre part la boucle hydrophobe isolée et reliée aux extrémités par un pont disulfure: <u>Sf17 boucle</u>.

# 2. 4. 3. 2. Choix des analogues de Sf17

Afin de minimiser les problèmes de repliement des hybrides à synthétiser, les séquences ont été judicieusement choisies:

# Sf17 hybride

L'utilisation d'un algorythme de prédiction de structure secondaire (PredictProtein Server à l'EMBL) a permis de déterminer la séquence exacte à insérer dans la structure de Sf17. Nous avons cherché à insérer entre la Cys VI et VII de Sf17 hybride, le segment hydrophobe minimal de la séquence de l' $\omega$ -Aga IVA, capable de se structurer en hélice  $\alpha$ . Les études de prédictions ont montré que l'élimination du résidu de leucine en position 37 dans Sf17 provoque la "non structuration" en hélice  $\alpha$  (figure 17). Il est donc nécessaire de conserver le résidu de leucine 37. Pour cela, les huit résidus en position C-terminale de l' $\omega$ -Aga IVA ont été insérés entre les résidus 29 et 37 dans Sf17 (Figure 18).



Figure 17. Prédiction de structure secondaire (PredictProtein Server à l'EMBL). "E" signifie structure étendue, "H" signifie structure en hélice  $\alpha$ .

· ·	
+Aga IV,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_CECKPRL <mark>IMEGLGLA</mark>
+	
Sf17 GKCLNKGEV_C <mark>KGK</mark> MSDPCCSGP_CHCSAPL <mark>SPIAMIQL</mark> MAG	Y_CNCR
=	
117 hybride GKCLNKGEV_C <mark>RGR</mark> MSDPCCSGN_CHCSAPL <mark>IMEGLGLÄL</mark> MA	G Y C N C R

Figure 18. Séquence primaire de Sf17 hybride.

# Sf17 sans boucle.

Pour assurer la formation du feuillet  $\beta$  antiparallèle à trois brins après la délétion de la boucle hydrophobe, nous avons utilisé les résidus d'acides aminés de l' $\omega$ -Aga IVA formant le tournant 28-33 reliant les brins  $\beta$ 3 et  $\beta$ 4 (Figure 19).



Figure 19. Séquence primaire de Sf17 sans boucle.

# Sf17 boucle.

Afin d'augmenter la solubilité de la boucle hydrophobe Sf17 26-41, nous avons ajouté à chaque extrémité des cystéines formant les ponts disulfure, un résidu d'arginine séparé des cystéines par un résidu de glycine.



Figure 20. Séquence primaire de Sf17 boucle.

# 2. 4. 3. 3. Synthèse et repliement des polypeptides Sf17 hybride, Sf17 sans boucle et Sf17 boucle.

### a. Rappels

#### Synthèse peptidique

Le concept de synthèse peptidique en phase solide introduite par Merrifield en 1963, a connu un essor important. Il permet un synthèse rapide et automatisable. Dans cette technique, chaque acide aminé est additionné pas à pas sur un support polymérique insoluble (résine) dans l'ordre de la séquence. La synthèse en phase solide offre beaucoup d'avantages par rapport à la synthèse peptidique en solution. En effet, l'accrochage du peptide en croissance sur un support solide permet d'utiliser un excès de réactif et de grandes quantités de solvants. Les rendements de synthèse s'en trouvent améliorés et les peptides sont plus facilement purifiés.

En pratique, la synthèse peptidique se réalise de la partie C-terminale à la partie Nterminale du peptide (Figure 21). Le groupe  $\alpha$ -carboxyl de l'acide aminé en C-terminal est attaché de façon covalente au support solide, tandis que le groupe  $\alpha$ -amino est protégé de façon temporaire. Toutes les chaînes latérales des acides aminés sont préalablement protégées afin d'éviter des réactions secondaires pouvant interférer avec la formation des liaisons peptidiques. Un cycle typique de synthèse consiste dans un premier temps à déprotéger l' $\alpha$ -amino du dernier acide aminé attaché à la résine, à neutraliser et à laver la résine. Dans un second temps, la liaison peptidique sera formée avec l'acide aminé suivant, dont le groupement carboxylique aura été préalablement activé. Enfin, un dernier lavage est réalisé suite à cette réaction. Ce cycle est répété jusqu'à obtenir la séquence peptidique désirée. Lorsque la synthèse est complète, le peptide est déprotégé et détaché de son support insoluble. Cette synthèse sera ensuite suivie d'étapes de purification.

La protection dite temporaire de la fonction  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> utilisée pour la synthèse du peptide détermine la "stratégie" ou la "chimie" ainsi que le choix des protections latérales dites "protections permanentes". Les deux stratégies de protections temporaires les plus courantes 9utilisent le groupement temporaire *t*-*ButylOxyCarbonyle* (Boc) ou FluorenylMéthylOxyCarbonyl (Fmoc). Le groupement Boc, mis au point par Merrifield en 1963, est clivé par les acides forts tel que l'acide trifluoroacétique (TFA) et l'acide fluorhydrique (HF) mais est insensible à l'hydrogénolyse. Le groupement Fmoc introduit en 1970 par Carpino et Han (Carpino et Han, 1970, Carpino et al., 1986) est quant à lui clivé en milieu basique. La base la plus utilisée est la pipéridine. Ainsi, les groupements protecteurs des chaînes latérales, dans le cas d'une stratégie Boc, doivent être stables aux traitements répétés avec du TFA et pouvoir être clivés lors du traitement HF final. D'autre part, les groupements

protecteurs des chaînes latérales dans le cas d'une stratégie Fmoc doivent être stables à l'action de la pipéridine et clivables en présence de TFA lors de la coupure finale. Toutefois, les protections doivent être également choisies en fonction de la nature et de la longueur de la chaîne peptidique. Ainsi, le groupement "Dnp" servant à protéger le l'atome d'azote de l'histidine sera préféré au groupement Bom lorsqu'en fin de chaîne se présente une cystéine.

La formation d'une liaison peptidique nécessite l'activation du groupement carboxylique de l'acide aminé à attacher. Les réactifs de couplage les plus couramment utilisés sont des carbodiimides ou des esters activés. Le dicyclohexylcarbodiimide est un des premiers agents couplants à avoir été utilisé en SPPS et est aujourd'hui encore très employé. Les esters activés les plus utilisés sont aujourd'hui les esters d'HOBt, l'HBTU, le BOP (Castro et al., 1975) et le ByBOP.

Dans les deux stratégies Boc et Fmoc, la coupure finale de la liaison peptide-résine implique également la déprotection des chaînes latérales fonctionnalisées. Il y a donc, libération de cations réactifs (cations t-butyles, benzyles, etc) pouvant alkyler le peptide. La présence de molécules piégeant ces carbocations (*scavengers*) est donc indispensable.

La coupure HF standard "high HF" procède selon un mécanisme de type SN1. Les carbocations libérés sont piégés par des *scavengers* : anisole, thioanisole, *p*-crésol et thiocrésol. Le choix des *scavengers*, de la température, du temps de réaction dépend de la séquence en acides aminés. Dans certains cas, notamment lorsqu'une méthionine sulfoxyde a été incorporée dans la séquence, une réaction supplémentaire nommée "low HF procedure" est réalisée avant le clivage effectif du peptide de la résine par la coupure "high HF". Ceci se réalise par l'addition d'une quantité faible d'HF en quantité équimolaire de DMS. Dans ce cas, il se produit une réaction de type SN2.

Dans le cas de la stratégie Fmoc, le clivage peptide-résine se fait par le TFA. L'emploi de scavengers est également nécessaire.



Figure 21.Schéma général de la synthèse peptidique en phase solide

### Repliement des protéines

Anfinsen démontre en 1957 par des expériences sur la ribonucléase A, le pouvoir des protéines à se replier spontanément après dénaturation. Depuis, il est clairement accordé que le repliement des protéines est un processus spontané. Toute l'information nécessaire pour le repliement d'une protéine se trouve dans sa séquence en acides aminés. Dans des conditions de renaturation, beaucoup de protéines se replient pour prendre leur structure native en quelques secondes (Anfinsen, 1973; Baldwin, 1975). Ceci implique donc, que le repliement des protéines est un processus en plusieurs étapes et non un processus aléatoire, qui fait intervenir une série de mécanismes séquentiels au cours desquels l'évolution vers l'état natif s'accompagne d'une augmentation très importante de la stabilité conformationnelle (diminution de l'énergie libre). Ce processus débute par la formation de petites structures secondaires locales tels que des hélices  $\alpha$  et des feuillets  $\beta$  qui servent de centres de nucléation ou "d'échaffaudage". Ces noyaux se réunissent spontanéement et de façon coopérative jusqu'à former un domaine natif. Ensuite une série d'ajustements conformationnels et de consolidation des intermédiaires de repliement, aboutissent à la structure tertiaire plus compacte (Goldenberg et Creighton. 1985).

Le caractère relativement hostile des environnements extracellulaires comme le plasma, le tractus gastro-intestinal, les venins ou la salive vis-à-vis des protéines (températures et pH non contrôlés) nécessite une stabilité structurale supplémentaire pour les protéines excrétées, telles que les hormones, les cytokines, les enzymes, les immunoglobulines, les inhibiteurs d'enzymes, ou encore les toxines. Cette stabilité leur est conférée par la présence de ponts disulfure reliant les structures secondaires de la protéine entre elles. Les ponts disulfure se forment en même temps que le repliement de la protéine. Les protéines dépliées avec des ponts disulfure peuvent se replier spontanément, cependant ce processus est plus délicat. En effet, plus le nombre de ponts disulfure augmente plus le nombre de topologies possibles différentes augmente (Anfinsen and Scheraga, 1975). Ceci a pour conséquence de rendre plus difficile le repliement de la molécule in vitro. Le repliement des protéines à ponts disulfure nécessite un partenaire rédox tel que l'oxygène ou le gluthation. Le gluthation est naturellement présent dans la cellule à des doses importantes. Il aide à réorganiser (brassage) les ponts disulfure pour atteindre une structure native. Le repliement est donc catalysé par des thiols libres et son efficacité est liée à son potentiel. Dans la cellule, le repliement est également assisté par deux enzymes principales, la "protein disulfide isomerase" ou PDI et la "prolyl peptidyl isomerase" ou PPI. Finalement, les couples rédox et la PDI permettent d'atteindre le repliement correct.

# b. Synthèses peptidiques en SPPS et repliement oxydatif des polypeptides Sf17 hybride, Sf17 sans boucle et Sf17 boucle

Les polypeptides Sf17 hybride, Sf17 boucle et Sf17 sans boucle ont été synthétisés en phase solide par un synthétiseur automatique 430A de chez Applied Biosystem Inc, en utilisant la stratégie Boc/benzyl.

Comme il a été décrit précédemment, un des points critiques de la synthèse des toxines, ou de manière générale des protéines riches en cystéines, est la formation correcte des ponts disulfure. De ce fait, il est parfois nécessaire de mettre au point des conditions d'oxydation particulières pour obtenir une toxine ayant un appariement correct des ponts disulfure. Par conséquent, les essais de repliements des polypeptides linéaires ont été réalisés sur de petites quantités de polypeptides synthétiques.

#### <u>Sf17 hybride</u>

Le polypeptide Sf17 hybride étant apparenté au polypeptide Sf17 déjà synthétisé au laboratoire, les mêmes conditions de repliement ont été utilisées. Le repliement a été réalisé à pH 8.5 et à température ambiante avec un couple rédox GSH/GSSG, 2 mM/4 mM. Dans ces conditions, la toxine se replie rapidement. La figure 22 présente le profil chromatographique du peptide linéaire juste avant son incorporation dans la solution d'oxydation, et le profil chromatographique du peptide au bout de 15 min de réaction.

La masse théorique de la toxine réduite est de 4823.15 Da, ce qui indique que les 4 ponts disulfure sont formés et que la protéine est repliée. La masse moléculaire déterminée par spectrométrie de masse en mode électrospray est de 4815.4 Da. La différence de masse moléculaire, entre la masse théorique et la masse observée étant de 8 AMU, ceci indique que les 8 cystéines sont oxydées et que les 4 ponts disulfure sont formés.



Figure 22. Repliement oxydatif de Sf17 hybride à pH 8,5 en présence de GSH/GSSG 2 mM/4 mM. (a) témoin Sf17 hybride réduit (temps 0). (b) Sf17 hybride oxydé au bout de 15 min. Colonne C18 Nucleosil (4,6 mm x 250 mm), gradient de 0 à 80% d'acétonitrile en 40 min, 1 ml/min, 50°C.

### Sf17 sans boucle

Le repliement du peptide linéaire a été mené à température ambiante avec un couple rédox cystéine réduite et oxydée en proportion 2 mM/8 mM. Dans ces conditions, le repliement total du peptide a été réalisé en 1 heure (Figure 23).



Figure 23. Repliement oxydatif de Sf17 sans boucle, à pH 8,5 en présence de CysSH/Cys-Cys en proportion 2 mM/16mM. (a) témoin du polypeptide avant oxydation (T0), (b) polypeptide au bout de 1 heure dans le milieu d'oxydation. Colonne C18 Vydac (4,6 x 250 mm), gradient de 0 à 60% d'acétonitrile en 40 min, 1 ml/min.

### Sf17 boucle

La formation de l'unique pont disulfure a été réalisé sous atmosphère, à température ambiante sans couple rédox. Au bout de 40 min, l'oxydation des cystéines a été obtenue (Figure 24).



Figure 24. Repliement oxydatif de Sf17 boucle à pH 8,5 en présence de 30% de DMF. (a) témoin: polypeptide linéaire; (b) 10 min d'oxydation, (c) 20 min d'oxydation, (d) 30 min d'oxydation, (e) 40 min d'oxydation. Colonne TSKgel (TSK-GEL) (4,6 mm x 20 mm; 2 μm), gradient: 0 à 80 % à de B en 10 min, 2 ml/min, 50°C.

En conclusion, ces résultats indiquent que les trois analogues de Sf17 ont été repliés.

# 2. 4. 3. 4. Vérification de la conservation des éléments structuraux de Sf17 naturelle dans les analogues.

Afin de valider les hypothèses émises concernant le mécanisme d'interaction des toxines Sf17 et  $\omega$ -Aga IVA/B, il est nécessaire de montrer au préalable que les motifs structuraux caractéristiques de la toxine Sf17 sont conservés dans les toxines hybrides. Pour cela, la structure globale de Sf17 hybride a été comparée à celle de Sf17 par une étude de dichroïsme circulaire. Des études plus poussées ont été réalisées dans le cas des hybrides Sf17 sans boucle et Sf17 boucle. La structure de ces deux derniers polypeptides a été déterminée par RMN.

# a. Comparaison des spectres de dichroïsme circulaire (CD) des polypeptides Sf17 et Sf17 hybride.

Les résultats de synthèse peptidique nous donne dans un premier temps une indication sur la structure en solution de Sf17 hybride. En effet, un pic fin et homogène est obtenu en chromatographie analytique. Cependant, pour confirmer ces résultats, nous avons procédé à des études par dichroïsme circulaire de la structure globale de Sf17 hybride, et compar\_ la forme du spectre de Sf17 hybride avec celle de Sf17 naturelle. La figure 25 montre que la structure de Sf17 hybride est proche de celle de Sf17 naturelle.



Figure 25. Superpostion des spectres de dichroïsmes circulaires de Sf17 naturelle et de Sf17 hybride. Les spectres CD ont été mesurés sur un dichrographe Jobin Yvon. Les expériences ont été réalisées dans une cuve de 0,1 mm à 23°C, entre 179 et 340 nm tous les 0,5 nm. 3 spectres ont été accumulés pour chaque longueur d'onde pendant 2 sec. Les spectres ont été pris dans le TFE à 30 %. La concentration Sf17 naturelle et de Sf17 hybride était respectivement, de 147  $\mu$ M et de 645  $\mu$ M.

### b. Etude structurale de Sf17 sans boucle et de Sf17 boucle par RMN.

La détermination de la structure des deux analogues de Sf17 a été réalisée en collaboration avec Emeric Wasielewski dans le cadre de son DEA.

Le peptide Sf17 sans boucle adopte en trois endroits différents de la séquence, une conformation étendue caractérisée par un ensemble de contacts NOE forts  $\alpha N(i, i+1)$ , consécutifs et de constantes de couplage 3JHN $\alpha$  élevés (> 9 Hz). Ces motifs se retrouvent pour

les séquences Glu8-Lys11, Asn22-Ser26 et Cys32-Arg35. Ces observations sont compatibles avec la présence d'un feuillet à 3 brins  $\beta$  antiparallèles. La présence de contacts NOE séquentiels forts de type X-Pro  $\alpha\delta(i, i+1)$  entre Asp16 et Pro17 nous indique que la proline adopte une conformation *trans*. D'autre part, des contacts NOE caractéristiques : Cys3 H $\beta$ -Cys19 HN, Cys18 H $\beta$ -Cys34 HN, Cys25 H $\alpha$ -Cys32 H $\beta$ , confirment l'arrangement des ponts disulfure: Cys3-Cys19; Cys10-Cys23; Cys18-Cys34; Cys25-Cys32.

La structure tertiaire de Sf17 sans boucle a été calculée à partir de 155 contacts NOE. Sur 100 structures initialement générées par le logiciel X-PLOR et après minimisation d'énergie, 18 structures de plus basse énergie ont été sélectionnées.

La structure tertiaire de Sf17 sans boucle est présentée figure 26. Cette structure est constituée d'un feuillet  $\beta$  de 3 brins antiparallèles de topologie (+2x, -1) (Richardson et al., 1981). Les quatre ponts disulfure sont bien définis et occupent des emplacements similaires lorsque les quatre structures sont superposées. Les ponts disulfure Cys10-Cys23, Cys25-Cys32 et Cys18-Cys34 connectent entre eux les segments peptidiques en structure étendue et stabilisent le coeur hydrophobe de la protéine.



Figure 26. Structure tertiaire de Sf17 sans boucle. Les sphères jaunes représentent les ponts disulfure. Le feuillet β est représenté en bleu.

La structure de Sf17 sans boucle a été superposée avec la structure de Sf17 naturelle en fonction de le chaîne principale (Figure 27).





Figure 27. Superposition de la structure de Sf17 naturelle et de Sf17 sans boucle selon le feuillet β à trois brins antiparallèles. Un RMS de 1,165 Å a été obtenu (Logiciel INSIGHT II). En rose est représentée l'hélice α de Sf17. En bleu est représentée la région contenant le motif "KGK".

### Différences de déplacements chimiques des protons a entre Sf17 sans boucle et Sf17 naturelle

Les déplacements chimiques des protons  $\alpha$  de Sf17 sans boucle ont été comparés à ceux de la toxine Sf17 naturelle. Pour cela, les déplacements chimiques de Sf17 naturelle ont été soustraits à ceux de Sf17 sans boucle. La figure 28 présente le diagramme des différences de déplacements chimiques entre Sf17 sans boucle et Sf17 naturelle.



Figure 28. Diagramme représentant les différences de déplacements chimiques par résidu, entre le peptide Sf17 sans boucle et le peptide Sf17.

La comparaison des déplacements chimiques prend en compte tous les résidus des polypeptides Sf17 naturelle et Sf17 sans boucle à l'exception de la Gly1 et du segment Ser26-Asn31 qui forment la boucle hydrophobe de Sf17. Des différences de déplacement chimiques faibles inférieures à 0,05 ppm sont observés pour la majorité des résidus. Ceci signifie que le feuillet  $\beta$  de Sf17 sans boucle et très proche de celui de Sf17 naturelle. Cependant, des différences plus importantes (supérieures à 0,05 ppm) sont observées dans la région encadrant la boucle reliant les brins  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3. Ceci s'explique facilement par le fait que c'est cette région de Sf17 naturelle qui a subit une modification importante. Toutefois, des différences supérieures ou égale à 0,05 ppm sont aussi observées dans la région du motif basique "KGK" au niveau des résidus Lys11, Lys13 et Ser15. En effet, le motif "KGK" est proche de la boucle et donc l'orientation des chaînes latérales est influencée par la modification de Sf17 naturelle.

### c. Etude structurale de Sf17 boucle par RMN.

• Dans H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (90/10)

Le segment peptidique Met12-Met16 représente la partie la plus structurée du polypeptide. Quelques contacts NOE de type : HN-HN(i, i+1), H $\alpha$ -HN(i, i+3), H $\alpha$ -HN(i, i+4) et H $\alpha$ -H $\beta$ (i, i+3), caractéristiques d'une structuration en hélice  $\alpha$ , sont observés. Cependant, ceux-ci ne sont pas suffisants pour confirmer une structure en hélice  $\alpha$  stable. La boucle Sf17 est en équilibre entre une conformation étendue et une hélice  $\alpha$  structurée. Des contacts NOE caractéristiques forts X-Pro  $\alpha\delta$ (i, i+1) détectés pour les deux prolines de la séquence, montrent que ces résidus adoptent une conformation de type *trans*. La présence du pont disulfure Cys3-Cys20 a été confirmée par des contacts NOE entre les protons Cys3 H $\beta_2$  et Cys20 H $\beta_1$ , ainsi qu'entre les protons Cys3 H $\alpha$  et Tyr19 H $\epsilon_2$ .

• Dans H<sub>2</sub>O/TFE (70/30)

Pour confirmer que l'obtention d'une hélice  $\alpha$  stable est possible, des spectres RMN ont été pris dans un mélange H<sub>2</sub>O/TFE. En effet, il a été montré que le TFE était un inducteur et un stabilisateur d'hélice  $\alpha$  (Sönnichsen et al., 1992). La bonne dispersion des résonances a permis une attribution aisée des protons et une structuration plus stable de l'ensemble de la boucle avec dans la région des résidus 10 à 17, de nombreux contacts NOE de type: HN-HN(i, i+1), H $\alpha$ -HN(i, i+3), H $\alpha$ -HN(i, i+4) et H $\alpha$ -H $\beta$ (i, i+3). Ces résultats confirment l'effet du TFE sur la structuration des protéines. Les structures finales ont donc été générées à partir des fichiers de contraintes obtenus dans le TFE à 30%. Une faible structuration des extrémités de la boucle RG- et -GR est notée, traduisant une grande flexibilité dans ces régions. Le pont disulfure entre Cys3 et Cys20 est confirmé par la présence de contacts NOE médium entre les protons Cys3 H $\beta_2$  et Cys20 H $\beta_1$ , ainsi qu'entre les protons Cys3 H $\alpha$  et Tyr19 H $\epsilon_2$ .

La structure tertiaire de la boucle Sf17 a été calculée à partir de 103 contraintes et sur 100 structures initialement générées par le logiciel X-PLOR, 64 ont satisfait aux critères d'acceptance, à savoir, aucune violation de NOE supérieure à 0,2 Å. La figure 29 présente la structure tertaire de Sf17 boucle.

Dans le mélange  $H_2O/TFE$  une structure en hélice  $\alpha$  stable est présente dans la boucle Sf17. Cette hélice prend naissance à partir du résidu d'Ala11 et se termine au résidu d'Ala17. Les extrémités de la boucle sont flexibles. Ce caractère flexible du peptide est mis en évidence par le faible nombre de contacts NOE entre les résidus des extrémités.



Figure 29. Structure tertiaire de Sf17 boucle.

# Différences de déplacements chimiques des protons $\alpha$ entre Sf17 boucle dans l'eau et le TFE 30%, avec Sf17

Les différences de déplacements chimiques des protons  $\alpha$  entre la boucle Sf17 dans l'eau et le TFE 30 % avec Sf17 ont été calculés. Pour la plupart des résidus, les différences sont inférieures à 0,2 ppm (Figure 30). Les seuls résidus ayant des déplacements chimiques supérieurs à 0,2 ppm sont les résidus situés aux extrémités, à savoir les résidus de cystéines.



Figure 30. Diagrammes représentant les différences de déplacements chimiques par résidus, entre le peptide Sf17 boucle et le peptide Sf17, dans (a)  $H_2O/TFE$  (70/30),  $H_2O/D_2O$  (90/10).

Ainsi Sf17 boucle conserve une structure proche de celle de la région comprise entre les cystéines 25 et 42 du peptide Sf17.

# Conclusion

Sf17 boucle et Sf17 sans boucle conservent les éléments de structure secondaire caractéristiques de la toxine Sf17, à savoir une boucle susceptible de se structurer en hélice  $\alpha$  et un feuillet  $\beta$  antiparallèle.

## 2. 4. 4. Conclusion

Dans le soucis de comprendre le mécanisme d'action des toxines de Segestria florentina et de connaître les éléments essentiels à l'origine de la sélectivité de Sf17 pour les canaux calciques de type N-, trois hybrides de Sf17 ont été synthétisés et repliés. Chaque hybride est capable de se replier, et adopte les mêmes éléments de structure secondaire que Sf17. Les tests biologiques de ces toxines peuvent donc être réalisés.

Avec le polypeptide Sf17 hybride nous espérons démontrer que les deux éléments: le motif "RGR" ou "KGK", et le segment hydrophobe, sont impliqués dans l'activité, et plus particulièrement dans la sélectivité des toxines. Si notre hypothèse est correcte, alors le peptide Sf17 hybride devrait agir sur les canaux de type P-.

L'activité des deux peptides tronqués, Sf17 sans boucle et Sf17, devraient nous renseigner sur le rôle des deux éléments supposés importants pour l'activité et sur leur "interdépendance". Il est probable que le peptide Sf17 sans boucle maintienne une affinité pour les canaux calciques de type N-, sans bloquer le canal. Dans ce cas le motif "KGK" jouerait un rôle important dans l'interaction avec le canal. Afin de confirmer le rôle du motif "KGK" ou "RGR" dans l'interaction, il serait intéressant de synthétiser un analogue de ces toxines, dans lequel le motif basique "KGK" ou "RGR" serait muté en un motif acide "EGE".

Quant au peptide Sf17 boucle, il devrait soit perdre complétement l'activité inhibitrice, soit conserver une activité résiduelle sur les canaux de type N-, mais perdre une grande partie de son affinité.

Cependant, pour le moment nous ne pouvons que suggérer certaines idées sur le mécanisme d'action des toxines d'araignées, étant donné que les tests pharmacologiques n'ont pas pu être réalisés.

## 2. 4. 5. Partie expérimentale

### 2. 4. 5. 1. synthèses peptidiques des analogues de Sf17

# a. synthèses peptidiques

Matériels

L'agent de couplage

- HBTU: 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate (Propeptide)

Les solvants et réactifs

- DMF (Carlo Erba)

- NMP (SDS)

- DCM (Acros)

- TFA (Acros), Anhydride acétique (Acros), DiEA (SDS)

- scavengers: p-crésol, p-thiocrésol, DMS (Aldrich)

<u>La résine</u>

Boc-Arg(Tos)PAM (Applied Biosystems) Charge : 0,60 mmol/g

Les groupements protecteurs des chaînes latérales

Boc-Gly-OH	Boc-Phe-OH	Boc-Gln(Trt)-OH
Boc-Ala-OH	Boc-Met(O)-OH	Boc-Asp(OcHex)-OH
Boc-Val-OH	Boc-Thr(Bzl)-OH	Boc-Glu(OcHex)-OH
Boc-Leu-OH	Boc-Tyr(Br-Z)-OH	Boc-His(Bom)-OH
Boc-Ile-OH	Boc-Cys(MeBzl)-OH	Boc-Lys(Cl-Z)-OH
Boc-Pro-OH	Boc-Asn(Trt)-OH	Boc-Arg(Tos)-OH

• Méthodes

Elongation de la chaîne polypeptidique

Les polypeptides Sf17 hybride, Sf17 boucle et Sf17 sans boucle ont été synthétisés sur un synthétiseur automatique modèle 430A (Applied Biosystem Inc). L'élongation des chaînes polypeptidiques a été réalisée sur 0,25 mmol de résine Boc-Arg(Tos)PAM. Une procédure standard de la stratégie Boc/benzyl a été utilisée (programme de double couplage en présence d'HBTU, neutralisation *in situ* et "capping").

Coupure de la liaison peptide-résine et déprotection des chaînes latérales

Afin de réduire les méthionines sulfoxides incorporées dans les synthèses, la procédure classique de coupure "high" HF est précédée d'une procédure "low" HF. Les coupures sont réalisées sur 1 g de résine.

-"low" HF

1 g de résine est traité par 2,5 ml d'HF anhydre en présence de:

- 0,75 g de *p*-crésol,

- 0,25 g de *p*-thiocrésol,

- 6,5 ml de DMS.

La réaction est menée à 0°C sous agitation pendant 3 heures.

Après évaporation de l'HF, les *scavengers* (pièges à carbocations) résiduels et les produits secondaires sont extraits par l'éther diéthylique, et séparés de la résine par filtration. La résine est lavée abondamment par l'éther diéthylique et séchée, avant d'être chargée de nouveau dans le réacteur pour subir le traitement "high" HF.

### -"High" HF

La résine est traitée par 10 ml d'HF anhydre en présence de:

- 0,5 g de *p*-crésol,

- 0,5 g de *p*-thiocrésol

La réaction est maintenue à 0°C, sous agitation. Au bout de 2 heures, l'HF anhydre est évaporé.

Le peptide totalement déprotégé est précipité dans 10 ml d'ether diéthylique. Les produits secondaires, et les *scavengers*, solubles dans l'éther, sont éliminés par filtration. Le peptide lavé et séché est dissous par 10 ml de TFA pur et immédiatement précipité dans 200 ml d'éther diéthylique. Le peptide est récupéré par centrifugation.

### Purification des peptides bruts

Chaque produit brut ainsi obtenu, est systématiquement redissous dans une solution de GuCl 6 M contenant 10 mg/ml de DTT et purifié par HPLC en phase inverse. Une
chromatographie préparative sur une colonne C18 Nucleosil (22 x 500 mm, 5  $\mu$ m, 300 Å) permet d'éliminer les produits secondaires susceptibles de perturber le bon repliement des polypeptides. Le gradient utilisé est: de 0 à 100 % de tampon B en 90 min avec un débit de 2 ml/min. Le tampon A est constitué de: 0,05 % de TFA dans l'eau, et le tampon B de: 80 % de CH<sub>3</sub>CN et 0,045 % de TFA dans H<sub>2</sub>O.

#### b. Repliement de Sf17 hybride, Sf17 boucle et Sf17 sans boucle.

Les polypeptides linéaires ont été oxydés dans un tampon Tris/HCl 0,2 M à pH 8,5 à une concentration finale de  $2.10^{-5}$  M. Le repliement de Sf17 boucle a nécessité l'ajout de 30% de DMF, tandis qu'un couple *rédox* a été ajouté dans le cas des polypeptides Sf17 hybride et Sf17 sans boucle:

- Sf17 hybride: GSH/GSSG, 2 mM/4 mM

- Sf17 sans boucle: cystéine/cystine, 2 mM/8 mM.

Tous les polypeptides ont été repliés à température ambiante pendant une nuit.

Le dessalage des peptides repliés a été réalisé par HPLC en phase inverse. La solution contenant le peptide oxydée a été au préalable acidifiée avec du TFA pur jusqu'à pH 3,0, puis filtrée à travers un filtre 0,45  $\mu$ m. Le dessalage a été réalisé sur une colonne C18 Vydac (22 x 500 mm, 10  $\mu$ m, 300 Å). Le gradient utilisé était: 0 à 80 % de tampon B en 90 min, avec un débit de 5 ml/min.

Après lyophilisation, les purifications finales ont été menées selon le cas, sur une colonne C18 Nucleosil ou C18 Vydac (10 mm x 500), en utilisant un gradient adapté à chaque peptide.

## 2. 4. 5. 2. Caractérisation physico-chimique des analogues synthétiques de Sf17.

#### a.Méthodes - Généralités

#### Analyse de la composition en acides aminés

En vue d'une analyse d'acides aminés, les peptides synthétiques subissent une hydrolyse acide totale à 110°C pendant 24 heures en milieu HCL 6 N, sous vide en présence de phénol. Le phénol sert à protéger les tyrosines, les sérines et les thréonines de l'oxydation.

L'analyse est effectuée sur un analyseur d'acides aminés Beckman modèle 6300. Les acides aminés de l'hydrolysat sont séparés sur colonne échangeuse de cations puis dosés par colorimétrie après réaction avec la ninhydrine. Les pics obtenus sont identifiés par leur temps d'élution par rapport à un mélange standard. Un étalon interne, la Norleucine ajoutée en quantité connue, permet de vérifier la quantité de l'hydrolysat injecté sur la colonne.

**Remarque:** l'analyse d'acides aminés est également utilisée pour quantifier les peptides dans un échantillon, pour les tests pharmacologiques et électrophysiologiques.

#### Evaluation du degré de pureté des polypeptides

• Chromatographie analytique en phase inverse

La chromatographie en phase inverse permet de séparer les peptides en fonction de leur hydrophobicité. Plusieurs types de colonne et différents gradients ont été utilisés pour vérifier la pureté finale des peptides.

• Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire à pH acide permet de séparer les peptides selon leur charge. Cette méthode de séparation est donc une méthode complémentaire à celle de la chromatographie analytique en phase inverse. Ainsi, les peptides qui coéluent en chromatographie en phase inverse peuvent être séparés par électrophorèse capillaire.

L'appareil d'électrophorèse capillaire utilisé est le modèle 270A-HT (Applied Biosystems). La migration électrophorétique se fait dans un tampon citrate de sodium 20 mM à pH 2,5, sous une tension de 25 kV à 30°C. Les constituants migrent du pôle positif vers le pôle négatif pendant 10 min et sont détectés à 200 nm.

#### Détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse

• Spectrométrie de masse mode désorption de plasma (PDMS)

Le spectromètre de masse est de type Bio Ion 20. La source est couplée à un analyseur à temps de vol (TOF).

La désorption des molécules se produit grâce à l'impact des produits de fission de l'ion Californium <sup>252</sup>Cf sur une cible: *foil* de Mylar. Cette cible se compose d'une fine lamelle d'aluminium en forme de pastille d'1 cm de diamètre, montée sur nylon. Le dépot de 30  $\mu$ l d'une solution de nitrocellulose (25 mg/ml) permet d'adsorber les peptides à analyser. L'échantillon est finalement déposé, puis analysé. Les spectres sont accumulés pendant 10<sup>6</sup> événements de fission d'une source Californium 252 qui se décompose en Technicium 106 et en Baryum 142.

• Spectrométrie de masse mode électrospray (ES-MS)

Les spectres de masse en mode électrospray ont été effectués dans le laboratoire de spectrométrie de masse de la Faculté de Médecine de Lille, par un spectromètre de type Api I de la société Perkin Elmer (Atmospheric pressure ionisation).

La source est reliée à un analyseur de type quadrupôle. L'échantillon est repris dans une solution d'acétonitrile 20%, acide formique à 0,1% dans l'eau, puis pulvérisé sous forme de *très fines gouttelettes* chargées positivement ou négativement selon le mode de détection choisi. Le long de leur parcours dans la chambre d'ionisation, les gouttelettes subissent l'évaporation à 50°C du solvant qui les constituent (acétonitrile). Finalement, les gouttelettes explosent du fait du rapprochement des charges de même signe, et libèrent des molécules multi-chargées.

L'acquisition et l'intégration des données sont réalisées grâce au logiciel MAC SPEC.

#### b. Résultats

Tableau 5: Composition en acides aminés et masses moléculaires des analogues Sf17 hybride, Sf17 sans boucle
et Sf17 boucle. Les résultats sont exprimés en moles de résidus par mole de protéine. Les valeurs entre
parenthèses représentent le nombre de résidus de la séquence.

acide aminé	Sf17 hybride	Sf17 sans boucle	Sf17 boucle
Asx	3,9 (4)	5,1 (5)	Х
Thr	х	0,9 (1)	х
Ser	3,15 (3)	2,5 (3)	1,4 (2)
Glx	2,87 (2)	0,9 (1)	1,1 (1)
Pro	2,2 (2)	1,2 (1)	1,9 (2)
Gly	6,8 (7)	5,4 (5)	3,1 (3)
Ala	3,1 (3)	х	3 (3)
Cys	5,5 (8)	5,6 (8)	0,8 (2)
Val	0,75 (1)	0,8 (1)	х
Met	2,6 (3)	1,5 (2)	1,5 (2)
Ile	1 (1)	1,3 (1)	1,8 (2)
Leu	5,15 (5)	0,9 (1)	2,1 (2)
Tyr	1,2 (1)	х	1 (1)
Phe	х	х	х
His	0,9 (1)	0,9 (1)	х
Lys	1,6 (2)	3,5 (4)	х
Arg	3,1 (3)	1,1 (1)	1,9 (2)
total	46	35	22
masse calculée	4815,7	3674,3	2293,8
masse observée	4815,6	3674,5	2294,5

Tous les polypeptides analogues à Sf17 synthétisés, ont un degré de pureté supérieur ou égal à 99 %. Le contrôle de pureté du polypeptide Sf17 hybride est présenté dans la figure 31.



Figure 31. Contrôle de pureté de Sf17 hybride: (a) Chromatographie analytique de Sf17 hybride. Colonne C18 Nucleosil (4,6 x 250 mm) gradient: 0 à 80 % d'acétonitrile en 40 min à 1 ml/min. (b) Electrophorèse capillaire en tampon citrate 20 mM à pH 2,5. (c) Spectre de masse en ES-MS.

Les spectres RMN protons ont été obtenus par le spectromètre Bruker DMX 600 équipé d'une sonde TXI 5 mm triple résonance gradient z, à la température de 30°C. Les données RMN ont été traitées à l'aide du logiciel Xwin-NMR 1.2 sur une station Silicon Graphics R4000 et du logiciel SNARF 0.8.9 sur une station Silicon Graphics R10000. Le Tétraméthylsilyl-propionate de sodium a été utilisé comme composé de référence pour les déplacements chimiques. L'attribution séquentielle a été réalisée selon la méthode développée par Wüthrich pour les petites protéines (Wüthrich, 1986).

Le logiciel X-PLOR version 3.1 a été utilisé pour déterminer des structures moléculaires à partir d'une estimation de distances interprotons issues des expériences RMN en solution, des mesures de constantes de couplage et d'autres informations comme les liaisons hydrogènes. Les structures générées par X-PLOR et acceptées (aucune violation des contraintes NOE supérieure à 0,2 Å et des angles dihèdres supérieure à 5°) ont été soumises à une procédure de minimisation d'énergie (logiciels MSI) et dans le module DISCOVER utilisant le champ de force AMBER. Tous les calculs pour les logiciels X-PLOR, DISCOVER et PROCHECK (Laskowski et al., 1993) ont été effectués sur une station Silicon Graphics O2 R5000. L'analyse et la comparaison visuelle ont été effectuées avec le module INSIGHT II du "package" MSI.

• Préparation des échantillons

#### - Sf17 sans boucle :

1,8 mg de peptide a été dissout dans 0,26  $\mu$ l d'un mélange H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (90/10), soit une concentration de 1,88 mM, pH 3,09.

- <u>Sf17 boucle</u> : deux échantillons ont été préparés

\* 1 mg de peptide a été dissout dans 500  $\mu$ l d'un mélange H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (90/10), soit une concentration de 0,872 mM, pH 3,06.

\* 1,25 mg de peptide a été dissout dans 500 ml d'un mélange  $H_2O/TFE$  (70/30), soit ne concentration de 1,09 mM, pH 3,06.

#### CHAPITRE 3.

Mise en évidence de la présence de canaux calciques mapacalcine sensible dans le cerveau de rat.

Mise au point de la purification du récepteur de la mapacalcine.

#### 3. 1. Introduction

Récemment, une petite protéine nommée mapacalcine, capable de bloquer spécifiquement un canal calcique sur les myocytes d'intestins de souris, a été extraite de l'éponge de mer *Cliona vastifica* (Morel et al., 1997). Ce canal calcique, sensible à la mapacalcine s'avère insensible aux antagonistes tels que, les dihydropyridines, l'ω-CTx GVIA, l'ω-CTx MVIIC et l'ω-Aga IVA, connus pour bloquer spécifiquement les différents sous-types de canaux calciques. D'autre part, les études électrophysiologiques ont montré que ce canal possédait des propriétés biophysiques distinctes de celles des autres canaux calciques, à savoir les canaux de type L-, T-, N-, P-, Q- et R-. Ces résultats suggèrent donc, l'existence d'un nouveau type ou sous-type de canal calcique. L'utilisation d'un dérivé marqué à l'iode radioactif de la mapacalcine, a permis de déterminer une constante d'affinité de 0,8 nM sur les membranes d'intestins de souris. Les études de fixation de la mapacalcine ont montré qu'elle se liait spécifiquement à un récepteur de haute affinité. Sa liaison est saturable et difficilement réversible. Ces résultats démontrent qu'il existe bien un récepteur spécifique de la mapacalcine sur les membranes d'intestins de souris (Vidalenc et al, 1998).

A la différence des autres antagonistes peptidiques isolés d'animaux venimeux, la mapacalcine est une petite protéine homodimérique de 19 kDa composée de deux chaînes homologues reliées par des ponts disulfure. Chaque chaîne comporte 89 résidus d'acides aminés dont 9 résidus de cystéine (Figure 1).

ı I	CNC	s Q W	тs	v	10 GS	A	GL	15 Y Y	ΤI	I K	20 A	D S	5 м	( C	25 V [	2 1	н	30 Y T D	G F	35 IQ1	e s	CQ	40 GL	Q V	45 I.G.P	C N	50 RY
Q	N.G.P	55 R D	FV	A	60 C Q	т	s g	65 GS	G	н р	70 I	Сı	Q	S	75 T 1	٩G	5 N I	80 I E L	C A	85 NC	ΥC	8 P Q	9				

Fig. 1. Séquence primaire d'une chaîne polypeptidique de la mapacalcine.

L'activité inhibitrice de la mapacalcine sur des courants calciques a, dans un premier temps, été décrite sur les myocites d'intestin de souris. Cependant, à l'aide de la mapacalcine marquée à l'iode radioactif ([<sup>125</sup>I]-mapacalcine), il a été possible de démontrer la présence de récepteurs sensibles à cette toxine dans d'autres tissus. C'est pourquoi nous avons cherché à détecter la présence de canaux calciques sensibles à la mapacalcine dans le cerveau de rat.

D'autre part, des études préalables ont montré la présence des canaux calciques sensibles à la mapacalcine en grande quantité sur des membranes de foie de rats. Le récepteur de la mapacalcine sur ces membranes de foie de rats a pu être solubilisé, ceci permettant d'envisager sa purification. Une approche de la purification du récepteur de la mapacalcine par chromatographie d'affinité a été entreprise.

### 3. 2. Mise en évidence de la présence de récepteurs de la mapacalcine dans le cerveau de rats.

Après marquage à l'iode radioactif, la mapacalcine conserve son activité biologique et possède une très bonne affinité pour son récepteur localisé sur les membranes d'intestin de souris (Kd = 0.8 nM) (Vidalenc et al., 1998). Ce dérivé marqué représente un excellent outil pharmacologique pour détecter la présence de canaux calciques sensibles à la mapacalcine dans d'autres tissus, et ainsi déterminer la fonction exacte de ce nouveau canal calcique.

L'utilisation de la mapacalcine marquée à l'iode a permis de détecter la présence de canaux calciques sensibles à la mapacalcine dans le cerveau de rat. Sa constante de dissociation est similaire à celle qu'elle possède pour les membranes d'intestin de souris. (Kd = de 0,35 nM). La cartographie des récepteurs de la mapacalcine dans le cerveau de rat a été abordée. La distribution des récepteurs de la mapacalcine est relativement homogène, on trouve un marquage sur les cellules nerveuses et sur les cellules gliales. Toutefois, une plus forte densité de récepteurs de la mapacalcine a été observée sur le plexus choroïde.

L'article a été soumis au périodique, *Brain research*:

### «Distribution of mapacalcine receptors in the central nervous system of rat using the <sup>125</sup>I-labeled mapacalcine derivative.»

Mourre C., Mokrzycki N., Richeux F., Creppy E. E., Neuilly G. and Hugues M.

### Distribution of mapacalcine receptors in the central nervous system of rat using the <sup>125</sup>I-labeled mapacalcine derivative.

Mourre C.<sup>•</sup>, Mokrzycki N.<sup>§</sup>, Neuilly, G.<sup>n</sup>, Richeux F.<sup>†</sup>, Creppy E. E.<sup>†</sup>, and Hugues M.<sup>n</sup>

<sup>n</sup>: Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Vasculaire, CNRS ESA 5017, Faculté de Pharmacie, Université Victor Segalen (Bordeaux 2), 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex France.

<sup>1</sup>: Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Appliquée, Université Victor Segalen (Bordeaux 2), 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex France.

<sup>§</sup>: Service de Chimie des Biomolecules, I.B.L., Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette 59019 Lille.

• <sup>1</sup> Laboratoire de Neurobiologie des Comportements, CNRS URA 372, Université Aix/ Marseille 1, Traverse Ch. Susini, 13388 Marseille.

Manuscript : 18 Pages, 2 figures, 1 table.

**Corresponding author : Hugues M. :** Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Vasculaire, CNRS ESA 5017, Faculté de Pharmacie, Université Victor Segalen (Bordeaux 2), 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex France.

(: (33) 5 57 57 12 72;

⊇ : (33) 5 57 57 12 42.

Email : michel.hugues@esa5017.u-bordeaux2.fr

Acknowledgements : This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale, the Pôle Médicament Aquitaine, and the Region Aquitaine.

#### Abstract

Mapacalcine is a dimeric protein of Mr 19041 extracted from the marine sponge Cliona vastifica. Electrophysiological and pharmacological approaches have demonstrated that mapacalcine was blocking a calcium channel different from N-, L-, P-, T-, or Q- type calcium channels on mouse intestinal smooth muscle. Recently a <sup>125</sup>I labeled derivative of mapacalcine has been synthesized and characterized as a tool usable as a probe to investigate mapacalcine receptors. In this paper we use <sup>125</sup>I-mapacalcine to study the mapping of its receptors in the rat brain. Data obtained show a rather homogeneous labeling of the brain. Our experiments suggest that mapacalcine receptors are present on neuronal and glial cells. Interestingly, choroidal plexus demonstrates a high density of mapacalcine receptors. These data would suggest that mapacalcine sensitive calcium channels could be involved in the control of calcium homeostasis of the cerebrospinal fluid.

Theme : Neurotransmitters, Modulators and Receptors

**Topic** : Regional Localization of Receptors and Transmitters

Key Words : calcium channels, toxin, brain, glial cells, choroidal plexus, neurons,

mapacalcine, binding, autoradiography, receptors, mapping, synaptic membranes.

#### 1. Introduction

Calcium is extremely important in the regulation of cerebral structure and function. Intracellular  $Ca^{2+}$  levels regulate many cellular processes including membrane excitability, transmitters release, gene expression, neuronal growth and degeneration. The principal way for the entry of  $Ca^{2+}$  in neuronal and glial cells are voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels, for review see [18, 13, 14].

All the types (or sub-types) of calcium channels are present in brain where they are involved in specific functions through their cellular location and biophysical characteristics [17, 21]. Specific ligands and toxins isolated from diverse venoms are useful tools for probing the structural differences between these channels and evaluating their physiological contribution to cell activity. We have recently reported the purification and the characterization of a small protein, the mapacalcine, isolated from the marine sponge *Cliona vastifica*. Mapacalcine has been demonstrated to selectively block a "non L-type" calcium channel coexisting with a typical L-type calcium channel on mice intestinal myocites [19]. Mapacalcine was also ineffective on T-type calcium channels presents on rat portal vein myocites. A radiolabeled derivative of mapacalcine was used to demonstrate the existence of specific receptors for mapacalcine on mice intestinal membranes. Binding of mapacalcine was of high affinity, specific, saturable, but hardly reversible as predicted by functional assays. N-, L-, P- and Q-types Ca<sup>2+</sup> channels ligands did not compete with mapacalcine on its receptor [26].

Here we used the labeled derivative of mapacalcine to detect the presence of its receptors in brain membrane preparations, C6 astrocyte cell line and to study the autoradiographic distribution of binding sites of mapacalcine in rat brain. Our data show an almost homogeneous distribution of the mapacalcine receptors in all the brain structures and their high concentration on choroidal plexus. Binding studies performed on C6 astrocytes cells showed that mapacalcine receptors were also present on the glial cells. These data would suggest the involvement of the mapacalcine receptors in maintaining a chemical stability of the cerebrospinal fluid (CSF) secreted by choroid plexus.

#### 2. Materials and Methods

Mapacalcine ( $M_r = 19041$ ) purified from *Cliona vastifica* marine sponge was obtained from Latoxan (Rosan France). [<sup>125</sup>I]-Na (2200Ci/mmol) was obtained from NEN (Bruxelles). Iodo Beads (N- chlorobenzene sulfonamide) were purchased from Pierce (Interchim, France), fetal bovine serum was from Flobio (Courbevoie, France). DMEM Streptomycin, penicillin, glutamine were from GIBCO.

#### Iodination of mapacalcine at high specific radioactivity

Radiolabeled mapacalcine was obtained and used in binding experiments on rat brain membranes and C6 astrocytes cells membranes as previously described [26].

#### Membranes preparation

#### Total brain membranes preparation

Male Wistar rats (160-300 g) were killed by decapitation. The brains were removed and rinsed with an ice-cold buffer containing : 20 mM Hepes at pH 7.0, 140 mM NaCl and 0.1 mM PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride). The brains were homogenized in a ten fold volume (v/w) of the same buffer with a polytron homogenizer during 30 s. The homogenate was centrifuged at 4500 x g for 7 min. The supernatant was centrifuged 20000 x g for 30 min (4°C) and the pellets obtained were suspended and gently stirred at 4°C during one hour in an hypotonic buffer containing : 5 mM Hepes at pH 7.0 . The pellets were then spun down at 140 000 x g for 45 min, suspended in the hypotonic buffer and homogenized. Aliquots were frozen and kept at -80° C until use. Proteins were measured with Bio-Rad proteins assay reagent using lysozyme as standard [5].

#### Synaptic membranes preparation

Highly enriched plasma membranes fractions were obtained from rat brains using a preparation previously described by Jones and Matus [12]. Briefly, 6 rat brains (without cerebellum) were homogenized with a Potter homogenizer in 9 volume of 10 % sucrose, the homogenate was centrifuged at 800 x g during 20 min., the supernatant was then centrifuged at 9000 x g during 20 min. The pellet was resuspended in hypotonic solution at 4°C (5 mM Tris/HCl at pH 8.1) for 30 min and homogenized again. The lysed fraction was mixed with 48 % sucrose to obtain a final sucrose concentration of 34%. The 34% mixture was covered with two layers of 28.5 % and 10 % sucrose respectively. The gradients were centrifuged on a Beckman SW 28 rotor at 60000 x g for 110 min. and the fraction corresponding to the synaptic membranes was located between the 34% and 28.5% layers. Synaptic membranes were then collected, resuspended in 5mM Tris/HCl at pH 8.1, and centrifuged at 140000 x g for 60 min. The membranes were kept dry at -80° C until use.

#### Cell membranes preparation from C6 astrocytes cell line

The C6 astrocytes cells [2, 3] were obtained from human cerebral tumor. The rat tumoral cells were obtained by injection of N-nitrosomethyl-urea. These cells were characterized as glial cells because they contained the same quantity of the proteins S-100 than in the rat brain cells. Moreover, the presence of glial fibrillary acidic protein (GFAp) in most of the preparations of C6 cells and the presence of a strong glutamine-synthetase activity represented two other specific features of typical astrocytes cells. The C6 cell line is considered as a glial cell line very close to astrocytes cells. The C6 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and L-Glutamine 2 mM, streptomycin 100µg/ml, penicillin 100µg/ml. The cells were maintained in culture at 37°C in an incubator under controlled atmosphere (95%  $O_2$ , 5%  $CO_2$ ). The medium was changed every 3 days until cells reached confluency, they were then used for binding experiments. Cells were scrapped off culture dishes in a buffer containing : NaCl 140 mM, Hepes 20 mM, at pH 7.0. They were then centrifuged at 20000 x g during 10 min at 4° C. The pellets were resuspended in the buffer and kept at -80° C until use.

#### **Binding experiments**

Assays were conducted in a total volume of 1 ml in the standard incubation buffer (mM) : 50 Tris/HCl at pH 7.4, 130 NaCl, 5.6 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 0.24 MgCl<sub>2</sub>, 11 glucose and 0.2 % bovine serum albumin. Duplicate aliquots of membrane (0.2 mg/ml) were incubated for 120 min at 4°C with various concentrations of [<sup>125</sup>I]-mapacalcine (2200 Ci/mmol). Non specific binding was determined in parallel experiments conducted in presence of 1  $\mu$ M native mapacalcine. Specific binding was obtained by subtracting non-specific binding from the total binding. After incubation, 400  $\mu$ l duplicate aliquots were filtered, using a cell harvester (Millipore). over glass fibber filters (Whatman GF/C) pre-soaked in 10 mM Tris/HCl at pH 7.4 for 60 min. Filters were rapidly washed twice with 5 ml of the same buffer. The radioactivity retained by the filters was then counted in a Packard  $\gamma$  counter.

#### Kinetic binding studies

Association kinetics were performed in standard binding buffer at 4°C to assess equilibrium state of toxin binding to membranes. Association was initiated by adding [<sup>125</sup>I]-mapacalcine (0.01nM) to a constant concentration membranes (0.2 mg/ml). Bound mapacalcine was measured at different times by filtration of 400µl aliquots according to the filtration technique described above. Non specific binding was determined in parallel experiments in presence of 1 µM native mapacalcine.

#### Equilibrium binding experiments

Brain or cell membranes (0.2 mg/ml) were incubated with increasing concentrations of  $[^{125}I]$ mapacalcine for 120 min at 4°C. Duplicate aliquots (400µl) were then filtered and the bound radioactivity was measured as described above.

#### Competition experiments

Brains or C6 cells membranes (0.2 mg/ml) were incubated with increasing concentrations of unlabeled mapacalcine for 120 min at 4°C in the presence of 0.01nM [<sup>125</sup>I]-mapacalcine. The amount of labeled mapacalcine remaining bound to the membranes was estimated by the filtration technique described above.

#### Autoradiographic Procedure

#### Animals and tissue preparation

Male Sprague-Dawleys rats weighing 250-300g were used in all experiments. They were kept at constant room temperature under standardized 12/12 h light/dark cycle. They were fed *ad libitum*. Anaesthetized rats were sacrificed by decapitation and their brains were removed immediately and frozen in isopentane at  $-40^{\circ}$ C. Cryostat sections 25 µm thick were collected and thaw-mounted onto cold chrom-alum coated glass slides and stored at - 45° C until use.

#### [<sup>125</sup> I] mapacalcine binding on brain sections

The brain sections were incubated with 0.02 nM of [ $^{125}$ I]-mapacalcine in a 100 mM Tris/HCl buffer at pH 7.4 containing 0.1% bovine serum albumin. The non-specific binding component was measured by adding a large excess of native mapacalcine (0.5  $\mu$ M) 30 min before adding the labeled mapacalcine. In equilibrium binding studies, the incubation were performed during 120 min at 4°C. At the end of this period, the slides were washed 4 times (each washing lasting 1 min) in the buffer then rinsed once (5sec) in water. The slides were dried with stream cold air and exposed to Kodak BioMax MR film during 6 days at room temperature. Then, the films were processed in Kodak industrex developer at room temperature for 2 min, fixed and washed. The autoradiograms were analyzed and quantified using a NIH image analysis system. Receptor densities were expressed in fmol/mg of protein. A mean value for each nucleus was calculated from 6-8 bilateral measurements in 3 animals. The specific binding value was determined as the difference between total and non specific binding components for a given area. Rat brain regions were identified and named using the rat brain atlas of Paxinos and Watson [22].

#### Data Analysis

The results are expressed as means  $\pm$  standard error. The apparent dissociation constant (K<sub>d</sub>) and maximal number of binding sites (B<sub>max</sub>) for [<sup>125</sup>I]-mapacalcine were estimated by Scatchard analysis of the saturation data. The curves obtained from saturation and competition studies were analyzed by non linear least-squares fitting program according to models involving one or two binding sites. Linear plots were analyzed by a linear least-squares fitting program.

#### 3. Results

#### Kinetic binding studies

Association kinetics for the specific high affinity binding of  $[^{125}I]$ -mapacalcine on C6 cell membranes and brains membranes (0.2 mg/ml) were determined as function of the incubation time. Association reached equilibrium after 120 min at 4° C in the presence of 0.01nM  $[^{125}I]$ -mapacalcine. Non specific binding, obtained in the presence of 1  $\mu$ M unlabeled mapacalcine was constant and represented roughly 20 % of the total binding (not shown).

#### Equilibrium binding of [<sup>125</sup>I]-mapacalcine on brain preparations and cell membranes.

Figure 1 shows the data obtained from binding experiment in which increasing concentrations of [<sup>125</sup>I]-mapacalcine (0.003 to 2 nM) were incubated with brain membranes (Fig 1A) synaptic membranes (not shown) or C6 cell membranes (Fig 1B) during 120 min at 4°C, either in the presence (non specific binding) or in the absence (total binding) of a large excess (1µM) of unlabeled mapacalcine. Specific binding of mapacalcine was saturable. Scatchard analysis of these data was linear, suggesting the presence of a single class of non interacting binding sites with a  $K_d = 0.35 \pm 0.02$  nM and  $B_{max} = 706 \pm 70$  fmol/mg (n = 5) for brain membranes,  $K_d = 0.98 \pm 0.1$  nM and  $B_{max} = 1258 \pm 125$  fmol/mg (n = 5) for synaptic membranes,  $K_d = 0.09$  nM (n = 6) and a  $B_{max}$  value of 470 ± 97 fmol/mg of protein (n = 6) for C6 cell membranes.

# Competition between $[^{125}I]$ -mapacalcine and mapacalcine on brain membranes, synaptic membranes and C6 cells

Increasing concentrations of unlabeled mapacalcine gradually inhibited [<sup>125</sup>I]-mapacalcine specific binding on total brain (Fig 1C), synaptic membranes (not shown) and C6 cell membranes (Fig 1D). The concentration of native toxin inducing 50% inhibition of [<sup>125</sup>I]-mapacalcine binding was  $K_{0.5} = 0.13 \pm 0.02$  nM (n=3) on brain membranes, 1.02 ± 0.16 nM

(n=4) on synaptic membranes and  $K_{0.5} = 0.13 \pm 0.01$  (n=4) on C6 cells. Since [<sup>125</sup>I]mapacalcine concentration used in these experiments (0.01nM) was ten fold lower than the value of the dissociation constant of the complex mapacalcine/receptor, determined by direct binding experiments, the values of IC<sub>50</sub> could then be considered as equivalent to the values of  $K_d$ .

#### Distribution of mapacalcine binding sites in rat brain

The concentration of [<sup>125</sup>I]-mapacalcine used in autoradiographic experiments was 0.02 nM to minimize the non specific binding. The non specific component (15% of total binding) was homogeneous in the different brain regions and no variation of the non-specific binding was detectable between the gray and the white matter. Fig 2 and Table 1 show that the distribution of mapacalcine binding sites was practically homogeneous in the rat brain with, nevertheless, a lower density in fiber tracts. For the gray matter and the white matter, the mean density of mapacalcine binding sites was 38.2 and 29.0 fmol/mg protein respectively. All brain regions exhibited values of mapacalcine binding within 15% of mean value for gray matter except for the cellular layer containing the purkinje cells and bergman glial cells. However a non nervous tissue, the choroid plexus, contained a very high level of mapacalcine receptors with 65.7 fmol/mg of sites on average. In autoradiograms, a black border around brain sections suggested the presence of mapacalcine binding sites in the pia mater (Fig 2).

#### 4. Discussion

The distribution of mapacalcine binding sites was practically homogeneous in the gray matter of rat brain. Moreover a high density of mapacalcine receptors was found in the choroid plexus. This distribution completely differ from those reported for L-type, N-type and P-type calcium channel mapping using dihydropyridines,  $\omega$ -conotoxin and  $\omega$ -agatoxin respectively [7, 10, 16, 11, 1]. The labeling pattern of these inhibitors was found to be heterogeneous in rat brain. The difference observed between the mapping of mapacalcine sites and of these calcium channel blockers inhibitors are in good agreement with our previous observations. Moreover, the regional expressions of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels also differ from the distribution of the mapacalcine binding sites. [6, 25, 23, 24, 15]. We have shown that mapacalcine receptors were not related to these types of calcium channels [19, 26]. Indeed pharmacological investigations involving competition experiments between [125I]-labeled mapacalcine and a variety of specific calcium channels inhibitors demonstrated that the binding site of mapacalcine was different from the binding site of N-, L-, P- or Q- types calcium channel ligands [26]. The densities of mapacalcine binding sites found in the autoradiograms are in good agreement with the mapacalcine binding capacity obtained for brain membranes preparations using labeled mapacalcine. However, the histological level of the autoradiograms does not indicate on what cellular type the mapacalcine receptors are present. The homogeneity of the labeling, except for the choroid plexus, strongly suggests that mapacalcine binding sites are not only present on neurons but also in glial cells, endothelial cells and/or arterial smooth muscle cells. The enrichment in mapacalcine receptors observed between total brain membrane preparations and enriched synaptic membrane preparations demonstrates that mapacalcine receptors must be present on nervous tissue. Moreover, binding data obtained on C6 astrocyte cell line also suggest that mapacalcine receptors are also present on glial cells. The structure containing the highest density of binding sites is the choroid plexus. The choroid plexus consists of capillary networks surrounded by specialized epithelium, it participates to the closely controlled environment for central neurons [8]. It is known that the choroidal cells reabsorb through an active transport mechanism, a wide variety of substances from of the CSF to the blood [9, 4]. This allows the remarkable stability of the concentration of cations such as  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  or  $Ca^{2+}$  independently from the changes of plasma concentrations of these ions [9]. Mapacalcine receptors have been shown to be associated with a calcium conductance on intestinal smooth muscle [19], it is hypothesized a possible role of these receptors in the central nervous in the control of calcium exchanges between cerebrospinal fluid and plasma, thus exerting a control of neuronal excitability by modulating the external concentration of calcium [20]. Further mapping of mapacalcine receptors on choroid plexus using a resolution at the cellular level should help to determine more precisely the role of these receptors.

In summary, due to its excellent affinity mapacalcine represents a valuable tool for future investigation of the mapacalcine receptor that could be related to a new category or sub type of  $Ca^{2+}$  channel. This probe may find utility being used in purification experiments of this  $Ca^{2+}$  channel through affinity chromatographic approaches leading to its functional role in neuronal, glial and choroidal cells. At present these receptors could be assigned the role of controlling ion concentration in the CSF.

#### References

- 1. Araki, T., Kato H., Shuto, K., Itoyama, Y., Age-related changes in [<sup>3</sup>H]nimodipine and [<sup>3</sup>H]rolipram binding in the rat brain, J. Pharm. Pharmacol., 49 (3), (1997), 310-314.
- 2. Benda, P., Davidson, R.L., Regulation of specific functions of glial cells in the somatic hybrids I. Control of S100 protein, J. Cell. Physiol., 78, (1971), 209-216.
- 3. Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., Sweet, W., Differentiated rat cell strain in tissue culture, Science, 161, (1968), 370-371.
- 4. Bradbury, M., The concept of a Blood Brain Barrier, (1979) Chichester, U.K. : Wiley.
- 5. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, Anal. Biochem. 72, (1976), 248-254.
- 6. Chin, H., Smith, M. A., Kim, H.L., Kim, H., Expression of dihydropyridine-sensitive brain calcium channels in the rat central nervous system, FEBS, 299 (1), (1992), 69-74.
- Cortès, R., Supavilai, P., Karobath, M., and Palacios, J.M., Calcium antagonist binding sites in the rat brain : quantitative autoradiographic mapping using the 1,4-dihydropyridines [3H] PN 200-110 and [3H] PY 100-068, J. Neural. Transmission, 60, (1984), 169-197.
- 8. Cseer, H.F., and Bundgaard, M., Blood brain interfaces in vertebrates : a comparative approach, Am. J. Physiol., 15, (1984), R277-R288.
- 9. Cserr, H.F., Physiology of the choroid plexus, Physiol. Rev., 51, (1971), 273-311.
- Dooley, D.J., Lickert, M., Lupp, A., Osswald, H., Distribution of [<sup>125</sup>I]omega-conotoxin GVIA and [<sup>3</sup>H]isradipine binding sites in the central nervous system of rats of different ages, Neurosci. Lett., 93 (2-3), 1988, 318-23.
- Gohil, K., Bell, J.R., Ramachandran, J., Miljanich, G.P., Neuroanatomical distribution of receptors for a novel voltage-sensitive calcium antagonist SNX-230 (omaga-conopeptide MVIIC), Brain res., 653 (1-2), (1994), 258-66.
- 12. Jones, D.H., and Matus, A.I., Isolation of synaptic plasma membrane from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation, Biochem. Biophys. Acta, 356, (1974), 276-287.
- 13. Lin, Z., Harris, C., and Lipscombe, D., The molecular identity of Ca<sup>++</sup> channel  $\alpha_1$ -subunits expressed in rat sympathetic neurons, J. Mol. Neurosci., 7, (1996), 257-267.
- 14. Lnenicka, G.A., Hong, S.J., Activity-dependent changes in voltage-dependent calcium currents and transmitter release, Mol. Neurobiol., 14(1-2), 1997, 37-66.
- 15. Ludwig, A., Flockerzi, V., Hofmann, F., Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain, J. Neurosci., 17(4), (1997), 1339-49.

- Mc. Intosh, J.M., Adams, M.E., Olivera, B.M., and Filloux, F., Autoradiographic localization of the binding of calcium channel antagonist, [<sup>125</sup>I]ω-agatoxin IIIA in brain, Brain Res., 594, (1992), 109-114.
- 17. Miljanich, G.P., Ramachandran J., Antagonists of neuronal calcium channels : structure, function, and therapeutic implications. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 35, (1995), 707-34
- Miller, R.J., Multiple calcium channels and neuronal functions, Science, 235, (1987), 46-52.
- 19. Morel, J.L., Drobecq, H., Sautière, P., Tartar, A., Mironneau, J., Qar, J., Lavie, J.L., and Hugues, M., Purification of a new dimeric protein from *Cliona vastifica* sponge, which specifically blocks a non L-type calcium channel in mouse myocites, Mol. Pharmacol., 51, (1997), 1042-1052.
- 20. Nicholson, C., Modulation of extracellular calcium and its functional implications, Federation Proc., 39, (1980), 1519-1523.
- 21. Nooney, J.M., Lambert, R.C., and Feltz A., Identifying neuronal non-L Ca<sup>2+</sup> channelsmore than stamp collecting ?, T.I.P.S., 18, (1997), 363-371.
- 22. Paxinos, G. and Watson, C., The rat brain in stereotaxic coordinates, (1986), Academic Press, New York.
- 23. Stea, A., Tomlison., W.J., Soong, T.W., Bourinet, E., Dubel, S;J., Vincent, S.R., Snutch, T.P., Localization and functional properties of a rat brain alpha 1a calcium channel reflect similarities to neuronal Q- and P-types channels, PNAS, 91 (22), (1994), 10576-80.
- 24. Talley, E.M., Cribbs, L.L., Lee, J.H., Daud, A., Peres-Reyes, E., Bayliss. D.A., Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels, J. Neurosci., 19 (6), (1999), 1895-911.
- 25. Tanaka O, Sakagami H, Kondo H Localization of mRNAs of voltage-dependent (Ca2+)channels: four subtypes of alpha1- and beta-subunits in developing and mature rat brain Mol. Brain. Res., 30 (1), (1995), 1-16.
- 26. Vidalenc, P., Morel, J.L., Mironneau, J., and Hugues, M., <sup>125</sup>I-labelled mapacalcine : a specific tool for pharmacological approach to a receptor associated with a new calcium channel on mouse intestinal membranes, Biochem. J., 331, (1998), 177-184.

#### Figure legends

**Fig 1** : **Binding of** <sup>125</sup>**I-mapacalcine :** Scatchard representation of direct binding experiments (insets) of <sup>125</sup>I-mapacalcine to total rat brain membranes (A) ; C6 cells (B). Competition curves obtained from binding experiments involving <sup>125</sup>I-mapacalcine and increasing concentrations of unlabeled mapacalcine on total brain membranes (C) and C6 cells (D).

Fig 2 : Distribution of mapacalcine binding sites in rat brain : Parasagital (TOP) and coronal sections were incubated with <sup>125</sup>I-mapacalcine (0.02 nM). In the autoradiograms the dark areas indicate the high grain densities, i.e. high binding sites densities. The non specific binding (NSB) was homogeneous in all the brain. Abbreviations : **Chp** : Choroid plexus ; **Cpu** : caudate putamen ; **Hip** : hippocampus ; **IC** : inferior colliculus ; **OB** : olfactory bulb ; **Pu** : Purkinje cells ; **SNC** : substantia nigra, pars compacta ; **SuG** : superior colliculus. Bar = 2mm.

#### TABLE 1

. .

Specific binding (fmol/mg protein)	Mean	±	S.E.M
Choroid plexus of the lateral ventricle	68,3	Ŧ	5,2
Choroid plexus of the 4th ventricle	63,2	Ŧ	2,8
Purkinie cell laver	51 2	+	40
Substancia nigra, compart part	433	 +-	26
Inferior colliculus	413	+	23
Pontine nuclei	40.6	+	20
Dentate ovrus inf	40.4	+	18
Posterior thalamic nuclei	40.4	+	1.5
Field CA3 of Ammon's horn	40.3	±	0.8
Vestibular nuclei	40,1	±	1.0
Field CA1 of Ammon's horn	40,0	±	2,3
Granular layer of the cerebellum	40,0	±	2,0
Septal nuclei	39,9	Ŧ	0,5
Subicullum	39,8	±	1,6
Superior colliculus	39,5	±	1,4
Parietal cortex	38,8	±	0,6
Cingulate cortex	38,7	±	1,8
Molecular layer of the cerebellum	37,7	±	0,5
Central (periaqueductal) gray	37,1	±	1,6
Anterior hypothalamic nuclei	37,1	±	1,3
Enthorinal cortex	36,6	±	1,0
Anterior olfactory nucleus	36,5	Ŧ	6,0
Amygdaloid nuclei	36,5	±	0,2
Occipital cortex	36,0	±	2,2
Anterior thalamic nuclei	35,9	±	0,5
Frontal cortex	35,8	Ŧ	1,5
Posterior hypothalamic nuclei	35,8	±	0,4
Lateral septal nucleus	34,3	±	1,9
Accumbens nucleus	34,2	#	0,8
Deep mesencephalic nucleus	33,9	±	0,6
Caudate putamen (striatum)	33,9	±	1,4
Substancia nigra, reticular part	33,8	±.	1,4
Pontine reticular nuclei	33,0	Ŧ	2,1
Anterior commissure	32,6	±	0,7
Corpus callosum	30,7	±	1,0
White matter of the cerebellum	23,7	±	2,1

Table I: Distribution of mapacalcine binding sites in the rat brain



FIGURE 2



#### 3. 3. Mise au point de la purification du récepteur de la mapacalcine.

#### 3. 3. 1. Introduction

La présence de récepteurs de la mapacalcine a été mise en évidence sur les membranes de foie de rats à l'aide du dérivé iodé de la toxine. Sur ces membranes, la mapacalcine fait competition à la [ $^{125}$ I]-mapacalcine avec une IC<sub>50</sub> de 1.12 nM. Parallèlement à ces travaux, des études préliminaires mettant en jeu des flux de calcium 45 ont suggéré que la mapacalcine était capable de protéger les cellules hépatocytaires de l'invasion calcique post-ischémique. Une des causes majeures d'échec de greffes d'organes est l'invasion des cellules par le calcium à la suite de l'hypoxie subie par le greffon au cours de la transplantation (Farber, 1981; Kurita et al., 1993). C'est pourquoi, la mapacalcine représente un outil très intéressant pour l'étude des mécanismes responsables de l'invasion calcique post-ischémique.

N'ayant pour le moment aucune donnée sur la structure moléculaire du récepteur de la mapacalcine, il reste à déterminer si ce récepteur est un canal calcique semblable aux canaux calciques voltage-dépendants connus, ou s'il s'agit d'une protéine associée à un canal calcique. Afin d'aborder le clonage moléculaire du récepteur sensible à la mapacalcine, la mise au point de la purification du récepteur a été réalisée à partir des membranes de foie de rats. La solubilisation du récepteur de la mapacalcine, en forte proportion dans ce tissu, a permis d'en entreprendre la purification.

Une approche de la purification du récepteur de la mapacalcine par chromatographie d'affinité est décrite dans cette partie. En obtenant un dérivé biotinylé de la mapacalcine conservant les propriétés biochimiques de la mapacalcine naturelle, il est possible d'envisager la purification du récepteur sur une colonne d'avidine monomérique couplée à la mapacalcine biotinylée (Hugues et al., 1992). Ainsi, afin de purifier le récepteur de la mapacalcine par chromatographie d'affinité, nous avons opté pour la fabrication d'une colonne à partir du système avidine monomérique/biotine. En effet, ce système nous permet de nous affranchir, du fait que le complexe mapacalcine/récepteur ne se dissocie quasiment pas, ce qui rend une colonne d'affinité classique inutilisable pour la purification du récepteur. Pour cela, nous avons donc marqué la mapacalcine par la biotine et vérifié ses propriétés de fixation sur son récepteur.

#### 3. 3. 2. Résultats et discussion

### 3. 3. 2. 1. Préparation d'un dérivé biotinylé de la mapacalcine conservant les propriétés biochimiques de la mapacalcine naturelle.

#### a. Introduction

La biotinylation consiste à fixer artificiellement la biotine sur un support quelconque (protéine, polysaccharide, acide nucléique) à l'aide d'un lien assez long pour garantir une certaine flexibilité (Bayer et wilchek, 1990). Les N-hydroxysuccinimide (NHS) esters de biotine ont été introduits par Becker *et al* en 1971 (Becker et al, 1971). Ce sont aujourd'hui des réactifs de biotinylation très utilisés en biochimie. Plusieurs types de NHS-esters de biotine existent et diffèrent selon leurs propriétés, et la longueur de leur bras espaceur. L'ester de Succinimidyl-6-(biotinamido) hexanoate, ou NHS-LC-LC-Biotine a été utilisé pour biotinyler la mapacalcine.

La principale cible des esters de NHS sont les amines primaires. Les amines primaires réagissent avec les NHS-esters de biotine par attaque nucléophile pour donner un produit biotinylé, le produit de dégradation de la réaction étant le N-hydroxysuccinimide (Figure 2). La modification par la biotine des peptides et des protéines se fait donc soit sur les groupes amines en  $\varepsilon$  des chaînes latérales des lysines, soit à l'extrémité N-terminale sur le groupe  $\alpha$ -amino.



Figure 2. Réaction entre un ester de NHS-biotine et une protéine

La mapacalcine possède deux sites de fixation potentiels de la biotine: la lysine en position 19 et l'extrémité N-terminale.

#### b. Mise au point du dérivé biotinylé de la mapacalcine

Afin de déterminer les conditions de *biotinylation* de la mapacalcine, certains paramètres ont du être optimisés. Dans une première approche, plusieurs pH ont été testés (pH 7,01; pH 7,96; pH 9.0, pH 10.2, pH 11,6), ainsi que différentes températures (0°C et température ambiante). Cependant, les premiers essais ont montré qu'un excès de NHS-LC-LC-Biotine, ne donnait aucun couplage mapacalcine / biotine. De ce fait, l'ajout d'un agent dénaturant a été nécessaire. En effet, seules les amines primaires accessibles à la surface de la protéine sont susceptibles d'agir avec le réactif NHS-LC-LC-Biotine. Le groupe  $\alpha$ -amino en position Nterminale est généralement enfoui à l'intérieur de la structure des protéines. D'autre part la mapacalcine ne possède qu'une seule lysine dans sa séquence, et bien que les résidus de lysines soient souvent exposés à la surface des protéines, il arrive que certains d'entre eux soient peu exposés. Du chlorure de guanidinium 6 M a donc été ajouté au milieu de réaction.

En tampon phosphate à pH 7.02, aucune modification de la mapacalcine n'a été observée. En effet, La réaction des amines primaires avec les NHS-esters est meilleure au dessus du pH neutre. Les cibles des NHS esters sont les formes déprotonées des amines primaires. Les pK des amines primaires sont souvent supérieurs à 9, avec un pK de la chaîne latérale d'une lysine, et de l' $\alpha$ -amino groupe N-terminal de l'isoleucine, respectivement de 10,3 et 9,76.

En tampon borate à pH 9,0, seule une petite proportion de la mapacalcine a été biotinylée au bout de 3 heures (Figure 3). A ce pH, l'hydrolyse des esters de NHS est en compétition avec la réaction d'acylation de la protéine. A pH 9,0, l'hydrolyse de l'esters de NHS est augmenté au dépend de la biotinylation.

Les meilleurs résultats de couplage ont été obtenus en tampon phosphate à pH 7,96 avec un excès 10 fois supérieur de EZ-Link<sup>TM</sup>NHS-LC-LC-Biotin. Dans cette expérience 50 % de la mapacalcine a été modifiée en 3 heures, à température ambiante. La prolongation du temps d'incubation n'augmente pas le rendement de la réaction (Figure 3).

133



Figure 3. Cinétique de biotinylation à pH 7.96 (a, b, c) et à pH 9.0 (d, e, f). L'apparition de la forme biotinylée de la mapacalcine a été suivie par chromatographie d'échange d'anions à pH 7,42. La fixation d'une molécule de biotine masque une charge positive et retarde l'élution de la mapacalcine dans le gradient de force ionique utilisé. colonne: Resource<sup>TM</sup> Q, tampon A: Tris 10 mM à pH 7,4, tampon B: Tris 10 mM, NaCl 1 M, pH 7,4, gradient d'élution: 0 à 25 % de B en 14 min, débit 2 ml/min.

Par la suite, le rendement de *biotinylation* a été amélioré en incubant préalablement la mapacalcine avec le GuCl 6 M pendant 15 min à 35°C. Dans ces conditions, 80 % de la mapacalcine a été biotinylée au bout de 3 heures.

#### Purification de la mapacalcine biotinylée

Les sels et la biotine libre ont été préalablement éliminés par gel filtration sur une colonne Sephadex G-50 Fine (250 x 0,8 mm). La séparation de la mapacalcine biotinylée de la mapacalcine non biotinylée, a été effectuée par chromatographie d'affinité sur une colonne d'avidine monomérique. La mapacalcine biotinylée a ensuite été dessalée sur colonne Sephadex G-50 Fine.

Suite à ces étapes de purification, le rendement sans incubation préalable de la mapacalcine avec le GuCl 6 M à 35°C, était de 15 %. Par contre, le rendement avec incubation préalable avec le GuCl 6 M à 35°C a été amélioré pour passer à 37,5 %.

### c. Comparaison de l' $IC_{50}$ de la mapacalcine naturelle et de la mapacalcine biotinylée sur les différentes préparations de membranes.

Compétition entre la [<sup>125</sup>I]-mapacalcine et la mapacalcine biotinylée sur les membranes de cerveau de rats et de foie de rats

La figure 4 montre que la mapacalcine biotinylée est capable de faire compétition à la [<sup>125</sup>I]-mapacalcine sur les deux préparations de membranes. La concentration de la toxine biotinylée qui induit 50 % d'inhibition de la fixation de la [<sup>125</sup>I]-mapacalcine (IC<sub>50</sub>), est de 0,38 nM pour les membranes de cerveau de rats, et de 0,85 nM pour les membranes de foie de rats. Les IC<sub>50</sub> de la mapacalcine naturelle et de la mapacalcine biotinylée sont comparées dans le tableau 1. Cette comparaison montre que la mapacalcine biotinylée possède une affinité pour le récepteur comparable à celle de la mapacalcine naturelle.



Figure 4: Courbes de compétition entre la mapacalcine [<sup>125</sup>I]-mapacalcine et la mapacalcine biotinylée sur les membranes de cerveau de rats (a) et le membranes de foie de rats (b). L'effet de la mapacalcine biotinylée est exprimé en pourcentage d'inhibition de la fixation de la [<sup>125</sup>I]-mapacalcine.

Tableau 1: Comparaison des doses inhibitrices de mapacalcine biotinylée à 50 % de la liaison de la [<sup>125</sup>I]mapacalcine, sur les membranes de cerveau de rats et de foie de rats.

	mapacalcine naturelle	mapacalcine biotinylée				
membranes de cerveau de rats	$IC_{50} = 0.13 \text{ nM}$	$IC_{50} = 0.38 \text{ nM}$				
membranes de foie de rats	$IC_{50} = 1.12 \text{ nM}$	$IC_{50} = 0.85 \text{ nM}$				

Compétition entre la [<sup>125</sup>I]-mapacalcine et la mapacalcine biotinylée sur le solubilisat de membranes de foie de rats

Des courbes de compétitions ont également été réalisées avec le solubilisat de membranes de foie de rats. Une courbe de compétition classique a été obtenue avec une  $IC_{50}$  de 4,2 nM (Figure 5).



Figure 5: Courbe de compétition entre la mapacalcine [ $^{125}$ I]-mapacalcine et la mapacalcine biotinylée sur le solubilisat de membranes de foie de rats.

#### **Conclusion**

La mapacalcine biotinylée possède une bonne affinité pour son récepteur solubilisé. Ces résultats nous permettent donc d'envisager la purification du récepteur de la mapacalcine via la mapacalcine biotinylée.

3. 3. 2. 2. Mise au point de la purification du récepteur hépatocytaire de la mapacalcine

## a. Fixation du récepteur de la mapacalcine sur la colonne d'avidine monomérique contenant la mapacalcine

Dans un premier temps la mapacalcine biotinylée a été fixée sur une colonne d'avidine monomérique. Afin d'optimiser cette fixation, la solution contenant la mapacalcine biotinylée (5 nmoles) a été continuellement recyclée sur la colonne pendant une nuit. 20 mg de membranes de foie de rat ont été solubilisés (210 fmol de récepteurs / mg de protéines) et déposés sur la colonne. En sachant que l'équilibre de fixation mapacalcine / récepteur, est atteint au bout de 2

heures, le solubilisat de membranes de foie de rats a été recyclé pendant 5 heures à 4°C sur la colonne d'avidine couplée à la mapacalcine.

#### Vérification de la fixation du récepteur de la mapacalcine sur la colonne

Afin de constater la disparition du récepteur de la mapacalcine du solubilisat après passage sur la colonne d'affinité, des tests de fixation ont été réalisés sur le solubilisat avant et après passage sur la colonne. Le pourcentage de liaison spécifique de la mapacalcine naturelle sur le solubilisat avant et après passage sur la colonne, passe de 76 à 0 % (Tableau 2). Ce résultat indique que la totalité des récepteurs est retenue par la colonne d'avidine monomérique couplée à la mapacalcine. Cette expérience démontre que la colonne d'avidine monomérique couplée à la mapacalcine, peut être utilisée pour la purification du récepteur de la mapacalcine.

tableau 2: Comparaison du pourcentage de liaison spécifique avant et après passage du solubilisat sur la colonne d'avidine monomérique contenant la mapacalcine biotinylée.

	Solubilisat avant passage sur la colonne d'affinité	Solubilisat après passage sur la colonne d'affinité
pourcentage de liaison spécifique	76 %	0 %

#### b. Elution du récepteur et électrophorèses SDS-PAGE

Avant élution du récepteur, la colonne a été lavée par du tampon PBS contenant du Triton X100 à 0,1%. Par la suite le complexe mapacalcine biotinylée / récepteur a été élué à l'aide d'une solution de biotine 2 mM contenant du Triton X100 à 0,1%.

Des électrophorèses sur gel de polyacrylamide ont été réalisées en prenant comme témoin les fractions de lavage, la première fraction de l'élution et des marqueurs de masse moléculaire (de 6500 à 200000 Da). Une bande absente dans les pistes témoins, apparaît dans la deuxième fraction d'élution et disparaît dans les fractions 3 et 4. Cette bande possède un poids moléculaire apparent de 120 000 Da.

Il est pour l'instant difficile de savoir si cette bande protéique est une sous-unité de canal calcique. Il est nécessaire de purifier une quantité plus importante afin de déterminer la séquence et aboutir au clonage moléculaire du gène codant pour le récepteur de la mapacalcine. L'impossibilité de réaliser des expériences de liaison sur ces fractions, du fait de la quasi irréversibilité de la liaison mapacalcine/récepteur, nous oblige à mettre au point des techniques plus indirectes permettant de démontrer que cette bande protéique est bien reliée au récepteur de la mapacalcine

#### 3. 3. 3. Conclusion

Il a été montré dans cette partie que la purification du récepteur hépatocytaire de la mapacalcine était envisageable par chromatographie d'affinité réalisée en couplant la mapacalcine biotinylée à une colonne d'avidine monomérique. Ces expériences montrent, sur la base de la coloration argentique, qu'un bande protéique de P.M. 120000 est éluée à la suite de la chromatographie d'affinité. La difficulté qui reste desormais à résoudre consiste à démontrer que cette bande est bien corrélée au récepteur de la mapacalcine. Du fait de la quasi irréversibilité du complexe mapacalcine récepteur la réalisation d'expériences de liaison sur les fractions issues de la colonne d'affinité est impossible. Nous envisageons donc d'utiliser les propriétés du système avidine/biotine afin de montrer, après transfert, que cette bande contient bien de la mapacalcine biotinylée au moyen d'un système de révélation greffé à l'avidine.

L'affinité de la mapacalcine couplée à la biotine étant comparable à celle de la mapacalcine naturelle, celle-ci représente donc un outil de choix pour détecter les récepteurs de la mapacalcine au niveau cellulaire par microscopie confocale en utilisant par exemple de l'avidine couplée à un fluorophore.

#### 3. 3. 4. Partie expérimentale

#### 3. 3. 4. 1. matériels

- Mapacalcine (MM: 19041), extraite de l'éponge de mer *Cliona vastifica* selon le protocole décrit précédemment (Morel et al., 1997).
- EZ-Link<sup>™</sup>NHS-LC-LC-Biotin (Pierce, Rockford, IL, USA)
- Kit Pierce (Pierce, Rockford, IL, USA): Colonne d'avidine monomérique (2 ml). tampon de rinçage : 0,1 M sodium phosphate, 0,15 M sodium chloride, pH 7,2. tampon d'élution : 2 mM biotine dans 0,1 M de phosphate de sodium et 0,15 M de chlorure de sodium, pH 7,2, 0.02 % d'azide de sodium, tampon de régénération : 0,1 M glycine.

- Diméthylsulfoxyde (DMSO) (Prolabo, Fontenay S/Bois, France)

- Chlorure de guanidine (Sigma, St Louis, MO, USA)

#### Membranes

- Membranes de foie de rats préparées selon la méthode de Neville (Neville, 1968).

- Membranes de cerveau de rats préparées selon la méthode décrite dans Mourre et al. (Mourre et al., soumis).

#### Electrophorèses SDS-PAGE

- Plaques électrophorétiques en verre de 10 cm x 10 cm et de 1 mm d'épaisseur.
- Gel d'acrylamide/bisacrylamide 37.5/1 ± 40 %, Tampon Tris pH 8.8 ; Tampon Tris pH 6.8
- Persulfate d'ammonium à 1% ; SDS à 1% ;
- Bromophénol,
- 2-mercaptoéthanol (Acros, New Jersey, USA)
- Poids moléculaires (Bio-rad, Hercules, CA, USA)
- Coloration à l'argent (Bio-Rad)

#### 3. 3. 4. 2. Méthodes

a. Solubilisation du récepteur hépatocytaire des membranes de foie de rats.

Des aliquots de 500 µl de membranes de foie de rats à 6,7 mg/ml de protéines, ont été centrifugés à 23 000 g (Centrifuge 5403, Roucaire, Vélizy, France) pendant 10 min à 4°C. Le tampon Tris/HCl 1 mM, pH 7,4 (surnageant) a été éliminé et remplacé par du tampon phosphate 10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,45.

La solubilisation des protéines a été réalisée avec du Triton X100 à 1%. Un solution de Triton X100 à 10 % a été ajoutée sous agitation, goutte à goutte jusqu'à une concentration finale de 1 % en Triton.

Les aliquots ont été centrifugés à 23 000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines solubilisées a été conservé à 4°C. La concentration finale du solubilisat était de 6,23 mg/ml de protéines.

#### b. expériences de compétition

Les essais ont été menés dans un volume final de 1 ml dans un tampon standard (cf experimental Lqh7.1). Après incubation, 450  $\mu$ l de chaque solution ont été filtrés sur des filtres de fibre de verre Whatman de 25 mm de diamètre, GF/C pour les membranes de cerveaux et de foies de rats et GF/B pour le solubilisat de membranes de foie de rats. Les filtres ont été préalablement préincubés dans du tampon Tris/HCl 10 mM à pH 7,4 contenant 0,5 % de PEI. Les filtres sont lavés par 2 x 5 ml de tampon de lavage (Tris/HCl 10 mM à pH 7,4). La radioactivité retenues par les filtres a été comptée sur un compteur de rayons  $\gamma$  (Packard).

#### Membranes de foie de rats et membranes de cerveaux de rats

Les membranes de cerveau et de foie de rats ont été incubées avec des concentrations croissantes de mapacalcine biotinylée pendant 4 heures à 4°C, en présence de 0,01 nM de [<sup>125</sup>I]-mapacalcine.

#### Solubilisat de membranes de foie de rats

Le solubilisat a été incubé avec des concentrations croissantes de mapacalcine biotinylée pendant 2 heures à 4°C, en présence de 0,05 nM de [ $^{125}$ I]-mapacalcine.

#### c. préparation de la mapacalcine biotinylée

#### Modification de la mapacalcine par la NHS-LC-LC-biotine

La biotinylation de la mapacalcine a été réalisée à température ambiante dans un tampon phosphate 0,2 M à pH 7, 96 contenant du GuCl 6 M, avec un excès 10 fois supérieur de EZ-Link<sup>™</sup> NHS-LC-LC-Biotin. Avant réaction, la mapacalcine a été incubée dans le GuCl 6 M à 35°C pendant 15 min. La concentration finale de mapacalcine était de 0,1 mM.

L'apparition du dérivé biotinylé de la mapacalcine a été suivie par *chromatographie d'échange d'anions*:

- colonne: Resource<sup>™</sup> Q, 1 ml, monodisperse, billes de polystyrène/divinylbenzène de 15 μm de diamètre (Pharmacia Biotech).
- le tampon A est une solution de Tris 10 mM à pH 7,4
- le tampon B est une solution de Tris 10 mM, NaCl 1 M, pH 7,4.
- gradient d'élution : isocratique pendant 3 min, gradient de 0 à 25 % de B en 14 min, 25 à 100 % de B en 2 min et 100 à 0 % de B en 1 min.
- le débit 2 ml/min.
- température ambiante.

Quelques  $\mu$ l de solution de réaction ont été prélevés toutes les 15 min et injectés sur la colonne pour suivre la réaction.

Purification de la mapacalcine biotinylée

1. Dessalage et élimination de la biotine libre du milieu de réaction

Le milieu de réaction contenant la mapacalcine biotinylée a été dessalé par gel filtration pour éliminer les sels et la biotine libre.

- colonne Sephadex G-50 Fine (0.8 x 250 mm)
- solution d'équilibration et d'élution : acide acétique 1 %
- débit de 0.3 ml/min
- détection à 280 nm

Les fractions contenant la mapacalcine modifiée et non modifiée, ont été rassemblées et Le pH du lot a été amené à 7,4 avec de la soude pure (quelques gouttes).

2. séparation de la mapacalcine biotinylée de la mapacalcine non biotinylée par chromatographie d'affinité

La séparation de la mapacalcine biotinylée et non biotinylée a été réalisée par chromatographie d'affinité:

- colonne d'avidine monomérique de 2 ml (Kit Pierce, Rockford, IL, USA)

- tampon: cf matériels (Kit Pierce)

- détection par lecture de la densité optique à 280 nm

a. Le mélange mapacalcine biotinylée et mapacalcine non biotinylée pH 7.4 a été déposé sur la colonne d'avidine monomérique. Le filtrat a été "redéposé" plusieurs fois sur cette colonne jusqu'à obtention d'une densité optique de 280 nm stable, indiquant la fixation de la mapacalcine biotinylée. b. La colonne a été lavée par  $2 \ge 5$  ml de PBS afin d'éliminer toutes les substances non retenues par la colonne.

c. Lorsque la densité optique était revenue à sa ligne de base, la mapacalcine biotinylée a été éluée et détectée à 280 nm.

#### 3. Dessalage après chromatographie d'affinité

La mapacalcine biotinylée a été dessalée sur la colonne de gel filtration Sephadex G-50 Fine. Les conditions de dessalage on été les mêmes que pour le dessalage après modification de la mapacalcine par la NHS-LC-LC-biotine.

### d. Mise au point de la purification du récepteur hépatocytaire de la mapacalcine

#### Fixation de la mapacalcine biotinylée sur la colonne d'avidine monomérique

La fixation de la mapacalcine biotinylée sur la colonne d'avidine monomérique a été réalisée à partir de 5 nmoles de mapacalcine biotinylée (50  $\mu$ l d'une solution de mapacalcine biotinylée à 10<sup>-4</sup> M ont été dilués dans 1 ml de PBS). La colonne d'avidine monomérique a été branchée à une pompe péristaltique avec un débit de fixé à 0,3 ml/min. 4 ml de PBS ont été ajoutés à la solution de mapacalcine biotinylée pour permettre de réaliser un circuit fermé. La solution de mapacalcine biotinylée a ainsi été continuellement recyclée sur la colonne d'avidine monomérique pendant 12h.

### Fixation du récepteur de la mapacalcine sur la colonne d'avidine monomérique couplée à mapacalcine biotinylée

La solubilisation du récepteur de la mapacalcine a été réalisée à partir de 20 mg de protéines de membranes de foie de rats. 3,2 ml de solubilisat ont été ainsi obtenus et déposés sur la colonne d'avidine contenant la mapacalcine. La colonne a été branchée à une pompe péristaltique et le débit était de 0,3 ml/min. 2 ml de PBS ont été ajoutés aux 3,2 ml de solubilisat pour permettre de réaliser un circuit fermé. Le solubilisat a été ainsi continuellement recyclé sur la colonne pendant 5h. Au bout des 5h, la colonne a été rincée par 12 x 2 ml de PBS dans lequel a été rajouté 0.1 % de triton X100. 7 x 2 ml de solution de biotine à 2 mM dans laquelle a été ajoutée 0,1% de triton X100, ont été utilisés pour éluer la mapacalcine associée à son récepteur.

#### Electrophorèses SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide

Les échantillons ont été préalablement dénaturés par 5 % de β-mercaptoéthanol.
- le gel de concentration était de 4 % et le gel de migration était à 7 %

- tampon de migration était: Tris/HCl, Glycine, SDS

- la migration a été réalisée à 250 V, 45 mA, pendant 1h15 (soit 15 W), dans un bain réfrigéré à 4°C.

- Les gels ont été colorés à l'argent (Kit de coloration Bio-Rad)

# REFERENCES

- Abe T, Koyano K, Saisu H, Nishiuchi Y, Sakakibara S. Binding of omega-conotoxin to receptor sites associated with the voltage-sensitive calcium channel. *Neurosci Lett* 1986; <u>71</u>: 203-208
- Adams ME, Bindokas VP, Hasegawa L, Venema VJ. Omega-agatoxins: novel calcium channel antagonists of two subtypes from funnel web spider (Agelenopsis aperta) venom. J Biol Chem 1990; 265 : 861-867
- Adams ME, Mintz IM, Reily MD, Thanabal V, Bean BP.Structure and properties of omega-agatoxin IVB, a new antagonist of P-type calcium channels*Mol Pharmacol* 1993; <u>44</u>: 681-8
- Anfinsen CB, Scheraga HA. Experimental and theoretical aspects of protein folding. Adv Protein Chem 1975; 29: 205-300

Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. Science 1973; 181: 223-230

- Auguste P, Hugues M, Mourre C, Moinier D, Tartar A, Lazdunski M. Scyllatoxin, a blocker of Ca(2+)-activated
   K+ channels: structure-function relationships and brain localization of the binding sites. *Biochemistry* 1992;
   31: 648-654
- Baldwin RL. Intermediates in protein folding reactions and the mechanism of protein folding. Annu Rev Biochem 1975; 44: 453-475
- Barhanin J, Schmid A, Lazdunski M. Properties of structure and interaction of the receptor for omega-conotoxin, a polypeptide active on Ca<sup>2+</sup> channels. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; <u>150</u>: 1051-1062
- Basus VJ, Nadasdi L, Ramachandran J, Miljanich GP. Solution structure of omega-conotoxin MVIIA using 2D NMR spectroscopy. *FEBS Lett* 1995 ; 370 : 163-9

Bayer E. A. Wilchek M. Protein biotinylation. Methods Enzymol. 1990; 184: 138-160

Bean BP (a). Classes of calcium channels in vertebrate cells. Annu Rev Physiol 1989; 51:367-84

Bean BP (b). Multiple types of calcium channels in heart muscle and neurons. Modulation by drugs and neurotransmitters. Ann N Y Acad Sci 1989; 560: 334-45

Becker JM, Wilchek M, Katchalski E. Irreversible inhibition of biotin transport in yeast by biotinyl-pnitrophenyl ester. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; <u>68</u>: 2604-7

Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature 1993 ; 361 : 315-325

- Bindokas VP, Adams ME. Omega-Aga-I: a presynaptic calcium channel antagonist from venom of the funnel web spider, Agelenopsis aperta. J Neurobiol 1989; 20: 171-88
- Bourinet E, Zamponi GW, Stea A, Soong TW, Lewis BA, Jones LP, Yue DT, Snutch TP. The alpha 1E calcium channel exhibits permeation properties similar to low-voltage-activated calcium channels. *J Neurosci* 1996; <u>16</u>: 4983-93
- Brünger, AT. X-PLOR version 3.1. In A System for X-ray Crystallography and NMR. 1992 Yale University, New Haven, CT.
- Carbone E, Lux HD. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. Nature 1984; 310: 501-502
- Carpino LA, Cohen BJ, Stephens KE, Sadat-Aalae Y, Tien J-H. (9-flurenylmethoxy)carbonyl (fmoc) amino acid chlorides, Synthesis, characterization and application to the rapid synthesis of short peptide segments. J A m Chem Soc 1986; <u>51</u>: 3732-3734
- Carpino LA, Han GY. The 9-flurenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. J Am Chem Soc 1970; <u>92</u>: 5748-5749
- Castro B, Dormoy JR, Evin G, Selve C. Réactifs de couplage IV (1) L'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdimethylamino phosphonium (B.O.P.). *Tetrahedron Lett* 1975 ; <u>14</u> : 1219-22
- Catterall WA. (b) Molecular properties of voltage-sensitive sodium and calcium channels. *Braz J Med Biol Res* 1988; <u>21</u>: 1129-44

Catterall WA. (a) Structure and function of voltage-sensitive ion channels. Science 1988; 242: 50-61

Catterall WA. (a) Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: a tale of two calcium channels. Cell 1991; 64 : 871-874

- Catterall WA. Functional subunit structure of voltage-gated calcium channels. Science 1991; 253: 1499-1500
- Catterall WA, Striessnig J. Receptor sites for Ca2+ channel antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1992; <u>13</u>: 256-262
- Chuang RS, Jaffe H, Cribbs L, Perez-Reyes E, Swartz KJ. Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat Neurosci* 1998; <u>1</u>: 668-74
- Chung D, Gaur S, Bell JR, Ramachandran J, Nadasdi L. Determination of disulfide bridge pattern in omegaconopeptides. Int J Pept Protein Res 1995 ; 46 : 320-5
- Civera C, Vazquez A, Sevilla JM, Bruix M, Gago F, Garcia AG, Sevilla P. Solution structure determination by two-dimensional 1H NMR of omega-conotoxin MVIID, a calcium channel blocker peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 ; <u>254</u> : 32-5
- Cohen CJ, Ertel EA, Smith MM, Venema VJ, Adams ME, Leibowitz MD. High affinity block of myocardial Ltype calcium channels by the spider toxin omega-Aga-toxin IIIA: advantages over 1,4-dihydropyridines. *Mol Pharmacol* 1992; <u>42</u>: 947-51
- Creighton TE. Toward a better understanding of protein folding pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; <u>85</u>: 5082-6
- Cruz LJ, Gray WR, Olivera BM, Zeikus RD, Kerr L, Yoshikami D, Moczydlowski E. Conus geographus toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J Biol Chem* 1985; <u>260</u> : 9280-8
- Cruz LJ, Olivera BM. Calcium channel antagonists. Omega-conotoxin defines a new high affinity site. J Biol Chem 1986; 261: 6230-3
- Dhalluin C. Etude par résonnance magnétique nuléaire à l'angle magique de molécules sur support solide. Doctorat de l'Université des Sciences et Technologies de Lille I; 1997
- Daquinag AC, Sato T, Koda H, Takao T, Fukuda M, Shimonishi Y, Tsukamoto T. A novel endogenous inhibitor of phenoloxidase from Musca domestica has a cystine motif commonly found in snail and spider toxins. *Biochemistry* 1999; <u>38</u>: 2179-88

- Dauplais M, Lecoq A, Song J, Cotton J, Jamin N, Gilquin B, Roumestand C, Vita C, de Medeiros CLC, Rowan EG, Harvey AL, Menez A. On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. J Biol Chem 1997; 272: 4302-9
- Davis JH, Bradley EK, Miljanich GP, Nadasdi L, Ramachandran J, Basus VJ. Solution structure of omegaconotoxin GVIA using 2-D NMR spectroscopy and relaxation matrix analysis. *Biochemistry* 1993 ; <u>32</u> : 7396-405
- De Weille JR, Schweitz H, Maes P, Tartar A, Lazdunski M. Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; <u>88</u>: 2437-40
- Ellinor PT, Zhang JF, Randall AD, Zhou M, Schwarz TL, Tsien RW, Horne WA. Functional expression of a rapidly inactivating neuronal calcium channel. *Nature* 1993; <u>363</u>: 455-8
- Ellinor PT, Zhang JF, Horne WA, Tsien RW. Structural determinants of the blockade of N-type calcium channels by a peptide neurotoxin. *Nature* 1994 ; <u>372</u> : 272-5
- Ellis SB, Williams ME, Ways NR, Brenner R, Sharp AH, Leung AT, Campbell KP, McKenna E, Koch WJ, Hui A, Schwartz A, Harpold MM. Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* 1988; <u>241</u> : 1661-4
- Ertel EA, Warren VA, Adams ME, Griffin PR, Cohen CJ, Smith MM. Type III omega-agatoxins: a family of probes for similar binding sites on L- and N-type calcium channels. *Biochemistry* 1994; <u>33</u>: 5098-108

Farber J-L. The role of calcium in cell death. Life Sci 1981; 29: 1289-1295

- Farr-Jones S, Miljanich GP, Nadasdi L, Ramachandran J, Basus VJ. Solution structure of omega-conotoxin MVIIC, a high affinity ligand of P-type calcium channels, using 1H NMR spectroscopy and complete relaxation matrix analysis. J Mol Biol 1995; 248: 106-24
- Favreau P, Krimm I, Le Gall F, Bobenrieth MJ, Lamthanh H, Bouet F, Servent D, Molgo J, Ménez A, Letourneux Y, Lancelin JM. Biochemical characterization and nuclear magnetic resonance structure of novel alpha-conotoxins isolated from the venom of Conus consors. *Biochemistry* 1999; <u>38</u>: 6317-26

- Feigenbaum P, Garcia ML, Kaczorowski GJ. Evidence for distinct sites coupled to high affinity omegaconotoxin receptors in rat brain synaptic plasma membrane vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 ; <u>154</u> : 298-305
- Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW. Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. J Physiol (Lond) 1987; <u>394</u>: 173-200
- Giangiacomo KM, Garcia ML, McManus OB. Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calciumactivated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* 1992 ; <u>31</u> : 6719-27

Goldenberg DP, Creighton TE. Energetics of protein structure and folding. Biopolymers 1985; 24: 167-82

- Goldstein SA, Miller C. Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K+ channel. *Biophys J* 1993 ; <u>65</u> : 1613-9
- Goldstein SA, Pheasant DJ, Miller C. The charybdotoxin receptor of a Shaker K+ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron* 1994; <u>12</u>: 1377-88
- Gonoi T, Ohizumi Y, Nakamura H, Kobayashi J, Catterall WA. The Conus toxin geographutoxin IL distinguishes two functional sodium channel subtypes in rat muscle cells developing in vitro. J Neurosci 1987; <u>7</u>: 1728-31
- Gray WR, Olivera BM, Cruz LJ. Peptide toxins from venomous Conus snails. Annu Rev Biochem 1988 ; <u>57</u> : 665-700
- Gray WR. Disulfide structures of highly bridged peptides: a new strategy for analysis. *Protein Sci* 1993 ; 2 : 1732-48
- Harrison PM, Sternberg MJ. The disulphide beta-cross: from cystine geometry and clustering to classification of small disulphide-rich protein folds. *J Mol Biol* 1996; <u>264</u>: 603-23
- Hillyard DR, Monje VD, Mintz IM, Bean BP, Nadasdi L, Ramachandran J, Miljanich G, Azimi-Zoonooz A, McIntosh JM, Cruz LJ, Imperial JS, Olivera BM. A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 1992; 2: 69-77

- Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. Molecular basis for Ca<sup>2+</sup> channel diversity. Annu Rev Neurosci 1994 ; <u>17</u> : 399-418
- Huguenard JR. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. Annu Rev Physiol 1996; 58 :329-48
- Hugues M, Crane MR, Robertson D, Gazzano H, Hanley P, Waldman SA. Affinity Purification of Functional Receptors for Escherichia coli Heat-Stable Enterotoxin from Rat Intestine *Biochemistry* 1992; <u>31</u>: 12-16
- Isom LL, De Jongh KS, Catterall WA. Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron* 1994 ; <u>12</u> : 1183-94
- Jackson H, Usherwood PN. Spider toxins as tools for dissecting elements of excitatory amino acid transmission. Trends Neurosci 1988; 11: 278-83
- Kalasz H, Watanabe T, Yabana H, Itagaki K, Naito K, Nakayama H, Schwartz A, Vaghy PL. Identification of 1,4-dihydropyridine binding domains within the primary structure of the alpha 1 subunit of the skeletal muscle L-type calcium channel. FEBS Lett 1993; <u>331</u>: 177-81
- Keith RA, Mangano TJ, Lampe RA, DeFeo PA, Hyde MJ, Donzanti BA. Comparative actions of synthetic omega-grammotoxin SIA and synthetic omega-Aga-IVA on neuronal calcium entry and evoked release of neurotransmitters in vitro and in vivo. *Neuropharmacology* 1995; <u>34</u>: 1515-28
- Kim JI, Konishi S, Iwai H, Kohno T, Gouda H, Shimada I, Sato K, Arata Y. Three-dimensional solution structure of the calcium channel antagonist omega-agatoxin IVA: consensus molecular folding of calcium channel blockers. J Mol Biol 1995; 250: 659-71
- Klaus W, Broger C, Gerber P, Senn H. Determination of the disulphide bonding pattern in proteins by local and global analysis of nuclear magnetic resonance data. Application to flavoridin. J Mol Biol 1993; 232: 897-906
- Kohno T, Kim JI, Kobayashi K, Kodera Y, Maeda T, Sato K. Three-dimensional structure in solution of the calcium channel blocker omega-conotoxin MVIIA. *Biochemistry* 1995; <u>34</u>: 10256-65
- Kraulis PJ, MOLSCRIPT: A programm to produce both detailed and schematic plots of protein structures. J. Appl. Crystallo. 1991; 24: 946-950

- Kristipati R, Nadasdi L, Tarczy-Hornoch K, Lau K, Miljanich GP, Ramachandran J, Bell JR. Characterization of the binding of omega-conopeptides to different classes of non-L-type neuronal calcium channels. *Mol Cell Neurosci* 1994; <u>5</u>: 219-28
- Kurita K, Tanabe G, Aikou T, Shimazu H. Ischemic liver cell damage and calcium accumulation in rats. J. *Hepatol.* 1993; <u>18</u>: 196-204
- Lampe RA, Defeo PA, Davison MD, Young J, Herman JL, Spreen RC, Horn MB, Mangano TJ, Keith RA. Isolation and pharmacological characterization of omega-grammotoxin SIA, a novel peptide inhibitor of neuronal voltage-sensitive calcium channel responses. *Mol Pharmacol* 1993; <u>44</u>: 451-60
- Laskowski RA, McArthur MW, Moss DM, Thornton JM. A program to check the stereochemical quality of protein structures. J Appl Crystallogr 1993; 26: 283-291
- Lew MJ, Flinn JP, Pallaghy PK, Murphy R, Whorlow SL, Wright CE, Norton RS, Angus JA. Structurefunction relationships of omega-conotoxin GVIA. Synthesis, structure, calcium channel binding, and functional assay of alanine-substituted analogues. *J Biol Chem* 1997; <u>272</u>: 12014-23
- Llinas R, Sugimori M, Lin JW, Cherksey B. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; <u>86</u>: 1689-93
- Martin-Moutot N, Leveque C, Sato K, Kato R, Takahashi M, Seagar M. Properties of omega conotoxin MVIIC receptors associated with alpha 1A calcium channel subunits in rat brain. *FEBS Lett* 1995 ; <u>366</u> : 21-5
- Martinez JS, Olivera BM, Gray WR, Craig AG, Groebe DR, Abramson SN, McIntosh JM. Alpha-Conotoxin EI, a new nicotinic acetylcholine receptor antagonist with novel selectivity. *Biochemistry* 1995; <u>34</u>: 14519-26
- McCleskey EW, Fox AP, Feldman DH, Cruz LJ, Olivera BM, Tsien RW, Yoshikami D. Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 ; <u>84</u> : 4327-31
- McDonough SI, Swartz KJ, Mintz IM, Boland LM, Bean BP. Inhibition of calcium channels in rat central and peripheral neurons by omega-conotoxin MVIIC. *J Neurosci* 1996; <u>16</u>: 612-23

- McIntosh M, Cruz LJ, Hunkapiller MW, Gray WR, Olivera BM. Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail Conus magus. Arch Biochem Biophys 1982; 218: 329-34
- Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 1989 ; <u>340</u> : 230-3
- Miljanich GP, Ramachandran J. Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1995; <u>35</u>: 707-34
- Miller RJ. Calcium signalling in neurons. Trends Neurosci 1988; 1110: 415-419
- Miller RJ. Voltage-sensitive Ca2+ channels. J Biol Chem 1992; 267: 1403-6
- Mintz IM, Venema VJ, Adams ME, Bean BP. Inhibition of N and L-type Ca<sup>2+</sup> channels by the spider venom toxin omega-Aga-IIIA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; <u>88</u>: 6628-31
- Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP, Adams ME (a). P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Nature* 1992; 355: 827-9
- Mintz IM, Adams ME, Bean BP. (b) P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* 1992 ; 2 : 85-95
- Mintz IM. Block of Ca channels in rat central neurons by the spider toxin omega-Aga-IIIA. J Neurosci 1994; <u>14</u> : 2844-53
- Mintz IM, Sabatini BL, Regehr WG. Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron* 1995 ; <u>15</u> : 675-88
- Morel J-L, Drobecq H, Sautiere P, Tartar A, Mironneau J, Qar J, Lavie J-L, Hugues M. Purification of a new dimeric protein from Cliona vastifica sponge, which specifically blocks a non-L-type calcium channel in mouse duodenal myocytes. *Mol. Pharmacol.* 1997; 51: 1042-1052.
- Mori Y, Friedrich T, Kim MS, Mikami A, Nakai J, Ruth P, Bosse E, Hofmann F, Flockerzi V, Furuichi T, Mikoshiba K, Imoto K, Tanabe T, Numa S. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 1991; <u>350</u>: 398-402

- Mori Y, Mikala G, Varadi G, Kobayashi T, Koch S, Wakamori M, Schwartz A. Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels. *Jpn J Pharmacol* 1996; <u>72</u>: 83-109
- Nadasdi L, Yamashiro D, Chung D, Tarczy-Hornoch K, Adriaenssens P, Ramachandran J. Structure-activity analysis of a Conus peptide blocker of N-type neuronal calcium channels. *Biochemistry* 1995; <u>34</u>: 8076-81
- Nargeot J, Dascal N, Lester HA. Heterologous expression of calcium channels. J Membr Biol 1992 ; <u>126</u> : 97-108
- Nemoto N, Kubo S, Yoshida T, Chino N, Kimura T, Sakakibara S, Kyogoku Y, Kobayashi Y. Solution structure of omega-conotoxin MVIIC determined by NMR. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 ; 207 : 695-700
- Neveu D, Nargeot J, Richard S. Two high-voltage-activated, dihydropyridine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel currents with distinct electrophysiological and pharmacological properties in cultured rat aortic myocytes. *Pflugers Arch* 1993; <u>424</u>: 45-53
- Neville, DM. Isolation of an organ specific protein antigen from cell-surface membrane of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 1968; <u>154</u>: 540-552
- Newcomb R, Palma A. Effects of diverse omega-conopeptides on the in vivo release of glutamic and gammaaminobutyric acids. *Brain Res* 1994 ; <u>638</u> : 95-102
- Newcomb R, Palma A, Fox J, Gaur S, Lau K, Chung D, Cong R, Bell JR, Horne B, Nadasdi L, Ramachandran J. SNX-325, a novel calcium antagonist from the spider Segestria florentina. Biochemistry 1995; <u>34</u>: 8341-7
- Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen Xh, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, Loo JA, Dooley DJ, Nadasdi L, Tsien RW, Lemos J, Miljanich G. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* 1998; <u>37</u>: 15353-62
- Nicholls A, Sharp, KA, Honig B. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* ; <u>11</u> : 281-296

- Nielsen KJ, Thomas L, Lewis RJ, Alewood PF, Craik DJ. A consensus structure for omega-conotoxins with different selectivities for voltage-sensitive calcium channel subtypes: comparison of MVIIA, SVIB and SNX-202. J Mol Biol 1996; 263 : 297-310
- Nielsen KJ, Adams D, Thomas L, Bond T, Alewood PF, Craik DJ, Lewis RJ. Structure-activity relationships of omega-conotoxins MVIIA, MVIIC and 14 loop splice hybrids at N and P/Q-type calcium channels. J Mol Biol 1999; 289: 1405-21
- Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 1985; <u>316</u>: 443-6
- Nishio H, Kumagaye KY, Kubo S, Chen YN, Momiyama A, Takahashi T, Kimura T, Sakakibara S. Synthesis of omega-agatoxin IVA and its related peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; <u>196</u>: 1447-53
- Nooney JM, Lambert RC, Feltz A. Identifying neuronal non-L Ca<sup>2+</sup> channels: more than stamp collecting? *Trends Pharmacol Sci* 1997; <u>18</u>: 363-71
- Norton RS, Pallaghy PK. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon* 1998; <u>36</u>: 1573-83
- Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 1985; <u>316</u>: 440-3
- Ohizumi Y, Minoshima S, Takahashi M, Kajiwara A, Nakamura H, Kobayashi J (a). Geographutoxin II, a novel peptide inhibitor of Na channels of skeletal muscles and autonomic nerves. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 239 : 243-8
- Ohizumi Y, Nakamura H, Kobayashi J, Catterall WA (b). Specific inhibition of [3H] saxitoxin binding to skeletal muscle sodium channels by geographutoxin II, a polypeptide channel blocker. J Biol Chem 1986; <u>261</u>: 6149-52
- Olivera BM, McIntosh JM, Cruz LJ, Luque FA, Gray WR. Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from Conus geographus venom. *Biochemistry* 1984; 23:5087-90
- Olivera BM, Gray WR, Zeikus R, McIntosh JM, Varga J, Rivier J, de Santos V, Cruz LJ. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science* 1985; 230: 1338-43

- Olivera BM, Rivier J, Clark C, Ramilo CA, Corpuz GP, Abogadie FC, Mena EE, Woodward SR, Hillyard DR, Cruz LJ. Diversity of Conus neuropeptides. *Science* 1990 ; <u>249</u> : 257-63
- Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. Annu Rev Biochem 1994; <u>63</u>: 823-67
- Olivera BM. Conus venom peptides, Receptors and Ion Channel Targets, and Drug Design: 50 Million Years of Neuropharmacology. *Molecular Biology of the Cell* 1997; 8:2101-2109
- Omecinsky DO, Holub KE, Adams ME, Reily MD. Three-dimensional structure analysis of mu-agatoxins: further evidence for common motifs among neurotoxins with diverse ion channel specificities. *Biochemistry* 1996; <u>35</u>: 2836-44
- Pallaghy PK, Duggan BM, Pennington MW, Norton RS. Three-dimensional structure in solution of the calcium channel blocker omega-conotoxin. J Mol Biol 1993; 234: 405-20
- Pallaghy PK, Nielsen KJ, Craik DJ, Norton RS. A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Sci* 1994; <u>3</u>: 1833-9
- Pallaghy PK, Norton RS. Refined solution structure of omega-conotoxin GVIA: implications for calcium channel binding. *J Pept Res* 1999; <u>53</u>: 343-51
- Park CS, Miller C. Interaction of charybdotoxin with permeant ions inside the pore of a K+ channel. *Neuron* 1992; 9:307-13
- Perez-Reyes E, Kim HS, Lacerda AE, Horne W, Wei XY, Rampe D, Campbell KP, Brown AM, Birnbaumer L. Induction of calcium currents by the expression of the alpha 1-subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature* 1989 ; <u>340</u> : 233-6
- Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee JH. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 1998 ; 391 : 896-900
- Pillet L, Tremeau O, Ducancel F, Drevet P, Zinn-Justin S, Pinkasfeld S, Boulain JC, Ménez A. Genetic engineering of snake toxins. Role of invariant residues in the structural and functional properties of a curaremimetic toxin, as probed by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1993; 268: 909-16

- Piser TM, Lampe RA, Keith RA, Thayer SA. Complete and reversible block by omega-grammotoxin SIA of glutamatergic synaptic transmission between cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 1995; 201: 135-8
- Pocock JM, Venema VJ, Adams ME. Omega-agatoxins differentially block calcium channels in locust, chick and rat synaptosomes. *Neurochem Int* 1992; <u>20</u>: 263-70
- Ramilo CA, Zafaralla GC, Nadasdi L, Hammerland LG, Yoshikami D, Gray WR, Kristipati R, Ramachandran J, Miljanich G, Olivera BM, Cruz LJ. Novel alpha- and omega-conotoxins from Conus striatus venom. *Biochemistry* 1992 ; <u>31</u> : 9919-26
- Randall A, Tsien RW. Pharmacological dissection of multiple types of  $Ca^{2+}$ -channel currents in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci* 1995; <u>15</u>: 2995-3012
- Regan LJ. Voltage-dependent calcium currents in Purkinje cells from rat cerebellar vermis. J Neurosci 1991 ; <u>11</u> : 2259-69
- Reily MD, Holub KE, Gray WR, Norris TM, Adams ME. Structure-activity relationships for P-type calcium channel-selective omega-agatoxins. *Nat Struct Biol* 1994; <u>1</u>: 853-6
- Reily MD, Thanabal V, Adams ME. The solution structure of omega-Aga-IVB, a P-type calcium channel antagonist from venom of the funnel web spider, Agelenopsis aperta. J Biomol NMR 1995; <u>5</u>: 122-32

Richardson JS. The anatomy and taxonomy of protein structure. Adv Protein Chem 1981; 34: 167-339

- Sabatier JM, Zerrouk H, Darbon H, Mabrouk K, Benslimane A, Rochat H, Martin-Eauclaire MF, Van Rietschoten J. P05, 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+ channels with increased affinity. *Biochemistry* 1993; <u>32</u>: 2763-70
- Saccomano, N. A. et Ahlijanian, M. K. Ca<sup>2+</sup> Channel Toxins : Tools to study Channel Structure and Fonction. Drug Development Research 1994 ; <u>33</u> : 319-343.
- Santos AD, Imperial JS, Chaudhary T, Beavis RC, Chait BT, Hunsperger JP, Olivera BM, Adams ME, Hillyard DR. Heterodimeric structure of the spider toxin omega-agatoxin IA revealed by precursor analysis and mass spectrometry. J Biol Chem 1992; 267: 20701-5

- Sather WA, Tanabe T, Zhang JF, Mori Y, Adams ME, Tsien RW. Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel alpha 1 subunits. *Neuron* 1993 ; <u>11</u> : 291-303
- Sato K, Park NG, Kohno T, Maeda T, Kim JI, Kato R, Takahashi M. Role of basic residues for the binding of omega-conotoxin GVIA to N-type calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 ; <u>194</u> : 1292-6
- Schramm M, Towart R, Lamp B, Thomas G. Modulation of calcium ion influx by the1,4-dihydropyridines nifedipine and BAY K 8644. *Cardiovasc Pharmacol* 1985; <u>11</u>: 493-6
- Schweitz H, Heurteaux C, Bois P, Moinier D, Romey G, Lazdunski M. Calcicludine, a venom peptide of the Kunitz-type protease inhibitor family, is a potent blocker of high-threshold Ca<sup>2+</sup> channels with a high affinity for L-type channels in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; <u>91</u>: 878-82
- Scott RH, Dolphin AC, Bindokas VP, Adams ME. Inhibition of neuronal Ca<sup>2+</sup> channel currents by the funnel web spider toxin omega-Aga-IA. *Mol Pharmacol* 1990; <u>38</u> : 711-8
- Sevilla P, Bruix M, Santoro J, Gago F, Garcia AG, Rico M. Three-dimensional structure of omega-conotoxin GVIA determined by 1H NMR. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 ; <u>192</u> : 1238-44
- Sher E, Biancardi E, Passafaro M, Clementi F. Physiopathology of neuronal voltage-operated calcium channels. *FASEB J* 1991 ; <u>5</u> : 2677-2683
- Sher E, Clementi F. Omega-conotoxin-sensitive voltage-operated calcium channels in vertebrate cells. Neuroscience 1991; <u>42</u>:3 01-7
- Shon KJ, Grilley MM, Marsh M, Yoshikami D, Hall AR, Kurz B, Gray WR, Imperial JS, Hillyard DR, Olivera BM. Purification, characterization, synthesis, and cloning of the lockjaw peptide from Conus purpurascens venom. *Biochemistry* 1995; 34: 4913-8
- Shon KJ, Koerber, SC., Rivier, JE., Olivera, BM., McIntosh, JM. Three-Dimensional Solution Structure of a-Conotoxin MII, an a3b2 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor-Targeted Ligand. *Biochemistry* 1997; <u>36</u>: 15693-15700
- Shon KJ, Stocker M, Terlau H, Stuhmer W, Jacobsen R, Walker C, Grilley M, Watkins M, Hillyard DR, Gray WR, Olivera BM. Kappa-Conotoxin PVIIA is a peptide inhibiting the shaker K+ channel. J Biol Chem 1998; 273: 33-8

- Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F, Dascal N. The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* 1991; 253: 1553-7
- Skalicky JJ, Metzler WJ, Ciesla DJ, Galdes A, Pardi A. Solution structure of the calcium channel antagonist omega-conotoxin GVIA. *Protein Sci* 1993; 2: 1591-603
- Smith DL, Zhou ZR. Strategies for locating disulfide bonds in proteins. Methods Enzymol 1990; 193 : 374-89
- Snutch TP, Leonard JP, Gilbert MM, Lester HA, Davidson N. Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; <u>87</u>: 3391-5
- Snutch TP, Reiner PB.Ca<sup>2+</sup> channels: diversity of form and function. Curr Opin Neurobiol 1992; 2: 247-53
- Soong TW, Stea A, Hodson CD, Dubel SJ, Vincent SR, Snutch TP. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 1993; <u>260</u>: 1133-6
- Stampe P, Kolmakova-Partensky L, Miller C. Intimations of K+ channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. *Biochemistry* 1994; <u>33</u>: 443-50
- Stoehr SJ, Dooley DJ. Characteristics of [125I]omega-conotoxin MVIIA binding to rat neocortical membranes. Neurosci Lett 1993 ; 161 : 113-6
- Striessnig J, Glossmann H, Catterall WA. Identification of a phenylalkylamine binding region within the alpha 1 subunit of skeletal muscle Ca<sup>2+</sup>channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; <u>87</u>: 9108-12
- Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 1989; <u>339</u>: 597-603
- Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BF, Catterall WA. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; <u>84</u>: 5478-82
- Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 1987 ; <u>328</u> : 313-8

Thornton JM. Disulphide bridges in globular proteins. J Mol Biol 1981; 151: 261-87

Tottene A, Moretti A, Pietrobon D. Functional diversity of P-type and R-type calcium channels in rat cerebellar neurons. J Neurosci 1996; 16: 6353-63

Triggle DJ, Janis RA. Calcium channel ligands. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1987; 27: 347-69

Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA. Molecular diversity of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Pharmacol* Sci 1991; 12: 349-354

Tsien RW, Tsien RY. Calcium channels, stores, and oscillations. Annu Rev Cell Biol 1990; <u>6</u>: 715-60

Tsien RW. Calcium channels in excitable cell membranes. Annu Rev Physiol 1983; 45: 341-58

- Turner TJ, Adams ME, Dunlap K. Calcium channels coupled to glutamate release identified by omega-Aga-IVA. *Science* 1992 ; <u>258</u> : 310-3
- Turner TJ, Dunlap K. Pharmacological characterization of presynaptic calcium channels using subsecond biochemical measurements of synaptosomal neurosecretion. *Neuropharmacology* 1995; <u>34</u>: 1469-78
- Uchitel OD, Protti DA, Sanchez V, Cherksey BD, Sugimori M, Llinas R. P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; <u>89</u>: 3330-3333

Uchitel OD. Toxins affecting calcium channels in neurons. Toxicon 1997 ; 35 : 1161-91

- Vaghy PL, McKenna E, Itagaki K, Schwartz A. Resolution of the identity of the Ca<sup>2+</sup>-antagonist receptor in skeletal muscle. *Trends Pharmacol Sci* 1988; <u>9</u>: 398-402
- Varadi G, Lory P, Schultz D, Varadi M, Schwartz A. Acceleration of activation and inactivation by the beta subunit of the skeletal muscle calcium channel. *Nature* 1991; <u>352</u>: 159-62
- Varadi G, Mori Y, Mikala G, Schwartz A. Molecular determinants of Ca<sup>2+</sup> channel function and drug action. Trends Pharmacol Sci 1995; <u>16</u>: 43-9

- Vidalenc P, Morel J-L, Mironneau J, Hugues M. <sup>125</sup>I-Labelled mapacalcine: a specific tool for a pharmacological approach to a receptor associated with a new calcium channel on mouse intestinal membranes. *Biochem. J.* 1998; <u>331</u>: 177-184
- Wagner JA, Snowman AM, Biswas A, Olivera BM, Snyder SH. Omega-conotoxin GVIA binding to a highaffinity receptor in brain: characterization, calcium sensitivity, and solubilization. J Neurosci 1988; <u>8</u>: 3354-9
- Wallace R W. What's your poison? DDT 1997 ; 2 : 359-361.
- Watanabe T, Kalasz H, Yabana H, Kuniyasu A, Mershon J, Itagaki K, Vaghy PL, Naito K, Nakayama H, Schwartz A. Azidobutyryl clentiazem, a new photoactivatable diltiazem analog, labels benzothiazepine binding sites in the alpha 1 subunit of the skeletal muscle calcium channel. *FEBS Lett* 1993; <u>334</u>: 261-4
- Westenbroek RE, Hell JW, Warner C, Dubel SJ, Snutch TP, Catterall WA. Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron* 1992; <u>9</u>: 1099-115
- Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. Roles of N-type and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 1994; 264: 107-11
- Williams ME, Feldman DH, McCue AF, Brenner R, Velicelebi G, Ellis SB, Harpold MM. Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 1992; <u>8</u>: 71-84
- Williams ME, Marubio LM, Deal CR, Hans M, Brust PF, Philipson LH, Miller RJ, Johnson EC, Harpold MM, Ellis SB. Structure and functional characterization of neuronal alpha 1E calcium channel subtypes. J Biol Chem 1994 ; 269 : 22347-57
- Yeager RE, Yoshikami D, Rivier J, Cruz LJ, Miljanich HI. Transmitter release from presynaptic terminals of electric organ: inhibition by the calcium channel antagonist omega Conus toxin. J Neurosci 1987; <u>7</u>: 2390-6
- Yu H, Rosen MK, Saccomano NA, Phillips D, Volkmann RA, Schreiber SL. Sequential assignment and structure determination of spider toxin omega-Aga-IVB. *Biochemistry* 1993; <u>32</u>: 13123-9

Wüthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids; Wiley Interscience, New York ; 1986

Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL, Tsien RW. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their possible counterparts in mammalian CNS neuropharmacology (1993); <u>32</u>: 1075-88

PARTIE II. Recherche d'un dérivé marqué à l'iode, biologiquement actif de Lqh7.1, toxine de scorpion modulant les courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants.

## **CHAPITRE 1. GENERALITES**

#### 1. 1. Les canaux chlorures

#### 1. 1. 1. Introduction

De même que les autres canaux ioniques, les canaux chlorures sont impliqués dans un grand nombre de fonctions essentielles de la physiologie cellulaire et représentent une famille très hétérogène de protéines transmembranaires. Les principales fonctions des ces canaux sont, la régulation du volume cellulaire, le contrôle du transport d'ions à travers les cellules épithéliales et la stabilisation du potentiel de membrane (Jentsch, 1993). Toutes ces fonctions différentes nécessitent la présence de plusieurs canaux chlorures distincts, exprimés différemment et régulés par divers stimuli.

Les premières conductances chlorures décrites dans la littérature, furent celles associées au récepteur de l'acide  $\gamma$  amino-butirique (GABA) et au récepteur de la glycine (Eldefrawi, A. T. et Eldefrawi, M. E., 1987). Depuis, plusieurs canaux chlorures activés par d'autres stimuli ont été caractérisés. Certains d'entre eux, sont activés par un changement de l'osmolarité extracellulaire, et régulent le volume cellulaire (Strange et al., 1996). D'autres, sont activés par le voltage et permettent à la membrane de retourner à son potentiel de repos dans le mécanisme de la contraction musculaire (Nilius et al., 1997). Par ailleurs, il existe également des canaux chlorures activés par une augmentation transitoire de calcium ou d'AMP cyclique dans le cytoplasme, (Kotlikoff et Wang, 1998).

Contrairement aux canaux cationiques (sodiques, potassiques et calciques), les connaissances sur les canaux chlorures sont beaucoup plus limitées. En effet, les premières conductances chlorures observées par les électrophysiologistes, ont longtemps été considérées comme des artefacts sans signification biologique. Aujourd'hui, l'étude de cette famille de canaux ioniques ne cesse d'évoluer. Les progrès récents des techniques de "patch clamp" ont permi de mettre en évidence l'existence de canaux chlorures dans une grande variété de cellules (Riordan, 1992 ; Jentsch, 1993 ; Valverde et al., 1995 ; Foskett, 1998). D'autre part, la découverte de l'implication de certains canaux chlorures dans des maladies héréditaires très fréquentes, telles que la mucoviscidose ou les myopathies, a fortement augmenté l'intérêt des scientifiques pour cette famille de canaux ioniques (Li et al., 1988; Alins, 1992; Koch et al., 1992; Koty et al., 1996; Fahlke et al., 1993; Cooper et Jan, 1999).

Aujourd'hui, un facteur non négligeable, qui tend à ralentir l'étude de cette famille de canaux ioniques, est le nombre restreint de ligands spécifiques et affins permettant de caractériser chaque sous-type de canal (Cabantchik et Greger, 1992). Alors que la

caractérisation moléculaire et la classification des canaux ioniques en général, ont largement bénéficié de la disponibilité de ligands spécifiques, peu de marqueurs des canaux chlorures sont aujourd'hui disponibles (Miljanich et Ramachandran., 1995).

Les principaux ligands des canaux chlorures, sont des inhibiteurs organiques, de faible spécificité et de faible affinité, tel que DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2-2'-disulfonic acid) ou le DNDS (4,4'-dinitrostilbene-2,2'disulfonic acid) (Gögelein et Pfannmüller, 1988; Inoue, 1986). D'autres inhibiteurs organiques plus affins ont été développés, cependant leurs propriétés lipophiles limitent leur utilité. C'est le cas du NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid) (Dreinhöfer et al., 1988; Gögelein, 1988; Wangemann et al., 1986). Aujourd'hui, la chlorotoxine représente le seul ligand des canaux chlorures de bonne affinité. En effet, cette toxine, isolée du venin de scorpion *Leiurus quinquestriatus* Quinquestriatus, présente une affinité 100 fois supérieure à celle des ligands organiques et agit à des doses de l'ordre du nanomolaire (DeBin et al., 1993; Ullrich et Sontheimer, 1996; Ullrich et al., 1996; Soroceanu et al., 1998).

Actuellement, la classification des canaux chlorures la plus couramment utilisée, est basée sur la structure moléculaire des ces canaux ioniques. Ainsi, quatre classes principales de canaux chlorures ont été identifiées par clonage moléculaire (Jentsch et Günther, 1996).

#### 1. 1. 2. Structure et classification des canaux chlorures

La structure des canaux chlorures est très différente de celles des canaux cationiques (sodiques, potassiques et calciques). D'autre part, il existe très peu d'homologies structurales entre les différentes classes de canaux chlorures (Jentsch et Günther, 1996). La figure 1 présente la structure moléculaire des trois classes de canaux chlorures les mieux connues.

Les premières données structurales des canaux chlorures ont été obtenues à partir des canaux chlorures associés aux récepteurs du GABA et de la glycine. Ils représentent la première classe de canaux chlorures. Ces canaux sont des pentamers de sous-unités homologues possédant chacune quatre domaines transmembranaires (M1 à M4) (Betz, 1991; Rabow et al., 1995) (Figure 1), le pore du canal étant probablement situé au niveau du domaine M2. Ces canaux sont principalement localisés sur les neurones au niveau des synapses inhibitrices.

La deuxième classe est représentée par les canaux chlorures CFTR (cystic fibrosis transmembranes regulator), dont le dysfonctionnement est à l'origine de la mucoviscidose. Ces canaux possèdent cinq domaines, dont deux domaines homologues reliés, de six segments transmembranaires (TM1 à TM12). Ces deux domaines forment le pore du canal. Les trois autres domaines sont associés à ce canal. L'un d'entre eux, est un domaine régulateur et les deux autres sont des récepteurs de nucléotides (Riordan et al., 1989; Sheppard et Welsh. 1999).

La troisième classe de canaux chlorures est la famille des canaux chlorures ClC (Chloride channel). Cette famille est la plus représentée. Neufs gènes différents, de ClC-1 à ClC-9 appartenant à cette classe, ont été clonés. Chaque gène est exprimé suivant sa localisation

tissulaire et possède des caractéristiques fonctionnelles diverses (Jentsch, 1995). Ces canaux sont constitués de deux domaines contenant chacun de 10 à 12 segments transmembranaires (D1 à D12). Il a été montré que chacun de ces deux domaines forme un pore indépendant (Fahlke et al., 1998 ; Devidas et Guggino, 1997; Jentsch, 1996; Jentsch et al., 1999).

Enfin, récemment une quatrième classe de canaux chlorures a été décrite. Cette classe est constituée de canaux chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants: CICA (Calcium-activated chloride channel) (Ran et al., 1992; Ran et Benos, 1992; Gruber et al., 1998 ; Agnel et al., 1999). Les données structurales de cette famille de canaux chlorures sont très récentes et encore controversées. Toutefois, il semblerait que ces canaux soient constitués de cinq domaines transmembranaires (Elble et al., 1997 ; Gruber et al., 1998, 1999).



Figure 1. Schémas de la topologie des canaux chlorures. (a) canaux chlorures activés par le GABA et la glycine, (b) canaux chlorures CFTR (c), canaux chlorures ClC. Ce schéma a été tiré de la revue de Jentsch et Günther (1996).

#### 1. 2. Diversité des toxines de scorpions.

A l'heure actuelle, les venins de scorpions sont les mieux caractérisées et sont essentiellement reconnus pour leurs toxines ayant pour cibles des canaux sodiques et des canaux potassiques (Ménez et Dauplais, 1997). Cependant, il a récemment été montré que cette espèce animale ne produisait pas seulement des toxines dirigées contre ces canaux ioniques. En effet, des toxines de scorpions ayant pour cible spécifique les canaux calciques (Chuang et al., 1998) ou encore les canaux chlorures (DeBin et al., 1993) ont récemment été caractérisées. D'autre part, il existe également dans ces venins, des toxines dont la cible spécifique n'a pas encore été clairement établie (Tytgat et al., 1998).

Les toxines de scorpions sont très diverses. Certaines d'entre elles, sont des toxines à chaîne longue, de 60 à 70 résidus d'acides aminés. Celles-ci sont essentiellement ciblées contre les canaux sodiques (Rochat et al., 1979; Darbon et al., 1982; Gordon et al., 1998). D'autres toxines possèdent une chaîne polypeptidique beaucoup plus courte, de 30 à 40 résidus d'acides aminés. Ces dernières sont essentiellement dirigées contre des canaux potassiques (Gimenez-Gallego et al., 1988; Galvez et al., 1990; Martins et al., 1990; Zerrouk et al., 1993).

#### 1. 2. 1. Les toxines agissant sur les canaux sodiques.

Les toxines de scorpions modulant l'activité des canaux sodiques furent les premières décrites (Miranda et al., 1961; Rochat et al., 1970, 1972). Ces toxines sont des protéines de 60 à 70 résidus d'acides aminés à 4 ponts disulfure (Kopeyan et al., 1974; Rochat et al., 1979). Certaines d'entre elles, agissent spécifiquement sur les canaux sodiques de mammifères, et d'autres spécifiquement sur ceux des insectes (Goyffon et Landon, 1998). Toutefois, dans certains cas cette spécificité n'est pas absolue et les toxines agissant chez les mammifères peuvent avoir une activité chez les insectes (De Dianous et al., 1987; Gordon et al., 1996; Legros et Martin-Eauclaire, 1997; Sautière et al., 1998). Les séquences primaires de quelques toxines agissant sur les canaux sodiques sont présentées dans la figure 2.

Les toxines agissant sur les canaux sodiques des mammifères sont divisées en deux groupes: toxines  $\alpha$  et toxines  $\beta$ , selon leur mode d'action (Gordon et al., 1997 et 1998).

• Les toxines  $\alpha$  bloquent les canaux sodiques en ralentissant l'inactivation du canal (Couraud et al., 1982). Elles se fixent spécifiquement sur le "site 3" du canal sodique. Toutefois, des toxines agissant de la même manière que ces toxines, mais ne possédant pas le même site de fixation ont récemment été identifiées et regroupées sous le terme de toxines  $\alpha$ -like (Gordon et al;, 1996; Sautière et al., 1998).

Les toxines  $\alpha$  et  $\alpha$ -like sont essentiellement isolées des venins de scorpions des genres Androctonus, Buthus et Leiurus (Legros et Martin-Eauclaire, 1997). Peuvent être citées, la toxine AaH II, extraite d'Androctonus australis Hector et les toxines LqqIV, LqqV, extraites de *Leiurus quinquestriatus* Quinquestriatus qui sont des toxines  $\alpha$ . La toxine Bom III et Lqh III sont des toxines  $\alpha$ -like, et ont été isolées respectivement des venins de *Buthus occitanus* Mardochei et de *Leiurus quinquestriatus* Hebraeus (Rochat et al., 1972; Kopeyan et al., 1978, 1979; Gordon et al., 1996; Sautière et al., 1998).

• Les toxines  $\beta$  quant à elles, perturbent la cinétique d'activation du canal sodique. Elles provoquent l'ouverture et la fermeture répétitive du canal (Simard et Watt., 1990). Celles-ci se fixent sur le "site 4" du canal. La plupart de ces toxines ont été isolées des venins de scorpion du genre *Centruroides* et *Tityus*.

A titre d'exemple, ce groupe renferme: la TsVII extraite du venin de *Tityus serrulatus* (Bechis et al., 1984), la Cn2 extraite du venin de *Centruroïdes noxius* (Selisko et al., 1996), et la CsE-I du venin de *Centruroïdes sculpturatus* Ewing (Jablonsky et al., 1999).

Afin de différencier les toxines agissant sur les canaux sodiques d'insectes, de celles actives chez les mammifères, celles-ci ont été regroupées sous le terme de *longues insectotoxines* (60 à 70 résidus) (Zlotkin et al., 1978; Gordon et al., 1998). Ces longues insectotoxines sont essentiellement isolées des venins d'Androctonus et de Leiurus. Les plus connues sont: AaH IT extraite d'Androctonus australis Hector, Lqq IT1 extraite de Leiurus quinquestriatus Quinquestriatus (Kopeyan et al., 1990; Darbon et al., 1982)

Enfin, de nombreuses toxines agissant à la fois sur les canaux sodiques de mammifères et d'insectes ont été isolées. C'est le cas de l'AaH IT4 extaite du venin *d'Androctonus australis* Hector et des toxines Lqh II et III, extraites du venin de *Leiurus quinquestriatus* Hebraeus (Loret et al., 1991; Sautière et al., 1998).

AaH II	-	v	< t	G	Y	1	νī	) C	) v	N	С	lτ	Y	F	C	GF	R I	A P		_	_ •	Y	Ē	Е	Е	C	Īτ	κ	L	к	G	_	_	E	s (	GΥ	c	þ	w	A	s	P١	<b>,</b> (	5 N	A	c	Υ	С	ΥI	ι	Р	D	н	VF	ł۲	ĸ	G	P	-	G		R	c	H						
Log IV	G	vŧ	۲	• •	Y	t	A I	) E	×к	N	c	v	Y	т	c	G S	5 1	٩s	_		_ •	Y	: h	т	Е	c	Π	ĸ	N	G	A	_	_	E	s (	GΥ	c	þ	w	L	G	к١	r c	3 N	A	С	w	с	1	сL	P	D	ĸ	VF	<b>)</b> 1	R	. 1	Р	_	G		ĸ	c	R						
LqqV	-	LI	( [	, G	Y	I	vı	) t	к	N	c	т	F	F	С	J P	2 1	N A	-		- '	۲þ	:h	t	E	С	ĸ	ĸ	к	G	G	_	-	E	s (	GΥ	С	þ	w	A	s	ΡŊ	4 0	3 N	A	с	w	с	YI	( L	P	D	R	v s	5 1	ĸ	E	к	-	G	-	R	c	N						
Lqh M	-	v	۲C	G	Y	T	A (	γP	е	N	c	v	Y	н	с	F	P (	5 S	s	_	_ (	G	: þ	т	L	c	ĸ	E	к	G	G		_	т	s (	GН	c	b	F	к	v	Gι	4 (	БL	A	с	w	c	N /	۱L	P	D	N	v	5 1	1	v	-	Е	G	E	к	с	н :	5					
Bom III	-	GI	۲.	G	Y	1	A (	ŞΡ	E	N	c	v	Y	н	c	FF	, (	5 S	S	-	- (	G	: Þ	r (	L	с	ĸ	E	ĸ	G	A	-	-	т	S (	GH	c	c	F	L	P	GS	5 (	sν	A	с	w	c	וס	V L	P	N	ĸ	VB	P 1	v	v	~	G	G	E	ĸ	С	н						
Ts VII	-	ĸ	5 C	; Y	L	м	•	1 6		G	c	ĸ	ι	s	c	F I	1	R P	s	G	_ ·	y þ	ck	P	Е	с	G	1	к	к	G	_	-	s	s (	GΥ	þ	k	w	P	_				A	с	Y	c	Y (	3 L	P	N	w	v	ĸν	/ W	۷D	R	A	т	N	ĸ	c							
Cn2	_	ĸŧ	6	Y	L	v	D	C N	IΤ	G	c	к	Y	Е	С	i P	κ ι	, G	D	Ν	D.	Υþ	րի	R	E	С	ĸ	Q	Q	Y	G	к	G	Α	G (	GΥ	¢	Y	Α	F	_				Α	C	w	С	τi	łι	Y	Е	Q.	A I	V	/ 14	/ P	L	P	Ν	ĸ	R	С	s						
CsE-I	-	ĸ	0	Y	L	v	EI	<u>-</u> ۲	т	G	c	к	ĸ	T	С	¥ Þ	¢٦	. G	E	N	D	F	=ħ	P	E	с	ĸ	w	ĸ	H	1	G	G	s	Y	GΥ	c	ľ	G	F	-				G	С	Y	С	E (	5 L	P	D	5	го	τç	· W	/ P	L	P	N	ĸ	T	С							
AaH IT4				E	н	G	γι	. г	. т	G	c	к	v	w	c	v I		• •	E	Е		_	e o	• •	Ľ	$\mathbf{c}$	N	ĸ	R	R	G	G	Y		y (	GΥ	c	Y	F	w	ĸ	ι_				$\mathbf{c}$	Y	с	Q (	3 A	R	ĸ	s :	Еt	. v	V N	I Y	к	_	т	N	ĸ	$\mathbf{c}$	D	ι					
Lqg 111	_	VF	t D	A	Y	1	A #	C N	łγ	N	İc	v	Y	Е	сİ	F F	х I	> 5	-	_	_ '	y þ	zh	t t	L	c	Т	к	N	G	А	s	s	_	_ (	GΥ	c	b	w	A	G	ĸч	r c	3 N	A	íci	w	сİ	Y	۱L	Р	D	N	v	P 1	R	v	_	_	Р	G	ĸ	$\mathbf{c}$	н						
Lqh II	-	1 1	C	G	Y	1	V E	) C	) v	N	c	т	Y	F	С	3 F	2 7	N A	-	-	- `	Y	:h	E	E	с	r	K	L	ĸ	G	Е	S	-	_ (	GΥ	c	þ	w	A	s	ΡÌ	Ŷ	ЗN	A	С	Y	c	נץ	C L	Р	D	н	V	łТ	ĸ	G	_	_	P	G	R	c	R						
															1																								_																										-	_				
AaH IT		ĸ	C N	G	Y	A	v t	> s	s	G	к	A	P	Е	c	L I	. 5	N N	·	_	_ '	Y þ	: þ	N	Q	С	ÌΤ	к	v	н	Y	А	D	к	_ (	GΥ	¢	c	L	L	s				-	C	Y	с	FO	ՏԼ	N	D	D	К	κv	/ L	E	1	S	D	T	R	K :	S	чİс	:þ	т	тι	í I	Ν
Lqq TT1	-	ĸι	C N	G	Y	A	vτ	o s	S	G	ĸ	A	P	Е	c	i 1	. 5	S N	~		- '	Y k	<u> </u>	N	E	c	Jт	ĸ	ν	H	Y	A	D	к	_ (	GΥ	Ē	c	L	L	S				_	ç	Y	<u>c</u>	v (	3 L	S	D	D	К	ĸν	/ L	в	I	s	D	A	R	ĸ	ĸ	y <u>b</u>	<u>.</u> b	F	<b>v</b> 7	ΓJ	N
kurtoxine		ĸI	t	G	Y	P	vt	) Y	' W	/ N	c	ļк	R	τĮ	c	<b>ب</b> ۷	/ 1	N N	ĸ	-	- `	Y E		t	L	с	ĸ	G	L	ĸ	A	D	5	-	_ (	GΥ	c	₯	G	w	T	ι_			s	с	Y	с	Q (	ΓL	P	D	Ń	A I	RI	ĸ	÷	-	R	s	G	R	c	R	A					

Figure 2. Séquences primaires de toxines agissant sur les canaux sodiques. AaH II, AaH IT4, AaH IT, sont des toxines isolées du venin d'Androctunus australis Hector ; Lqq IV LqqV, Lqq III et LqqIT1 sont des toxines isolées du venin de Leiurus quinquestriatus Quinquestriatus ; Lqh II est une toxine isolée du venin de Leiurus quinquestriatus Hebraeus ; Bom III est une toxine isolée du venin de Buthus occitanus Mardochei ; Ts VII est une toxine isolée du venin de Tityus serrulatus ; Cn2 est une toxine isolée du venin de Centruroïdes noxius et CsE-I est une toxine isolée du venin de Centruroïdes sculpturatus Ewing. La kurtoxine est une toxine agissant sur les canaux calciques de type T-, présentant des homologies de séquences avec les toxines ayant pour cible les canaux sodiques. Cette toxine est isolée du venin de scorpion Parabuthus transvaalicus.

#### 1. 2. 2. Les toxines agissant sur les canaux potassiques.

Les toxines agissant sur les canaux potassiques sont des protéines beaucoup plus courtes que les toxines actives sur les canaux sodiques. Celles-ci possèdent de 30 à 40 résidus d'acides aminés (Possani et al., 1982; Miller., 1995). Les premières toxines décrites, ne possèdaient que trois ponts disulfure. Récemment, des toxines courtes à quatre ponts disulfure ont été isolées (Kharrat et al., 1997; Olamendi-Portugal et al., 1998; Novello et al., 1999). La figure 3 présente un alignement de séquence entre quelques toxines de scorpions agissant sur les canaux potassiques.

				A T	F V	C C	-	N N	L L	R I R I	м ( R		ζL L	s s	c c	R R	S S	L L	G G	L L	L _ L _	-	G G	_ I _ I		: I	G G	D V	K K	c c	E E	c c	ŀ	K K	н Н	
Q	F	т	N	v	s	с	т	т	s	ки	Ξk		٧S	v	с	Q	R	L	н	N	тs	R	G	_ 1		: м	N	к	к	c	R	c	Y	s		
Q	F	T	D	v	D	С	s	v	s	κı	εk	2	<b>W</b> S	v	¢	к	D	L	F	G	VE	R	G	_ 1	¢	M	G	K	K	¢	R	с	Y	Ç	2	
т	I	1	N	v	к	с	Т	s	P	к	2 4		5 к	P	c	к	E	L	т	G.	s s	A	G	AB		: м	N	G	к	c	к	c	Y	N	N	
Т	I	I	N	v	к	с	г	S	P	K	2 k	:	. P	P	c	к	A	Q	F	G	Q S	A	G	AI	٢þ	M	N	G	к	c	ĸ	c	Y	Р	Н	
v	Е	I	N	v	к	с	s	G	s :	P	2	: <b> </b>	. к	Р	c	к	_	D	A	G.	M R	F	G	_ 1		: м	N	R	ĸ	c	н	c	Г	P	к	
Р	v	I	N	v	к	с	т	G	S	P	۶k	;	. к	P	c	ĸ	-	D	A	G	M R	F	G	_ F	٢¢	ŀ	N	G	к	c	н	c	h	P	K	
			L	v v	к s	с с	R T	G G	T S	S I k I			G R ( A	P P	c c	QR	Q K	Q G	T T	G G	C P C P	N N	-	S H A H			N N	R K	M S	c c	K K	c c	Y Y	G	c c	
	Q Q T T V P	Q F Q F T I T I V E P V	Q F T Q F T T I I T I I V E I P V I	Q F T N Q F T D T I I N T I I N V E I N P V I N	A T QFTVV FTVV TIIVV VEINV PVINV LV V	A F T V Q F T N V S Q F T D V D T I I N V K T I I N V K V E I N V K P V I N V K L V K V S	AFC TVC QFTNVSC QFTDVDC TIINVKC TIINVKC VEINVKC PVINVKC LVKC VSC	A F C L T V C L Q F T N V S C T Q F T D V D C S T I I N V K C T T I I N V K C T V E I N V K C S P V I N V K C T L V K C R V S C T	$\begin{array}{c} A F C \\ T V C \\ N \end{array}$ $\begin{array}{c} P T V C \\ P T V C \\ V \\ V$	$\begin{array}{c} \mathbf{A} \ \mathbf{F} \ \mathbf{C} \ \mathbf{L} \ \mathbf{N} \ \mathbf{L} \\ \mathbf{T} \ \mathbf{V} \ \mathbf{C} \ \mathbf{C} \ \mathbf{N} \ \mathbf{L} \\ \mathbf{V} \ \mathbf{C} \ \mathbf{C} \ \mathbf{T} \ \mathbf{S} \\ \mathbf{Q} \ \mathbf{F} \ \mathbf{T} \ \mathbf{N} \ \mathbf{V} \ \mathbf{S} \ \mathbf{C} \ \mathbf{T} \ \mathbf{T} \ \mathbf{S} \\ \mathbf{Q} \ \mathbf{F} \ \mathbf{T} \ \mathbf{D} \ \mathbf{V} \ \mathbf{D} \ \mathbf{C} \ \mathbf{S} \ \mathbf{V} \ \mathbf{S} \\ \mathbf{T} \ \mathbf{I} \ \mathbf{I} \ \mathbf{N} \ \mathbf{V} \ \mathbf{K} \ \mathbf{C} \ \mathbf{T} \ \mathbf{S} \ \mathbf{P} \\ \mathbf{V} \ \mathbf{E} \ \mathbf{I} \ \mathbf{N} \ \mathbf{V} \ \mathbf{K} \ \mathbf{C} \ \mathbf{C} \ \mathbf{S} \ \mathbf{G} \ \mathbf{S} \\ \mathbf{P} \ \mathbf{V} \ \mathbf{I} \ \mathbf{N} \ \mathbf{V} \ \mathbf{K} \ \mathbf{C} \ \mathbf{T} \ \mathbf{G} \ \mathbf{S} \\ \mathbf{L} \ \mathbf{V} \ \mathbf{K} \ \mathbf{C} \ \mathbf{R} \ \mathbf{G} \ \mathbf{T} \ \mathbf{G} \ \mathbf{S} \\ \mathbf{L} \ \mathbf{V} \ \mathbf{K} \ \mathbf{C} \ \mathbf{C} \ \mathbf{R} \ \mathbf{G} \ \mathbf{T} \ \mathbf{S} \\ \mathbf{S} \ \mathbf{C} \ \mathbf{T} \ \mathbf{G} \ \mathbf{S} \end{array}$	A F C L N L R I T V C _ N L R I Q F T N V S C T T S K I Q F T D V D C S V S K I T I I N V K C T S P K C T I I N V K C T S P K C V E I N V K C S G S P C P V I N V K C T G S P C L V K C R G T S I V S C T G S K I	A F C L N L R M T V C L N L R R Q F T N V S C T T S K E Q F T D V D C S V S K E T I I N V K C T S P K Q V E I N V K C T S P K Q V E I N V K C T S G S P Q V U N V K C T G S P Q L V K C R G T S D V S C T G S K D	AFCLNLRMCK TVCLNLRRCK QFTNVSCTTSKEC QFTDVDCSVSKEC TIINVKCTSPKQCS TIINVKCTSPKQCS VEINVKCTGSPQCI VEINVKCTGSPQCI LVKCRGTSDC VSCTGSKDC	AFCLNLRMCQL TVCLNLRRCQL QFTNVSCTTSKECWS QFTDVDCSVSKECWS TIINVKCTSPKQCSK TIINVKCTSPKQCLP VEINVKCSGSPQCLK PVINVKCTGSPQCLK LVKCRGTSDCGR VSCTGSKDCYA	A F C L N L R M C Q L S T V C N L R R C Q L S Q F T N V S C T T S K E C WS V Q F T D V D C S V S K E C WS V T I I N V K C T S P K Q C S K P T I I N V K C T S P K Q C L P V E I N V K C S G S P Q C L K P V V I N V K C T G S P Q C L K P L V K C R G T S D C G R P V S C T G S K D C Y A P	AFCLNLRMCQLSC TVCLNLRRCQLSC QFTNVSCTTSKECWSVC QFTDVDCSVSKECWSVC TIINVKCTSPKQCSKPC TIINVKCTSPKQCLPPC VEINVKCSGSPQCLKPC PVINVKCTGSPQCLKPC LVKCRGTSDCGRPC VSCTGSKDCYAPC	A F C _ N L R M C Q L S C R T V C _ N L R R C Q L S C R Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q Q F T D V D C S V S K E C WS V C K T I I N V K C T S P K Q C S K P C K T I I N V K C T S P K Q C L P P C K V E I N V K C S G S P Q C L K P C K P V I N V K C T G S P Q C L K P C K L V K C R G T S D C G R P C Q V S C T G S K D C Y A P C R	A F C L N L R M C Q L S C R S T V C _ N L R R C Q L S C R S Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E T I I N V K C T S P K Q C L P P C K A V E I N V K C S G S P Q C L K P C K _ P V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ L V K C R G T S D C G R P C Q Q V S C T G S K D C Y A P C R K	A F C L N L R M C Q L S C R S L T V C _ N L R R C Q L S C R S L Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T I I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q V E I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D P V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D L V K C R G T S D C G R P C Q Q Q V S C T G S K D C Y A P C R K G	A F C L N L R M C Q L S C R S L G T V C L N L R R C Q L S C R S L G Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L H Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L F T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T T I I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q F V E I N V K C S G S P Q C L K P C K D A P V I N V K C T G S P Q C L K P C K D A L V K C R G T S D C G R P C Q Q Q T V S C T G S K D C Y A P C R K G T	A F C _ N L R M C Q L S C R S L G L T V C _ N L R R C Q L S C R S L G L Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L H N Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L F G T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T G T I I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q F G V E I N V K C S G S P Q C L K P C K _ D A G P V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G L V K C R G T S D C G R P C Q Q T G V S C T G S K D C Y A P C R K G T G	AFC_NLRMCQLSCRSLGLL TVC_NLRRCQLSCRSLGLL QFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTS QFTDVDCSVSKECWSVCKDLFGVC TIINVKCTSPKQCSKPCKELTGSS TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQS VEINVKCTGSPQCLKPCK_DAGMR PVINVKCTGSPQCLKPCK_DAGMR LVKCRGTSDCGRPCQQTGCP VSCTGSKDCYAPCRKGTGCP	A F C _ N L R M C Q L S C R S L G L L T V C _ N L R R C Q L S C R S L G L L Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L H N T S R Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L F G V D R T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T G S S A T I I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q F G Q S A V E I N V K C S G S P Q C L K P C K _ D A G M R F P V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F L V K C R G T S D C G R P C Q Q T G C P N V S C T G S K D C Y A P C R K G T G C P N	A F C _ N L R M C Q L S C R S L G L L G T V C _ N L R R C Q L S C R S L G L L G Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L H N T S R G Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L F G V D R G T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T G S S A G T I I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q F G Q S A G V E I N V K C S G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G P V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G L V K C R G T S D C G R P C Q Q T G C P N _ V S C T G S K D C Y A P C R K G T G C P N _	A F C _ N L R M C Q L S C R S L G L L _ G _ H T V C _ N L R R C Q L S C R S L G L L _ G _ H Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L H N T S R G _ H Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L F G V D R G _ H T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T G S S A G A H T I I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q F G Q S A G A H V E I N V K C S G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ H P V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ H L V K C R G T S D C G R P C Q Q T G C P N _ S H V S C T G S K D C Y A P C R K G T G C P N _ A H	A F C _ N L R M C Q L S C R S L G L L G _ K C T V C _ N L R R C Q L S C R S L G L L G _ K C Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L H N T S R G _ K C Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L F G V D R G _ K C T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T G S S A G A K C T I I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q F G Q S A G A K C V E I N V K C S G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C P V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C L V K C R G T S D C G R P C Q Q T G C P N _ S K C V S C T G S K D C Y A P C R K G T G C P N _ A K C	A F C _ N L R M C Q L S C R S L G L L G _ K C I T V C _ N L R R C Q L S C R S L G L L G _ K C I Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L H N T S R G _ K C M Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L F G V D R G _ K C M T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T G S S A G A K C M T I I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q F G Q S A G A K C M V E I N V K C S G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C M V E I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C M V V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C I L V K C R G T S D C G R P C Q Q T G C P N _ S K C I V S C T G S K D C Y A P C R K G T G C P N _ A K C I	A F C _ N L R M C Q L S C R S L G L L G _ K C L G T V C _ N L R R C Q L S C R S L G L L G _ K C I G Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L H N T S R G _ K C M N Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L F G V D R G _ K C M G T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T G S S A G A K C M N T I I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q F G Q S A G A K C M N V E I N V K C S G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C M N V E I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C M N V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C I N L V K C R G T S D C G R P C Q Q T G C P N _ S K C I N V S C T G S K D C Y A P C R K G T G C P N _ A K C I N	A F C _ N L R M C Q L S C R S L G L L G _ K C I G D T V C _ N L R R C Q L S C R S L G L L G _ K C I G V Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L H N T S R G _ K C M N K Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L F G V D R G _ K C M G K T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T G S S A G A K C M N G T I I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q F G Q S A G A K C M N G V E I N V K C S G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C M N R P V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C I N R L V K C R G T S D C G R P C Q Q T G C P N _ S K C I N R V S C T G S K D C Y A P C R K G T G C P N _ A K C I N K	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 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 Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L H N T S R G _ K C M N K K Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L F G V D R G _ K C M N G K T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T G S S A G A K C M N G K T I I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q F G Q S A G A K C M N G K V E I N V K C S G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C M N R K P V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C I N R M V E I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C I N R K P V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C I N R M V S C T G S K D C G R P C Q Q T G C P N _ S K C I N R M V S C T G S K D C Y A P C R K G T G C P N _ A K C I N K S	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 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 Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L H N T S R G _ K C M N K K C Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L F G V D R G _ K C M G K K C T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T G S S A G A K C M N G K C T I I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q F G Q S A G A K C M N G K C V E I N V K C S G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C M N R K C P V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C I N G K C L V K C R G T S D C G R P C Q Q T G C P N _ S K C I N R M C V S C T G S K D C Y A P C R K G T G C P N _ A K C I N K S C	A F C _ N L R MC Q L S C R S L G L L G _ K C I G D K C E 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 Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L H N T S R G _ K C MN K K C R Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L F G V D R G _ K C MG K K C R T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T G S S A G A K C MN G K C K T I I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q F G Q S A G A K C MN G K C K V E I N V K C S G S P Q C L K P C K _ D A G MR F G _ K C MN R K C H P V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G MR F G _ K C I N R K C H L V K C R G T S D C G R P C Q Q T G C P N _ S K C I N R M C K V S C T G S K D C Y A P C R K G T G C P N _ A K C I N K S C K	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 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 Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L H N T S R G _ K C M N K K C R C Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L F G V D R G _ K C M N G K C K C T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T G S S A G A K C M N G K C K C T I I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q F G Q S A G A K C M N G K C K C V E I N V K C S G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C M N R K C H C P V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C I N R K C H C L V K C R G T S D C G R P C Q Q T G C P N _ S K C I N R M C K C V S C T G S K D C Y A P C R K G T G C P N _ A K C I N R S C K C	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 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 Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L H N T S R G _ K C M N K K C R C Y Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L F G V D R G _ K C M N G K C R C Y T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T G S S A G A K C M N G K C K C Y T I I N V K C T S P K Q C S K P C K A Q F G Q S A G A K C M N G K C K C Y V E I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q F G Q S A G A K C M N G K C K C Y V E I N V K C T S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C M N R K C H C T P V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C I N G K C H C T L V K C R G T S D C G R P C Q Q T G C P N _ S K C I N R M C K C Y V S C T G S K D C Y A P C R K G T G C P N _ A K C I N K S C K C Y	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 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 Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L H N T S R G _ K C M N K K C R C Y G Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L F G V D R G _ K C M G K K C R C Y G T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T G S S A G A K C M N G K C K C Y P V E I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q F G Q S A G A K C M N G K C K C Y P V E I N V K C S G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C M N R K C H C T P P V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C I N G K C K C Y G L V K C R G T S D C G R P C Q Q T G C P N _ S K C I N R M C K C Y G V S C T G S K D C Y A P C R K G T G C P N _ A K C I N K S C K C Y G	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 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 Q F T N V S C T T S K E C WS V C Q R L H N T S R G _ K C M N K K C R C Y S Q F T D V D C S V S K E C WS V C K D L F G V D R G _ K C M G K K C R C Y Q T I I N V K C T S P K Q C S K P C K E L T G S S A G A K C M N G K C K C Y N N T I I N V K C T S P K Q C L P P C K A Q F G Q S A G A K C M N G K C K C Y P H V E I N V K C S G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C M N R K C H C T P K P V I N V K C T G S P Q C L K P C K _ D A G M R F G _ K C I N G K C K C Y G C L V K C R G T S D C G R P C Q Q Q T G C P N _ S K C I N R M C K C Y G C V S C T G S K D C Y A P C R K G T G C P N _ A K C I N K S C K C Y G C

Figure 3. Alignement de séquences de toxines agissant sur les canaux potassiques.

## a. Les toxines à trois ponts disulfure

Les toxines de scorpions à trois ponts disulfure sont très diverses et agissent spécifiquement sur différents sous-types de canaux potassiques voltage-dépendants et  $Ca^{2+}$ -dépendants. Ces toxines sont classées en quatre groupes selon leur sélectivité et leurs homologies de séquence.

Le premier groupe est constitué de toxines ayant une haute spécificité pour les canaux potassiques Ca<sup>2+</sup>-dépendants de petite conductance. Ces toxines ont la particularité de posséder une chaîne polypeptidique très courte ne comptant que de 29 à 35 acides aminés. Les toxines les plus connues de ce groupe sont: la scyllatoxine (ou leiurotoxine I), isolée du venin de *Leiurus quinquestriatus* (Chicchi et al., 1988), et la toxine PO5 d'*Androctonus mauretanicus* (Zerrouk et al., 1993)

Les 3 autres groupes ont une spécificité moins étroite que le précédent et peuvent agir à la fois sur les canaux potassiques Ca<sup>2+</sup>-dépendants de large conductance (maxi-K) et sur différents sous-types de canaux potassiques voltage-dépendants (Smith et al., 1986; MacKinnon et al., 1988; Lewis et al;, 1988; Schweitz et al., 1989; Stühmer et al., 1989). Ces toxines sont plus particulièrement classées en fonction de leur degré d'homologie. Il existe:

Le groupe de la charybdotoxine (CTX), qui représente la toxine la plus étudiée (Miller et al., 1985; Gimenez-Gallego et al., 1988). L'iberiotoxine extraite du venin *Buthus talamus* (Galvez et al., 1990; Johnson et al., 1992), appartient à ce groupe et possède 67% d'homologie avec la charybdotoxine.

Le groupe de la noxiustoxine (NTX), toxine isolée du venin de Centruroides noxius Hoffmann (Carbone et al., 1982, 1987; Possani et al., 1982). Appartient également à ce groupe, la margatoxine isolée du venin de Centruroides margaritatus (Garcia-Calvo et al., 1993). Ces deux toxines possèdent 79% d'homologies entre elles.

Enfin, le dernier groupe de toxines à trois ponts disulfure est constitué des *kaliotoxines* et des agitoxines. Ce groupe est très homogène avec des toxines dont les séquences partagent plus de 70 % d'homologies.

## b. Les toxines à quatre ponts disulfure

Les toxines courtes à quatre ponts disulfure forment un groupe qui a récemment été décrit. Elles ont pour cible, les canaux potassiques voltage-dépendants mais également, les canaux potassiques Ca<sup>2+</sup>-dépendants de petite conductance. La Pi1 isolée du venin *Pandinus imperator* (Olamendi-Portugal et al., 1996) fut la première décrite. Aujourd'hui, d'autres toxines ont été caractérisées. C'est le cas de la maurotoxine extraite du venin de scorpion *Maurus* (Kharrat et al., 1997), et de la HsTX1 extraite de scorpion *Heterometrus spinnifer* (Lebrun et al., 1997).

#### 1. 2. 3. Les toxines agissant sur les canaux calciques

Les venins de scorpions produisent également des toxines agissant sur les canaux calciques. En effet, des toxines affectant les canaux calciques ryanodine-dépendants du réticulum sarcoplasmique, ont été identifiées à partir de ces venins. En particulier, un activateur et un inhibiteur de ces canaux calciques intracellulaires ont été isolés du venin de *Pandinus imperator* (Valdivia et al., 1992).

D'autre part, une toxine agissant cette fois sur les canaux calciques voltage-dépendants, a également été isolée. Cette toxine, nommée kurtoxine, possède la particularité d'inhiber, avec une bonne affinité les canaux calciques de type T- exprimé par le gène  $\alpha_{1G}$  (Chuang et al., 1998). Jusqu'à aujourd'hui, aucun ligand naturel spécifique des canaux calciques de type T- n'a été isolé des venins animaux, et en particulier des venins de cônes marins et d'araignées pourtant connus pour produire des toxines ciblées contre les canaux calciques. Cette toxine de 63 résidus d'acides aminés à 4 ponts disulfure possède cependant une activité résiduelle sur les canaux sodiques, et sa séquence primaire se rapproche de celles des toxines agissant sur les canaux sodiques (Figure 2).

## 1. 2. 4. Une toxine agissant sur les canaux chlorures.

Une toxine inhibant sélectivement des canaux chlorures, a été isolée du venin de *Leiurus quinquestriatus* Quinquestriatus (DeBin et al., 1993). L'activité de cette toxine nommée chlorotoxine a dans un premier temps été mise en évidence sur des cellules de l'épithélium de côlon de rats sur des courants chlorures de petites conductances (DeBin et al., 1991, 1993). Bien qu'il fut décrit que la chlorotoxine n'inhibait les courants chlorures qu'à la suite d'une application sur la face interne de la cellule de la toxine, il a été démontré qu'elle était capable d'inhiber avec une très bonne affinité des courants chlorures sélectivement exprimés à la surface des cellules gliomiales humaines en agissant sur la face externe du canal (Ullrich et al., 1996; Soroceanu et al., 1998).

La chlorotoxine possède 36 résidus d'acides aminés et quatre ponts disulfure. Cette toxine présente très peu d'homologies de séquence avec les toxines de scorpions décrites cidessus, et plus particulièrement avec les toxines à chaîne courte agissant sur les canaux potassiques. Toutefois, elle partage un certain nombre d'homologies de séquence avec les insectotoxines à chaîne courte décrites ci-dessous.

#### 1. 2. 5. Les insectotoxines à chaîne courte de cible non définie

Les insectotoxines à chaîne courte ont une activité paralysante chez l'insecte. Pour le moment, leur cible spécifique n'est pas encore clairement définie. Il semblerait, qu'elles agissent sur les récepteurs au glutamate des membranes postsynaptiques (Zhdanova et al., 1978; Grishin et al., 1982).

Les insectotoxines possède 34 à 37 acides aminés et 4 ponts disulfure. Elles partagent de très fortes homologies entre elles (Figure 4). De nombreuses toxines de ce groupe ont été isolées: la toxine AmmP2 extraite du venin d'*Androctonus mauretanicus*, la toxine I<sub>5</sub>A extraite du venin de *Buthus eupeus*; le peptide IBs extrait du venin de *Buthus sindicus* et Lqh8.6 extraite du venin de *Leiurus quinquestriatus* Hebraeus (Rochat et al., 1979; Arseniev et al., 1984; Fazal et al., 1989; Adjadj et al., 1997).

Chlorotoxine	MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR
I5A	MCMPCFTTDPNMAKKCRDCCGGNGKCFGPQCLCNR
Amm P2	_ 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
peptide IBs	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
Lqh 8.6	RCS РС F Т Т D Q Q M Т К К C Y D C C G G К G К G К C Y G P Q C I C A P Y



avec ce groupe de toxines.

\_

## CHAPITRE 2. ETUDE D'UNE NOUVELLE FAMILLE DE TOXINES DE SCORPION AYANT POUR CIBLE DES CANAUX CHLORURES CA<sup>2+</sup>-DEPENDANTS.

2. 1. Purification et caractérisation de deux toxines modulant des courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants de myocytes vasculaires à partir d'un venin de scorpion.

Les venins de scorpions sont très riches en toxines agissant sur les canaux sodiques et potassiques. Cependant, il a été démontré que d'autres toxines agissant sur d'autres canaux ioniques sont contenues dans ces venins. Une première toxine inhibant spécifiquement des canaux chlorures a été caractérisée à partir de ces venins. Cette toxine a été nommée chlorotoxine (DeBin et al., 1993). Les canaux chlorures sont une famille pauvres en ligands spécifiques permettant de les caractériser. Cette découverte laisse supposer que d'autres toxines ayant pour cible des canaux chlorures sont encore à identifier dans ces venins.

Récemment, deux nouvelles toxines, inhibant un courant chlorure Ca<sup>2+</sup>-dépendant, situé sur des myocytes vasculaires, ont été extraites du venin de scorpion *Leiurus quinquestriatus* Quinquestriatus, par le groupe du Docteur Pierre Sautière en collaboration avec le Docteur Michel Hugues, du laboratoire de physiopathologie et pharmacologie vasculaire à Bordeaux. Ces travaux sont en cours de rédaction en vue de leur publication dans un périodique, et sont présentés ci-dessous.

Les deux toxines nommées, Lqh2.2 et Lqh7.1, ont été purifiées à partir du venin de scorpion *Leiurus qinquestriatus* Hebraeus. Elles ont été obtenues par chromatographie en phase inverse des fractions 2 et 7 provenant du fractionnement par chromatographie d'échange d'ions, décrit par Marshall et al (Marshall et al., 1994). Ces toxines sont des polypeptides de 34 acides aminés à 4 ponts disulfure. Par ailleurs, Lqh2.2 et Lqh7.1 possèdent une extrémité C-terminale amidée.

Lqh2.2 et Lqh7.1 sont des isoformes d'un même polypeptide. Ils ne diffèrent que de deux résidus d'acides aminés: la méthionine en position 11 et l'acide glutamique en position 17, de Lqh2.2, sont remplacés respectivement, par une thréonine et une lysine, dans Lqh7.1 (Figure 5). D'autre part, les deux polypeptides sont caractérisés par un grand nombre de résidus de glycine et peu de résidus hydrophobes.

Lqh 2.2CGPCFTTDHQMEQKCAECCGGKCYGPQCLCNRLqh 7.1CGPCFTTDHQTEQKCAKCGGIGKCYGPQCLCNR

Figure 5. Séquence primaire des toxines Lqh2.2 et Lqh7.1

Les études d'homologies révèlent que Lqh2.2 et Lqh7.1 appartiennent au groupe des insectotoxines à chaîne courte à quatre ponts disulfure, qui comprend également la chlorotoxine (Tytgat et al., 1998). Les huit résidus de cystéines adoptent le même arrangement dans la séquence (Figure 6).

	1 5 10 15	20 25	30 35
Lqh 2.2	_ CG P C F T T D H Q ME Q K C	AECCGGI_GKCY	GPQC CNR
Lgh 7.1	_ CG P C F T T D H Q T E Q K C	ак <b>СС</b> Б БІ БК <b>С</b> Г	GPQC CNR
Lqh 8.6	R CS P C F T T D Q Q MT K K C	YD C CG GKGKGK CY	GPQC CAPY
Chlorotoxine	M CM P C F T T D H Q MA R K C	DD <b>CC</b> GGKGRGK <b>C</b> Y	GPQC CR
Bm-12	_ CG P C F T T D A N MA R K C	RECCGGI_GKCF	KPQCL CNRI
Amm P2	_ CG P C F T T D P Y T E S K C	ATCCGGRGKC	GPQC CNRI
Bt V-6	R CP P C F T T N P N ME A N C	RKCCGGR_GYCA	SYQC C G
peptide IBs	R CK P C F T T D P Q MS K K C	ADCCGGKGKGKCY	GPQC_C
15A	MCMPCFTTDPNMAKKC	RDCCGGNGKCF	GPQCLCNR
Consensus	_ C_ P C F T T C	ССБ G G К С	

Figure 6. Comparaison des séquences primaires de Lqh2.2 et de Lqh7.1 avec la chlorotoxine et la famille des insectotoxines. Lqh8.6 (*Leiurus quinquestriatus* Hebraeus) ; chlorotoxine (*Leiurus quinquestriatus* Quinqestriatus) ; Bm-12 (*Buthus martensi*) ; AmmP2 (*d'Androctonus mauretanicus* Mauretanicus) ; Bt V-6 (*Buthus tamulus*); peptide Ibs (*Buthus sindicus*) ; I 5A (*Buthus eupeus*).

Lqh2.2 et Lqh7.1 possèdent 60% de similitude avec Lqh8.6 isolée du même venin. Cependant, Lqh8.6 est plus riche en résidus basiques. Elle possède en plus dans sa séquence : une arginine en position N-terminale, une diade de deux résidus Lys14-Lys15, et un motif de trois résidus Lys23-Gly24-Lys25. D'autre part, Lqh8.6 est plus riche en résidus de tyrosine.

Lqh2.2 et Lqh7.1 sont en fait plus proches du peptide AmmP2 du venin d'Androctonus mauretanicus Mauretanicus avec 77 % d'homologie (Zlotkin et al., 1978, Rochat et al., 1979). Quant à la toxine Lqh8.6, elle est plus proche du peptide IBs, de la chlorotoxine, et de l'insectotoxine I 5A avec respectivement 79 %, 71 % et 66 % d'homologie (Fazal et al., 1989; Grishin et al., 1978; DeBin et al., 1993).

Modulation des courants chlorures  $Ca^{2+}$  dépendants des myocytes vasculaires par Lqh2.2 et Lqh7.1

Dans les myocytes de veine porte de rats, à un potentiel de repos de -50 mV, des microinjections de 10 mM de cafféine induisent un courant chlorure transitoire, dépendant d'une augmentation de calcium cytoplasmique (Baron et al., 1991). L'amplitude de ces

courants dans les expériences réalisées avec Lqh2.2 et Lqh7.1, sont de 190 +/- 20 pA (n=101). Les deux nouveaux polypeptides ont été testés pour leur potentiel à inhiber ces courants chlorures.

Une application externe de Lqh7.1 à 1  $\mu$ M pendant 10 min, inhibe la totalité du courant chlorure Ca<sup>2+</sup>-dépendant sans affecter la réponse à la cafféine (Figure 7). Une dose inhibitrice à 50 % (IC<sub>50</sub>) de 64,3 +/- 13 nM, a été déterminée. Pour une même concentration 1  $\mu$ M, Lqh2.2 n'inhibe que 50% du courant.

De même, les toxines Lqh8.6 et chlorotoxine ont été testées sur ces courants chlorures. Il apparaît que Lqh8.6 n'a pas d'effet sur les courants chlorures, et d'autre part qu'une application externe de 1  $\mu$ M de chlorotoxine inhibe seulement 36 +/- 9 % du courant.



Figure 7. Effet de Lqh7.1 sur les courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants des myocytes vasculaires de veine porte de rats. Les courants chlorures ont été provoqués par 10 mM de cafféine. (a) conditions de contrôle, (b) mêmes conditions que pour le contrôle, mais après 15 min d'exposition à 1  $\mu$ M de Lqh7.1. Les cellules ont été testées avec un potentiel de repos de -50 mV. (c) Courbe de dose-réponse de l'inhibition des courants chlorures par Lqh7.1 naturelle ( $\blacktriangle$ ), Lqh7.1 synthétique ( $\bigstar$ ), Lqh2.2 ( $\square$ ), la chlorotoxine ( $\textcircled{\bullet}$ ) et Lqh8.6 (O).

Ces expériences montrent que Lqh7.1 est la toxine la plus active sur les courants chlorures  $Ca^{2+}$ -dépendants. De ce fait, la synthèse de cette toxine a été réalisée. La toxine synthétique possède la même potentialité à inhiber les courants chlorures que Lqh7.1. La spécificité de Lqh7.1 a été étudiée et fait l'objet des pages suivantes.

## Spécificité de Lqh7.1.

#### Activité de Lqh7.1 sur les courants calciques

De courtes applications de 10  $\mu$ M de norépinéphrine induisent une augmentation transitoire de Ca<sup>2+</sup> cystosolique par la mobilisation des stocks intracellulaires de Ca<sup>2+</sup> induite par l'inositol 1,4,5-triphosphate. D'autre part, l'application de 10 nM d'angiotensine II induit un courant transitoire de Ca<sup>2+</sup> via l'activation des canaux calciques de type L- à la surface des cellules (Morel et al., 1996). Lqh7.1 (0,5  $\mu$ M) n'affecte ni les courants calciques induits par la norépinéphrine ni les courants calciques induits par l'angiotensine II.

Dans la veine porte de rat, les canaux calciques de type L- et T- peuvent être activés par une dépolarisation de -60 mV à 0 mV appliquée à 0,05 Hz, ou par des courtes dépolarisations de -80 mV à 0 mV appliquées tous les 0,2 Hz (Loirand et al., 1989; Morel et al., 1997). Lqh7.1 (0,5  $\mu$ M) n'affecte ni les courants calciques voltage-dépendants de type L-, ni les courants calciques voltage-dépendants de type T-.

#### Activité de Lqh7.1 sur les courants potassiques

Les courants potassiques activés par le  $Ca^{2+}$  et le voltage, ont été induits par des impulsions de dépolarisation de -80 mV à 0 mV (Les canaux potassiques  $Ca^{2+}$ -dépendants sont activés par l'ouverture des canaux calciques durant la dépolarisation). La présence des deux types de canaux potassiques a été confirmée par l'inhibition séquentielle des courants par la charybdotoxine (100 nM) et la scyllatoxine (100 nM). Les deux types de courants potassiques ne sont pas affectés par 0,5  $\mu$ M de Lqh7.1 (n=9).

## Conclusion

Bien que les deux nouvelles toxines isolées du venin des scorpion *Leiurus* quinquestriatus Hebraeus ne diffèrent que de deux résidus d'acides aminés, Lqh2.2 est 10 fois moins active que Lqh7.1. Ces différences se situent dans les positions 11 et 17, où la méthionine en position 11 et l'acide glutamique en position 17 de Lqh2.2, sont remplacés respectivement, par une thréonine et une lysine, dans Lqh7.1.

Il a déjà été démontré dans de nombreux cas que certains résidus d'acides aminés et notamment les résidus chargés positivement, à la surface des toxines pouvaient être essentiels pour l'activité des toxines (Meunier et al., 1993; Stampe et al., 1994). Ceux-ci peuvent en effet être engagés dans des interactions électrostatiques entre la toxine et le canal. La lysine en position 17 est donc cruciale pour l'activité de Lqh7.1. De même, la chlorotoxine, qui est 100 fois moins active que Lqh7.1, possède à cet endroit de sa séquence un résidu d'acide aspartique. La même observation peut être faite pour la toxine Lqh8.6 qui ne possède pas d'activité inhibitrice des courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants.

Afin de connaître les éléments essentiels de la toxine Lqh7.1 pour son activité inhibitrice des courants chlorures, la structure tridimensionnelle de cette toxine a été déterminée. Celle-ci est décrite dans les pages suivantes.

## 2. 2. Structure tridimensionnelle de la toxine Lqh7.1

#### 2. 2. 1. Introduction

La structure tridimensionnelle d'un grand nombre de toxines de scorpions sont aujourd'hui connues. Il apparaît qu'en dépit de leur taille, de leur très forte divergence de séquence et de leur différentes activités, les toxines de scorpions adoptent toutes une structure similaire et qu'un repliement unique semble suffisant pour engendrer toute la diversité biologique des toxines de scorpions (Ménez, 1992 et 1998; Meunier et al., 1993). La structure générale des toxines de scorpions comprend systématiquement une courte hélice  $\alpha$  juxtaposée à un feuillet  $\beta$  à deux ou trois brins antiparallèles. L'ensemble de la structure tertiaire est stabilisée par la présence de 3 à 4 ponts disulfure intramoléculaires, qui rendent ces toxines extrêmement stables. Cette structure de base est également adoptée par les défensines d'insectes (Bontems et al. 1991 (b)) et par les  $\gamma$ -thionines de plantes (Bruix et al., 1993).

Une des premières structures de toxines de scorpion étudiée, fut celle d'une toxine à chaîne longue agissant sur les canaux sodiques: le variant-3 isolé du venin de scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing (Fontecilla-Camps et al., 1980). Depuis, les structures d'un grand nombre de toxines à chaîne longue agissant sur les canaux sodiques, ont été élucidées (Jablonsky et al., 1995; Landon et al., 1996 et 1997; Lebreton et al., 1994; Lee et al. 1994 a et b; Pashkov et al., 1988; Tugarinov et al 1997, Krimm et al., 1999; Pintar et al., 1999). Qu'elles soient de type  $\alpha$  ou de type  $\beta$ , la structure tridimensionnelle des toxines de scorpions à chaîne longue est semblable. La structure d'une toxine très connue: la toxine AaH II, est présentée sur la figure 8. Cette toxine isolée du venin d'*Androctonus australis* Hector, est de
type  $\alpha$  (Fontecilla-Camps et al., 1988; Darbon et al., 1991). Dans cette structure, deux ponts disulfure relient l'hélice  $\alpha$  au feuillet  $\beta$  à trois brins antiparallèles. Un troisième et quatrième pont relient la longue boucle entre l'hélice  $\alpha$  et le feuillet  $\beta$ , respectivement à l'extrémité C-terminale et au troisième brin  $\beta$ .

Depuis peu, les structures d'un certain nombre de toxines à chaîne courte ciblées contre les canaux potassiques ont à leur tour été déterminées, la plupart d'entre-elles par RMN. C'est le cas de la charybdotoxine (Bontems et al., 1991, a et b), de l'iberiotoxine (Johnson et Sugg, 1992), de la PO5-NH<sub>2</sub> (Meunier et al., 1993), de la kaliotoxine (Fernandez et al., 1994) ou de la maragtoxine (Johnson et al., 1994). La structure tridimensionnelle de la charybdotoxine, qui est de loin la mieux étudiée, est présentée sur la figure 8. Comme dans le cas de la toxine AaH II, la structure  $\alpha/\beta$  est stabilisée par les ponts disulfure. Le raccourcissement de la structure s'accompagne de la perte d'un pont disulfure. Les 3 ponts disulfure restant adoptent cependant une configuration similaire à celle de l'AaH II. Dans ce cas, 2 ponts disulfure relient l'hélice  $\alpha$ au feuillet  $\beta$  à trois brins antiparallèles, mais un seul pont relie la partie N-terminale à l'hélice  $\alpha$ .

Finalement, les structures de toxines à chaîne longue et à chaîne courte, possèdent de grandes similitudes. Celles-ci peuvent être facilement superposées. Les seules différences d'une toxine à une autre sont principalement localisées dans la longueur des boucles et des parties Net C-terminales (Ménez et al., 1991, 1992; Sabatier et al., 1993; Meunier et al., 1993).

La chlorotoxine représente la première toxine décrite comme agissant sur les canaux chlorures (DeBin et al., 1993; Ullrich et al., 1996; Soroceanu et al., 1998). Cette toxine est un petit polypeptide de 36 résidus d'acides aminés, qui possède très peu d'homologies de séquence avec les toxines de scorpions décrites ci-dessus. Elle représente également la première toxine à chaîne courte à 4 ponts disulfure à avoir été décrite. La structure de la chlorotoxine a été déterminée par RMN par Guy Lippens en 1995 (Lippens et al., 1995). Malgré les différences de cible et de séquence primaire, la chlorotoxine adopte une structure similaire à celles des autres toxines de scorpions (Figure 8). Elle possède une hélice  $\alpha$  et un feuillet  $\beta$  reliés par des ponts disulfure. Par ailleurs, il a été démontré que le pont disulfure supplémentaire reliait le premier feuillet  $\beta$  au reste de la molécule. Cette liaison covalente est remplacée dans la charybdotoxine par une interaction hydrophobe entre la boucle  $\alpha/\beta$  et la partie N-terminale (Lippens et al., 1995). La superposition des deux toxines en fonction du feuillet  $\beta$  C-terminal et des ponts disulfure, montre que les différences les plus importantes se situent au niveau des boucles reliant le premier brin  $\beta$  à l'hélice  $\alpha$  et de l'hélice  $\alpha$  au feuillet  $\beta$  C-terminal, qui sont plus larges dans la chlorotoxine (Lippens et al., 1995).

178



Figure 8. Comparaison des structures tridimensionnelles de l'AaH II (Darbon et al., 1991); de la charybdotoxine (Botems et al., 1991) et de la chlorotoxine (Lippens et al., 1995). Les structures ont été générées par le logiciel Insight II (Molecular simulation Inc). En bleu sont représentées les hélices  $\alpha$ , en rouge les feuillets  $\beta$ . Les ponts disulfure sont représentés par des sphères jaunes reliées par un pont.

Bien que la chlorotoxine possède de faibles homologies de séquence avec les toxines de scorpions agissant sur les canaux sodiques et potassiques, celle-ci partage de fortes similitudes avec les insectotoxines à chaîne courte dont la cible spécifique n'est pas encore clairement définie. Dans cette famille de toxines quelques structures ont été déterminées. En effet, les structures de l'insectotoxine I 5A (Arsevniev et al., 1984) et de Lqh8.6 (Adjadj et al., 1997) ont été élucidées. Ces deux toxines possèdent une structure très proche de celle de la chlorotoxine.

Comme la chlorotoxine, Lqh2.2 et Lqh7.1 appartiennent à la famille des insectotoxines à chaîne courte. Ces toxines ont dans un premier temps, attiré beaucoup moins d'attention que les autres toxines de scorpions. Ceci peut s'expliquer à la fois par le manque d'informations précises concernant leur cible, et par le fait qu'elles représentent une très petite partie de la collecte des venins, rendant plus difficile leur caractérisation (DeBin et al., 1993 ; Tytgat et al., 1998). Aujourd'hui, seules les structures tridimensionnelles de l'I 5A, de la chlorotoxine et de Lqh8.6, sont connues. Il serait donc intéressant de connaître et de comparer la structure tridimensionnelle d'une de ces nouvelles toxines avec les structures des toxines de ce groupe.

Parmi les toxines testées sur les courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants des myocytes vasculaires de veine porte de rats, Lqh7.1 est apparue comme le plus puissant inhibiteur de ces courants chlorures. Cette toxine a été synthétisée en SPPS afin d'obtenir des quantités suffisantes donnant l'accès à l'étude structurale. Le repliement du polypeptide a été réalisé en présence d'un couple rédox cystéine/cystine dans les proportions 2 mM/4 mM à pH 8,5. L'activité de Lqh7.1 synthétique sur les courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants est la même que pour la toxine naturelle.

#### 2. 2. 2. Structure de Lqh7.1

Les résultats de RMN montrent que Lqh7.1 possède une structure tertiaire classique de toxines de scorpions à chaîne courte. Elle est constituée d'un court feuillet  $\beta$  à 2 brins antiparallèles et d'une hélice  $\alpha$ , et est verrouillée par 4 ponts disulfure (figure 9).

Le feuillet  $\beta$  à deux brins antiparallèles commence au résidu Ile22 et se termine au résidu C-terminal d'Arg34. Les résidus Gly27 et Pro28 forment le tournant de cette structure en "épingle à cheveu". L'hélice  $\alpha$  s'étend du résidu His9 au résidu Cys19.

De part et d'autre de ces éléments de structure secondaire se trouvent: le segment Nterminal, constitué des résidus de Cys1 à Cys4 qui adoptent une structure étendue en contact avec le feuillet  $\beta$ , la boucle Phe5-Asp8 qui relie la partie N-terminale à l'hélice  $\alpha$  et enfin, les résidus Gly20 et Gly21 qui forment la boucle reliant l'hélice  $\alpha$  et le feuillet  $\beta$ .

L'arrangement des ponts disulfure n'a pas pu être déterminé par les méthodes classiques de détermination des ponts disulfure, à savoir la méthode enzymatique et la méthode chimique décrite par Gray (Gray, 1993). Finalement, les ponts disulfure ont été déterminés à l'aide des données RMN (Klaus et al., 1993) et des calculs de structures en solution. Deux ponts disulfure (Cys15-Cys30; Cys19-Cys32) relient l'hélice  $\alpha$  au feuillet  $\beta$ . L'hélice  $\alpha$  est également reliée au segment N-terminal par le pont disulfure (Cys1-Cys18). Enfin, un dernier pont disulfure relie la partie N-terminale au feuillet  $\beta$  (Cys4-Cys25).



Figure 9. Structure tridimensionnelle de Lqh7.1 en solution, déterminée par résonance magnétique nucléaire. La structure a été générée par logiciel INSIGHT II (Molecular simulation Inc).

## 2. 2. 3. Comparaison de la structure de Lqh7.1 à celle de la chlorotoxine

Lqh7.1 possède une structure très proche de celle de la chlorotoxine. On retrouve les mêmes éléments de structure secondaire localisés aux mêmes endroits dans la séquence (figure 10). Les deux toxines possèdent une hélice  $\alpha$  de 11 résidus et trois brins  $\beta$  de même longueur. Les brins  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 forment une structure en "épingle à cheveu" dont le tournant est constitué d'un résidu de glycine suivi d'un résidu de proline.



Figure 10. Comparaison des éléments de structure secondaire des toxines Lqh7.1 et chlorotoxine.

La différence la plus importante entre les deux structures se situe au niveau de la longueur de la boucle  $\alpha/\beta$  reliant l'hélice  $\alpha$  au feuillet  $\beta$  C-terminale. La chlorotoxine possède 2 résidus d'acides aminés supplémentaires dans sa séquence. Dans Lqh7.1, 2 résidus de glycine forment la boucle  $\alpha/\beta$ . Dans la chlorotoxine, cette boucle est formée de 2 résidus supplémentaires basiques (Lys, Arg). Cette différence se traduit au niveau de la structure tridimensionnelle par une orientation différente de la boucle (figure 11). En effet, dans la chlorotoxine, la longue boucle est orientée vers l'hélice  $\alpha$ .



Figure 11. Superposition de la structure de Lqh7.1 (vert) et de la chlorotoxine (rose) (Lippens et al., 1995). La superposition a été réalisée en fonction de l'hélice  $\alpha$  et du feuillet  $\beta$  C-terminal.

Les **potentiels électrostatiques de surface** de la chlorotoxine et de Lqh7.1 ont été calculés et comparés (Figure 12). Ils indiquent quelques différences significatives entre les deux toxines, notamment au niveau de la boucle  $\alpha/\beta$ .



Figure 12. Potentiel électrostatique de surface de Lqh7.1 (a) et de la chlorotoxine (b). Les calculs ont été réalisés par la méthode BEM (Boundary Element Method) (Horvath et al., 1996). Les potentiels électrostatiques positifs sont en bleu, les potentiels électrostatiques négatifs sont en rouge.

Un potentiel électrostatique positif dans la chlorotoxine se trouve dans la région de la boucle reliant l'hélice  $\alpha$  au feuillet  $\beta$  C-terminal constitué des résidus Lys23-GLy24-Arg25 dans laquelle les résidus de lysine et d'arginine sont exposés à la surface. Cette région basique est suspectée pour avoir un rôle dans l'activité de la chlorotoxine. La toxine Lqh7.1 ne possède pas cette "triade" à deux résidus basiques au niveau de la boucle. Cependant un potentiel

électrostatique positif est également présent dans cette région, mais celui-ci est dû essentiellent au résidu d'arginine en position 34.

Un autre potentiel électrostatique positif est présent dans la toxine Lqh7.1 mais cette fois absent dans la chlorotoxine. La Lys17 forme un potentiel de surface positif, tandis que dans cette région le potentiel de surface de la chlorotoxine est négatif. Ceci est dû à la présence du résidu Asp18 dans cette position. La lysine en position 17 prouve déjà son importance compte tenue de l'activité 10 fois moins importante pour les canaux chlorures du mutant naturel Lqh2.2 qui possède dans cette position un résidu d'acide glutamique. L'activité de la chlorotoxine est 100 fois moins importante que Lqh7.1 est possède dans cette position un résidu d'acide aspartique. Il a déjà été montré dans un grand nombre de cas que les acides aminés basiques étaient d'une grande importance pour l'interaction entre les canaux et les toxines animales (Meunier et al., 1993). Toutes ces observations tendent à donner à la lysine en position 17 un rôle crucial pour l'activité de Lqh7.1 sur les canaux chlorures.

.

## CHAPITRE 3. RECHERCHE D'UN DERIVE DE LQH7.1, MARQUE A L'IODE 125 ET BIOLOGIQUEMENT ACTIF.

#### 3. 1. Introduction

Un ligand capable de se fixer avec une haute affinité sur un récepteur spécifique est susceptible de devenir un outil pharmacologique de choix. Ces ligands sont généralement marqués par du tritium ou de l'iode radioactif. Les toxines animales représentent une famille de ligands peptidiques extrêmement spécifiques et affins vis-à-vis de leur récepteur. De nombreuses toxines marquées à l'iode radioactif sont aujourd'hui couramment utilisées pour caractériser certains récepteurs et les localiser au niveau tissulaire par autoradiographie. Ces toxines ainsi détectables, sont également très utiles pour déterminer l'affinité de nouvelles substances vis-à-vis de récepteurs connus, ayant un potentiel thérapeutique. A titre d'exemple, la dendrotoxine du venin de serpent *Dendroaspis angusticeps*, la toxine AaH du venin de scorpion *Androctonus australis* ou l'ω-CTx-GVIA du venin de cône marin *Conus geographus*, marquées à l'iode 125, sont des marqueurs spécifiques de certains sous-types de canaux ioniques, très utilisés dans des tests de compétitions (Vazquez et al., 1989, 1990; Adams et al., 1993; Knaus et al., 1995; Koschak et al., 1997).

Le marquage de toxines animales a permis également de déterminer la pharmacologie moléculaire des canaux ioniques et de certains récepteurs. D'autre part, des toxines radiomarquées ont été utilisées avec succès pour la purification de certains canaux ioniques, permettant ainsi d'aborder leur étude structurale. Ainsi, en utilisant la charybdotoxine marquée à l'iode 125, il a été possible de purifier son récepteur à partir du muscle squelettique aortique et trachéal (Kaczorowski et al., 1996; Giangiacomo et al., 1995; Garcia-Calvo et al., 1994). De même, la caractérisation du récepteur de l' $\omega$ -CTx-GVIA a été réalisée à l'aide de la toxine marquée à l'iode 125 (Abe et al., 1986; Cruz et al., 1987; Yamaguchi et al., 1988; Barhanin et al., 1988).

Lqh7.1 représente un ligand peptidique de choix pour l'étude des canaux chlorures. En effet, cette toxine inhibe avec une haute affinité ( $IC_{50} = 64,3$  nM) un courant chlorure  $Ca^{2+}$ -dépendant, situé sur les myocytes vasculaires de veine porte de rats. Aujourd'hui, aucun autre ligand n'est capable de bloquer avec la même affinité ses courants chlorures. Cependant, pour le moment, seules des données électrophysiologiques nous permettent de constater un effet physiologique. Afin de déterminer les propriétés biochimiques de l'interaction de Lqh7.1 avec son récepteur, et de caractériser le récepteur moléculaire, il est nécessaire d'obtenir une toxine détectable.

Le marquage à l'iode radioactif offre plusieurs avantages par rapport au marquage par des radioisotopes, tels que le tritium et le carbone 14. L'avantage le plus significatif est la

facilité avec laquelle les rayons gamma émis, sont comptés. La détection de rayonnements  $\beta$  par les radioisotopes <sup>3</sup>H ou <sup>14</sup>C, nécessite quant à elle, un système de comptage avec du liquide de scintillation, souvent coûteux. Un autre avantage, est la haute radioactivité spécifique des radioisotopes de l'iode 125 et 127.

Lqh7.1 possède dans sa séquence primaire une seule tyrosine en position 26. Le marquage de peptides à l'iode s'opérant en fixant un atome d'iode radioactif sur une tyrosine ou sur une histidine, le marquage à l'iode de Lqh7.1 est envisageable. D'autre part, il a été montré que la tyrosine en position 26 était suffisamment éloignée de la lysine en position 17, qui est un site présumé important dans l'activité de Lqh7.1. Dans le cas de la chlorotoxine, il a été montré qu'après marquage à l'iode de la tyrosine 29, celle-ci était toujours capable de se fixer avec une haute affinité sur les canaux chlorures exprimés à la surface des cellules gliomiales (Soroceanu et al., 1998).

## 3. 2. Marquage à l'iode 125 de Lqh7.1. - Perte d'activité de la molécule marquée

#### 3. 2. 1. Introduction

Le radiomarquage de toxines animales de nature polypeptidique à haute radioactivité spécifique peut être produit après réaction de la tyrosine ou de l'histidine avec le Na[<sup>125</sup>I]. La méthode la plus courante de marquage à l'iode radioactif fait intervenir l'oxydation de Na[<sup>125</sup>I] ou de Na[<sup>131</sup>I] en présence d'une protéine contenant une tyrosine. L'agent oxydant le plus couramment utilisé est la chloramine-T. Cependant, la chloramine-T peut parfois dégrader les protéines sensibles. Aujourd'hui, d'autres agents plus "doux" sont utilisés, tels que "l'iodogen" ou "l'iodobead" (Pierce).

En présence d'oxydant dans des conditions alcalines douces (pH 7,0), le NaI est oxydé en I<sup>+</sup>. Ce cation se fixe sur le noyau phénolique de la tyrosine en ortho du groupe hydroxyle. Les dérivés mono-iodo et di-iodo tyrosine peuvent se former. Cependant, la forme monosubstituée étant moins réactive que la forme native, la forme di-substituée est moins présente (Figure 13).



Figure 13. Structure d'un résidu de tyrosine mono-iodée et di-iodée.

Bien que la tyrosine soit le principal acide aminé réagissant avec l'atome d'iode, celui-ci peut également réagir avec l'histidine (Covelli et Wolff., 1966). Lqh 7.1 contenant une histidine dans sa séquence en position 5, il a été nécessaire de vérifier, l'intégrité de l'histidine après le marquage, par séquençage de la protéine.

La préparation de [<sup>125</sup>I]-Lqh7.1 a été réalisée en marquant la tyrosine 26 par la méthode à "l'iodo-bead", décrite par la société Pierce. L'"iodo-bead" est une bille de polystyrène sur laquelle plusieurs groupements oxydants de *N*-chloro-benzènesulfonamide sont greffés. Cette méthode de marquage est dite "douce". En effet, l'immobilisation de l'agent oxydant sur une bille permet non seulement de faciliter la manipulation mais aussi de limiter le contact direct de l'agent oxydant avec la protéine.

#### 3. 2. 2. Marquage de Lqh7.1

Afin de caractériser les propriétés biochimiques et physiologiques de la toxine modifiée, le marquage de Lqh7.1 a d'abord été effectué à basse radioactivité spécifique sur un grande quantité de toxine (27,4 nmoles), ou en utilisant uniquement de l'iode non radioactif (Na[<sup>127</sup>I]). Ensuite, le marquage de Lqh7.1 a été réalisé à haute radioactivité spécifique, avec une solution d'iode 125, à 2200 Ci/mM et 100 mCi/ml, sur une petite quantité de toxine (1 nmole).

Les différentes formes de Lqh7.1 ont été séparées par HPLC en phase inverse. Trois pics ont été détectés, avec des temps de rétention respectifs, de 19 min, 22 min et 24 min (Figure 14). L'identité du constituant de chaque pic a été déterminée par spectrométrie de masse en mode PDMS. Le premier pic correspond à la toxine native (A). En effet, celui-ci possède le même temps de rétention (19 min) et la même masse moléculaire que la toxine naturelle (3646,2 Da). Le deuxième et le troisième pics, (B) et (C) correspondent, respectivement à la toxine mono- et di-iodée avec une masse moléculaire de 3773 Da et de 3897,6 Da.



Figure 14. Marquage à l'iode [<sup>127</sup>I] de Lqh7.1. (a) Chromatographie analytique de Lqh7.1 native (témoin). Lqh7.1 native possède un temps de rétention de 19 min sur une colonne C8LiChroCart (4 x 250 mm; 5μm, 100Å), avec un gradient d'acétonitrile de 15 à 45%, de pente 0,8%/min et un débit de 1ml/min. La détection a été réalisée à 215 nm. (b) Séparation des dérivés marqués à l'iode [<sup>127</sup>I] dans les mêmes conditions que ci-dessus: (A) Lqh7.1 native, 19 min; (B) Lqh7.1 mono-iodée 22 min; (C) Lqh7.1 di-iodée, 24 min. (c) Masses obtenues pour chaque pic par spectrométrie de masse mode PDMS. (A) Lqh7.1 native: masse théorique 3646,2; masse observée 3645,4; Lqh7.1 mono-iodée: masse théorique 3772,2; masse observée 3773; Lqh7.1 di-iodée: masse théorique 3898,2; masse observée 3897,6.

Dans une expérience parallèle, la toxine Lqh7.1 a été marquée à haute radioactivité spécifique avec du Na [<sup>125</sup>I] comme seule source d'iode. Le mélange obtenu a été purifié dans les mêmes conditions que dans le cas du marquage à basse radioactivité spécifique. La radioactivité de chaque fraction a été comptée, et chaque fraction radioactive a été incluse dans un test de fixation. Les résultats sont exposés dans les pages suivantes.

#### 3. 2. 3. Activité de Lqh7.1 marqué à l'iode

3. 2. 3. 1. Test de fixation de Lqh7.1 marquée à l'iode sur les membranes de veine porte de bœuf

#### Méthode de détermination de la liaison spécifique

Les études de liaison spécifique sont réalisées généralement sur des préparations subcellulaires plus ou moins enrichies en récepteurs. La loi d'action de masse appliquée à l'interaction entre le radioligand (L\*) et le récepteur (R), permet d'écrire l'équation :

$$L^* + R \xrightarrow{k1}_{k-1} L^*R$$

L\* : radioligand, R: récepteur, L\*R: complexe radioligand-récepteur, k1: constante cinétique d'association, k-1: constante cinétique de dissociation.

La quantification de la liaison du radioligand sur les récepteurs se fait en deux étapes :

- La première étape est l'*incubation*. Elle consiste à mettre en présence dans un tampon, le ligand et les récepteurs, pendant un temps déterminé et dans des conditions précises de température et de pH. Durant cette incubation, le ligand va se lier aux récepteurs avec un équilibre défini par l'équation ci-dessus.

- La seconde étape est la <u>séparation</u>. Celle-ci sert à séparer les molécules de ligand restées libre en solution (L\*), des molécules marquées liées aux récepteurs inclus dans les membranes (L\*R). Cette étape se réalise par centrifigation ou plus souvent par filtration. Il suffit alors de mesurer la radioactivité retenue sur le filtre pour avoir une estimation de la quantité de molécules de radioligand fixée sur les membranes.

En pratique, la liaison totale du radioligand correspond à la somme de la liaison spécifique et de la liaison non spécifique (Figure 15). En considérant la haute affinité du radioligand pour son récepteur ( $10^{-9}$  M), un excès de ligand froid ( $10^{-6}$  M) pourra complètement masquer la liaison spécifique du radioligand sans affecter la liaison du radioligand aux sites de faible affinité, considérés comme non spécifiques.



Figure 15. Détermination de la liaison spécifique d'un radioligand.

Un radioligand qui interagit avec son récepteur a généralement un pourcentage de liaison spécifique supérieur à 50 %. La détermination du pourcentage de la liaison spécifique d'un radioligand sur des membranes permet d'évaluer son interaction avec son récepteur. Cette expérience se réalise en incubant d'une part, le radioligand seul avec les membranes, avec une concentration de l'ordre de  $10^{-9}$  M, et d'autre part le radioligand ( $10^{-9}$  M) avec un excès de ligand froid ( $10^{-6}$  M).

## Mesure de la liaison spécifique de Lqh7.1 marquée sur les membranes de veine porte de bœuf.

Afin de déterminer une liaison spécifique de Lqh7.1 sur un récepteur des membranes de veine porte de bœuf, un test de fixation a été réalisé en incubant des membranes de veine porte de bœuf à 0,25 mg/ml avec 0,8 nM de toxine marquée à l'iode 125 et 0,1  $\mu$ M de toxine naturelle.

#### <u>Résultat</u>

Toutes les fractions séparées par HPLC ont été testées. Aucune d'entre elles ne possède un pourcentage de liaison supérieur à 18 %.

#### 3. 2. 3. 2. Activité de la toxine marquée à l'iode en électrophysiologie

Les propriétés électrophysiologiques de la toxine Lqh7.1 mono-iodée, à l'iode 127 ont été testées et comparées avec celles de la toxine native, par la technique de "Patch Clamp" (Morel et al., 1997). La toxine marquée a été testée pour sa capacité à inhiber les courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants.

#### <u>Résultat</u>

La toxine marquée n'est pas capable d'inhiber les courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants.

#### 3. 2. 3. 3. Conclusion

Le test de fixation sur les membranes de veine porte de bœuf, et le test électrophysiologique, montrent que la toxine mono-iodée ne se fixe pas sur un récepteur spécifique et qu'elle perd son activité inhibitrice sur les courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants. Afin d'interpréter ce résultat, la comparaison des spectres de dichroïsme circulaire de Lqh7.1 naturelle et de Lqh7.1 mono-iodée a été réalisée.

## 3. 2. 4. Comparaison des spectres de dichroïsme circulaire de Lqh7.1 native et Lqh7.1 mono-iodée.

L'atome d'iode est un "étranger" pour la molécule. C'est pourquoi, il n'est pas improbable que la structure de la protéine marquée et de la protéine non marquée, soient différentes. Afin de s'assurer que l'atome d'iode sur la tyrosine 26 n'altère pas la structure tridimensionnelle de Lqh7.1, des spectres de dichroïsme circulaire de la toxine native et de la toxine marquée ont été enregistrés. La figure 16 montre la superposition du spectre de Lqh7.1 et de Lqh7.1 monoiodée. Les spectres enregistrés indiquent une conservation de la structure globale de Lqh7.1 lorsqu'elle est mono-iodée.



Figure 16. Spectres de dichroïsme circulaire de Lqh7.1 native et Lqh7.1 mono-iodée. Les spectres CD ont été mesurés sur un dichrographe CD6 Jobin Yvon. Les expériences ont été réalisées dans une cuve de 0,5 mm à 23°C, entre 174 et 300 nm tous les 0,5 nm. 3 spectres ont été accumulés pour chaque longueur d'onde pendant 2 sec. Les spectres ont été pris dans l'eau. La concentration des échantillons était de 21,85 µM pour Lqh7.1 et de 32,5 µM pour Lqh7.1 mono-iodée.

#### 3. 2. 5. Conclusion

Lqh7.1 mono-iodée perd sa capacité à inhiber les courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants des myocytes vasculaires de veine porte de bœuf. D'autre part, il n'a pas pu être démontré par le test de fixation, qu'elle se fixait à un récepteur spécifique sur les membranes de veine porte de bœuf. Cependant, Lqh7.1 mono-iodée possède une structure globale similaire à celle de Lqh7.1 native. Il est donc probable que l'encombrement stérique de l'atome d'iode dans la région de la tyrosine en position 26, soit à l'origine de la perte d'activité.

Afin de contourner les problèmes d'inactivité de Lqh7.1 suite au marquage à l'iode, plusieurs mutants de Lqh7.1 ont été synthétisés en SPPS. Les travaux réalisés sur 5 analogues de Lqh7.1 sont présentés dans les pages suivantes.

## 3. 3. Synthèses d'analogues de Lqh7.1 et études biologiques

Les analogues de Lqh7.1 ont été synthétisés en phase solide sur un synthétiseur automatique modèle 430A de chez Applied Biosystem. Une procédure standard de la stratégie Boc/benzyl a été utilisée. Les méthodes utilisées pour la synthèse des polypeptides et le repliement, sont détaillées dans la partie expérimentale (3.5).

## 3. 3. 1. Lqh7.1[F5Y/Y26F]

## 3. 3. 1. 1. Introduction

Lqh7.1 possède dans la partie N-terminale de sa séquence primaire une phénylalanine en position 5 (Figure 17). Afin de déplacer le site de fixation de l'atome d'iode, un analogue de Lqh7.1 a été synthétisé, dans lequel les résidus de phénylalanine et de tyrosine sont permutés. Cet analogue de Lqh7.1 a été nommé Lqh7.1[F5Y/Y26F].

Bien que le résidu Phe5 appartienne à une partie conservée des séquences des insectotoxines et de la chlorotoxine, le changement "Phe  $\rightarrow$  Tyr" dans cette position où seul un groupement hydroxyle est ajouté, est susceptible de ne pas géner le repliement. Le changement "Tyr  $\rightarrow$  Phe" en position 26 ne devrait pas non plus altérer la structure de la toxine puisque qu'une phénylalanine est présente dans cette position dans l'insectotoxine I 5A, qui adopte une structure similaire à celle de Lqh7.1 (Arseniev et al., 1984).

Il est toutefois possible que le groupement hydroxyle ait un rôle important dans l'interaction avec le récepteur. Dans le cas de la charybdotoxine, la tyrosine en position 36 est essentielle pour l'interaction avec les canaux potassiques. Cependant, il a été montré que le remplacement de la tyrosine par une phénylalanine n'altérait pas de façon significative l'affinité de la toxine pour son récepteur (Goldstein et al., 1994; Dauplais et al., 1997).

Si Lqh7.1[F5Y/Y26F] garde une bonne activité pour les canaux chlorures, il est possible de le marquer à l'iode pour obtenir un ligand utile dans l'étude du récepteur de Lqh7.1.



Figure 17. Séquence primaire de Lqh7.1 et de Lqh7.1 [F5Y/Y26F].

### 3. 3. 1. 2. Repliement de Lqh7.1[F5Y/Y26F]

L'oxydation de Lqh7.1[F5Y/Y26F] a été réalisée dans un tampon Tris 0,2 M, pH 8,5 avec l'aide d'un couple rédox, Cystéine/Cystine ; 2 mM/4 mM, à température ambiante. Ces conditions sont les mêmes que celles utilisées dans le cas du repliement de Lqh7.1 native.

Au bout de 1h45 le repliement du polypeptide a été observé (Figure 18). La masse théorique et la masse observée sont toutes les deux de 3646,2 Da, indiquant que les ponts disulfure sont formés.



Figure 18. Repliement oxydatif de Lqh7.1[F5Y/Y26F]. (a) témoin réduit, (b) témoin oxydé au bout de 1h45. Colonne C18 nucleosil (4,6 x 250 mm), gradient de 0 à 48 % d'acétonitrile en 30 min, 1 ml/min, 50°C. (c) masse observée en spectrométrie de masse en mode PDMS.

## 3. 3. 1. 3. Comparaison des spectres de dichroïsme circulaire de Lqh7.1 et de Lqh7.1[F5Y/Y26F]

La comparaison des spectres de dichroïsme circulaire a été réalisée entre Lqh7.1 et Lqh7.1[F5Y/Y26F]. Cette comparaison est présentée dans la figure 19. Les spectres de dichroïsme circulaire sont identiques. Ceci indique que Lqh7.1[F5Y/Y26F] adopte le même repliement que Lqh7.1 naturelle.



Figure 19. Superposition des spectres de dichroïsme circulaire de Lqh7.1 naturelle et de Lqh7.1[F5Y/Y26F]. Les spectres ont été mesurés sur un dichrographe CD6 Jobin Yvon. Les expériences ont été réalisées dans une cuve de 0,1 mm à 23°C, entre 175 et 300 nm tous les 0,5 nm. 3 spectres ont été accumulés pour chaque longueur d'onde pendant 2 sec. Les spectres ont été pris dans l'eau. Les concentrations des échantillons étaient de 112  $\mu$ M pour Lqh7.1[F5Y/Y26F].

#### 3. 3. 1. 4. Activité de Lqh7.1[F5Y/Y26F] en électrophysiologie

Les études électrophysiologiques montrent que Lqh7.1[F5Y/Y26F] retient une activité d'inhibition des courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants. Cependant, celle-ci est inférieure à celle de Lqh7.1. En effet, le pourcentage d'inhibition du courant chlorure passe de 97 % pour Lqh7.1 naturelle, à 43 % pour Lqh7.1[F5Y/Y26F], à 1  $\mu$ M (Tableau 1). Toutefois, ce pourcentage d'inhibition du courant chlorure est suffisant pour envisager l'obtention d'un ligand diriger contre les canaux chlorures. D'autre part, il est difficile d'évaluer la perte exacte de l'affinité pour le récepteur suite à cette mutation, avec uniquement des données électrophysiologiques. L'analogue Lqh7.1[F5Y/Y26F] reste donc un bon ligand et a donc été marquée à l'iode.

Tableau 1. Pourcentage d'inhibition des courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants à 1 μM par Lqh7.1 et Lqh7.1 [F5Y/Y26F]

$[polypeptide] = 1 \mu M$	pourcentage d'inhibition des courants chlorures Ca <sup>2+</sup> -dépendants
Lqh7.1 naturelle	97 ± 10 % (n=25)
Lqh7.1 [F5Y/Y26F]	43 ± 8 % (n=9)

n: nombre de cellules testées

## 3. 3. 1. 5. Marquage et activité de Lqh7.1[F5Y/Y26F] marquée à l'iode

Le marquage de l'analogue Lqh7.1[F5Y/Y26F] et le test de fixation ont été réalisés de la même façon que dans le cas de la toxine naturelle. Cependant, les études d'activité en électrophysiologie montrent que Lqh7.1[F5Y/Y26F] n'est pas capable d'inhiber les courants chlorures  $Ca^{2+}$ -dépendants. D'autre part les tests de fixation indiquent une liaison spécifique inférieure à 50 %.

#### 3. 3. 1. 6. Conclusion

L'utilité de l'analogue Lqh7.1[F5Y/Y26F] s'avère limitée pour l'étude des canaux chlorures  $Ca^{2+}$ -dépendants. En effet, bien que celui-ci possède une activité inhibitrice sur les courants chlorures  $Ca^{2+}$ -dépendants, son marquage à l'iode le rend inactif. De ce fait, quatre autres mutants ont été synthétisés.

Afin de n'avoir qu'un site de fixation de l'atome d'iode, dans chaque analogue, la tyrosine en position 26 a été remplacée par une phénylalanine. En effet, l'analogue Lqh7.1[F5Y/Y26F], dans lequel la tyrosine 26 a été remplacée par une phényalanine, préserve une activité inhibitrice satisfaisante des canaux chlorures  $Ca^{2+}$ -dépendants. Il est donc problable que celui-ci garde une bonne affinité pour le récepteur touché.

# 3. 3. 2. Lqh7.1[H9Q/Q9Y/Y26F] - Lqh7.1[H9Y/Y26F] - Lqh7.1[N33Y/Y26F] - Lqh7[Y(-1)/Y26F]

### 3. 3. 2. 1. Introduction

• Dans un premier temps, nous avons choisi de muter la toxine en fonction de deux critères, (i) ne pas perturber le repliement et donc choisir une position variable dans la séquence des insectotoxines et de la chlorotoxine, (ii) insérer la mutation de façon suffisamment éloignée du résidu de lysine 17 en se basant sur la structure tridimensionnelle de Lqh7.1.

De ce fait, la toxine Lqh7.1 a été mutée en position 9, où l'histidine a été remplacée par une tyrosine. Afin d'augmenter les chances d'obtenir une molécule qui se replie, un autre analogue a été synthétisé dans lequel la tyrosine est déplacée en position 10 (Figure 20). Ces analogues ont été nommés respectivement, Lqh7.1[H9Q/Q9Y/Y26F] et Lqh7.1[H9Y/Y26F].

		1	_			5					10					15	_				20					25					30			_		
Lqh7.1	_	С	G	Р	С	F	Т	Т	D	H	Q	Т	E	Q	K	С	A	K	С	С	G	G	I	G	к	С	Y	G	P	Q	С	L	С	Ν	R	
Lqh7.1[H9Y/Q9Y/Y26F]	_	c	G	Р	С	F	Т	Т	D	Q	Y	Т	E.	Q	Κ	c	А	K	С	С	G	G	I	G	к	С	F	G	Р	Q	С	L	c	Ν	R	
Lqh7.1[H9Y/Y26F]	_	С	G	P	С	F	Т	Т	D	Y	Q	Т	Е	Q	к	С	Α	Κ	С	С	G	G	I	G	K	С	F	G	Р	Q	С	L	с	N	R	
			•			-											•				•												_	•		

Figure 20. Séquence primaire des analogues de Lqh7.1: Lqh7.1[H9Q/Q9Y/Y26F] et Lqh7.1[H9Y/Y26F]

• Dans un deuxième temps, les extrémités N- et C-terminales de Lqh7.1 ont été mutées. Dans le premier analogue, le résidu d'asparagine 33 à été remplacé par une tyrosine. Dans un deuxième analogue, une tyrosine a été ajoutée en position N-terminale devant le résidu de cystéine 1. Ces deux analogues ont été nommés respectivement, Lqh7.1[N33Y/Y26F] et Lqh7[Y(-1)/Y26F] et sont présentés dans la figure 21.



Figure 21. Séquence primaire des analogues de Lqh7.1: Lqh7.1[N33Y/Y26F] et de Lqh7[Y(-1)/Y26F]

#### 3. 3. 2. 2. Repliement des analogues de Lqh7.1

Le repliement des analogues de Lqh7.1 ont été réalisés dans les mêmes conditions que dans le cas de Lqh7.1[F5Y/Y26F]. Tous les polypeptides ont été capables de se replier. Ceux-ci ont été analysés par dichroïsme circulaire. Les spectres possèdent la même forme que le spectre de Lqh7.1. Les polypeptides analogues gardent donc la même structure que Lqh7.1.

Les résultats du repliement sont présentés pour les analogues Lqh7.1[H9Y/Y26F], Lqh7.1[N33Y/Y26F] et Lqh7[Y(-1)/Y26F], dans les figures, 22, 23 et 24.



Figure 22. Repliement de Lqh7.1[H9Y/Y26F]. (a) Témoin réduit, (b) témoin oxydé au bout de 30 min. Colonne C18 nucleosil (4,6 x 250 mm), gradient de 0 à 40 % d'acétonitrile en 40 min, 1 ml/min, 50°C. (c) Masse observée en spectrométrie de masse en mode PDMS.

La masse théorique de cet analogue est de 3656,3 Da et la masse observée est de 3656,2 Da. Ceci indique que les ponts disulfure sont formés.



Figure 23. Repliement de Lqh7.1[N33Y/Y26F]. (a) Témoin réduit, (b) Témoin oxydé au bout de 1 heure. Colonne C18 nucleosil (4,6 x 250 mm), gradient de 0 à 40 % d'acétonitrile en 30 min, 1 ml/min, 50°C. (c) Masse observée en spectrométrie de masse en mode PDMS.

La masse théorique de cet analogue est de 3679,3 Da et la masse observée est de 3678,5 Da. Ceci indique que les ponts disulfure sont formés.



Figure 24. Repliement de Lqh7[Y(-1)/Y26F]. (a) témoin réduit, (b) témoin oxydé au bout de 1 heure. Colonne C18 nucleosil (4,6 x 250 mm), gradient de 0 à 40 % d'acétonitrile en 40 min, 1 ml/min, 50°C. (c) masse observée en spectrométrie de masse en mode PDMS.

La masse théorique de cet analogue est de 3693,4 Da et la masse observée est de 3694,5 Da. Ceci indique que les ponts disulfure sont formés.

#### 3. 3. 2. 3. Résultats électrophysiologiques

Les résultats des études électrophysiologiques sont présentés dans le tableau 2. A la différence de la toxine Lqh7.1 naturelle ou synthétique, et à l'analogue Lqh7.1[F5Y/Y26F], les analogues, Lqh7.1[H9Q/Q9Y/Y26F], Lqh7.1[H9Y/Y26F] et Lqh7.1[N33Y/Y26F], inhibent un faible pourcentage des courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants, à 1  $\mu$ M. C'est pourquoi, ils n'ont pas été marqués à l'iode radioactif.

Tableau 2. Pourcentage d'inhibition des courants chlorures  $Ca^{2+}$ -dépendants à 1  $\mu$ M de Lqh7.1 naturelle, de Lqh7.1 synthétique et des analogues de Lqh7.1.

[polypeptide] = 1 μM	pourcentage d'inhibition du courant chlorure Ca <sup>2+</sup> -dépendant (%)
Lqh7.1 naturelle	97 ± 10 % (n=25)
Lqh7.1 synthétique	95 ± 9 % (n=19)
Lqh7.1 [F5Y/Y26F]	43 ± 8 % (n=9)
Lqh7.1[H9Q/Q9Y/Y26F]	17 ± 10 % (n=11)
Lqh7.1[H9Y/Y26F]	12 ± 7 % (n=10)
Lqh7.1[N33Y/Y26F]	5 ± 5 % (n=19)
Lqh7[Y(-1)/Y26F]	

n: nombre d'expériences

#### 3. 4. Discussion.

De nombreuses toxines animales de nature polypeptidique, ont été marquées à l'iode radioactif avec succès. Ces toxines ainsi détectables, sont devenues des outils pharmacologiques de choix dans l'étude des canaux ioniques ou de certains récepteurs membranaires. Cependant, bien que le marquage d'une toxine à l'iode soit une modification simple, dans laquelle un atome d'hydrogène est remplacé par un atome d'iode, le résultat du marquage est beaucoup moins évident. Il arrive en effet que le produit marqué à l'iode perde une grande partie, ou même la totalité de son activité. En effet, l'interaction d'une toxine avec son récepteur fait intervenir un certain nombre de résidus clefs. Les résidus de tyrosine ou d'histidine, qui représentent les sites potentiels de fixation de l'atome d'iode, peuvent compter parmi ces résidus essentiels. L'encombrement stérique de l'atome d'iode (rayon de Van de Waals 2,15 Å), qui n'est pas négligeable devant celui de l'atome d'hydrogène (rayon de van de Waals 1,1 Å), est alors à l'origine de cette perte d'activité. Ainsi, l'iberiotoxine et la scyllatoxine marquées à l'iode perdent une grande partie de leur activité (Auguste et coll., 1991; Koschak et coll., 1997).

Avec les toxines animales, il est toutefois possible de contourner ce problème. En effet, ces toxines possèdent un avantage indéniable, qui est la "tolérance" de leur structure. En effet, un certain nombre de mutations ponctuelles peuvent être réalisées sans que la structure tridimensionnelle ou l'activité n'en soit affectée. Il est donc relativement facile de muter ces toxines afin de déplacer le site de fixation de l'atome d'iode dans la séquence. Dans le cas de l'iberiotoxine, la tyrosine en position 36 a été déplacée sur une position 19 a été remplacé par un résidu de tyrosine, et le résidu de tyrosine en position 36 par un résidu de phénylalanine. Ces mutations ont conduit à un outil biologiquement actif, qui après marquage à l'iode conserve l'activité biologique de la toxine initiale (Koschak et coll., 1997). Quant à la scyllatoxine, le résidu de phényalanine en position 2 a été muté en résidu de tyrosine pour conduire à une toxine biologiquement active et détectable par radioactivité (Auguste et coll., 1990, 1991).

Comme dans le cas de l'iberiotoxine et de la scyllatoxine, le marquage de Lqh7.1 à l'iode entraîne la perte de la capacité de la toxine, à inhiber les courants chlorures Ca<sup>2+</sup>- dépendants. La substitution d'un atome d'hydrogène par un atome d'iode sur le noyau aromatique de la tyrosine 26, n'altère cependant pas la structure tertiaire de la toxine, comme le montre la superposition des spectres de dichroïsme circulaire, de Lqh7.1 naturelle et de Lqh7.1 marquée à l'iode. Ces résultats suggèrent donc, que la tyrosine en position 26 est un résidu essentiel pour l'activité de la toxine.

Dans le but de trouver un analogue radioactif et biologiquement actif de Lqh7.1, cinq analogues de Lqh7.1 ont été synthétisés: Lqh7.1[F5Y/Y26F], Lqh7.1[H9Q/Q9Y/Y26F], Lqh7.1[H9Y/Y26F], Lqh7.1 [N33Y/Y26F] et Lqh7.1[Y(-1)/Y26F]. Tous les analogues de



Lqh7.1 ont été capables de se replier et adoptent tous, une structure comparable à celle de Lqh7.1, indiquant que les mutations ne causent pas de changements significatifs de structure tertiaire. Toutefois, aucun d'entre eux n'a permis d'aboutir à un ligand radiomarqué biologiquement actif. Les trois analogues, Lqh7.1[H9Q/Q9Y/Y26F], Lqh7.1[H9Y/Y26F] et Lqh7.1 [N33Y/Y26F] à 1  $\mu$ M, inhibent un très faible pourcentage des courants chlorures. De ce fait, leur marquage n'a pas été réalisé. Seul, l'analogue Lqh7.1[F5Y/Y26F], dans lequel les résidus de phénylalanine en position 5 et de tyrosine en position 26 ont été permutés, retient une activité d'inhibition des courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants, suffisamment importante pour aboutir à un radioligand susceptible de caractériser les canaux chlorures inhibés. En effet, à 1  $\mu$ M son inhibition sur les courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendant est encore de 50%. Cependant, comme dans le cas de Lqh7.1 naturelle, Lqh7.1[F5Y/Y26F] n'est plus capable d'inhiber les courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendant est encore de 50%.

Malgré ces résultats négatifs, de nombreuses informations quant aux relations structureactivité de la toxine Lqh7.1, s'ajoutent aux premières informations structurales, dans lesquelles la lysine en position 17 apparaît comme un résidu essentiel pour l'activité de la toxine. En effet, les résultats obtenus suggèrent l'importance d'un certain nombre de résidus, dispersés dans la structure de Lqh7.1, pour son activité.

Bien que l'analogue Lqh7.1[F5Y/Y26F] préserve une activité suffisante sur les courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants pour envisager son marquage à l'iode, celui-ci est 15 à 20 fois moins actif que la toxine naturelle, en électrophysiologie. Il est difficile, du fait de la double mutation, d'attribuer la perte d'activité à la mutation Phe5 / Tyr5 ou à la mutation Tyr26 / Phe26. Dans le premier cas, le groupement hydroxyle ajouté en position 5, gênerait l'interaction de la toxine avec le récepteur. Dans le deuxième cas, c'est la perte du groupement hydroxyle en position 26 qui serait à l'origine de la diminution de l'activité. Afin de trancher entre ces deux hypothèses, il serait intéressant de synthétiser et de tester deux toxines, l'une mutée en position 5 uniquement, et l'autre en position 26. Il est toutefois possible que les deux résidus soient impliqués dans l'activité de la toxine. En effet, comme dans le cas de la toxine naturelle marquée à l'iode en position 26, la perte totale de l'activité de l'analogue Lqh7.1[F5Y/Y26F] après le marquage à l'iode, suggère l'importance de la phénylalanine en position 5. Les deux résidus aromatiques, de phénylalanine et de tyrosine, semblent donc impliqués dans l'activité de la toxine. D'autre part, si l'on observe la structure tridimensionnelle de Lqh7.1, nous pouvons constater que ces deux résidus sont relativement proches (Figure 25). Le résidu de phénylalanine 5 se trouve dans la boucle reliant le premier brin  $\beta$ 1 à l'hélice  $\alpha$ , et la tyrosine 26 se trouve dans la boucle reliant les brins  $\beta 2$  et  $\beta 3$ , et ces deux boucles sont proches dans l'espace. Il est donc possible que cette face de la toxine, contenant la phénylalanine et de la tyrosine, interagisse directement avec le récepteur.

Le résidu d'histidine en position 9, apparaît comme un autre résidu important pour l'activité de la toxine. En effet, sa mutation en résidu de tyrosine conduit à un analogue de

200

Lqh7.1 qui inhibe seulement 15 % du courant chlorure, à 1  $\mu$ M. Il est donc probable, que ce résidu situé au début de l'hélice  $\alpha$ , soit impliqué dans l'interaction avec le récepteur.

Enfin, la mutation Asn33 / Tyr33 conduit, quant à elle, à un dérivé encore moins actif qui inhibe seulement 5 % du courant chlorure, à 1  $\mu$ M. Le résidu d'asparagine 33 situé dans la partie C-terminale, est donc soit un résidu important pour l'interaction, soit un résidu situé dans une région importante pour l'activité. En effet, l'asparagine 33 est à proximité du résidu d'arginine 34 C-terminale, qui est à l'origine d'un potentiel électrostatique positif important à la surface de la toxine (Figure 12). Nous pouvons donc également supposer que le résidu d'arginine est un autre résidu essentiel pour l'activité.



Figure 25. Position des mutations dans la structure de Lqh7.1.

Finalement toutes les faces de Lqh7.1 ont été mutées ou marquées à l'iode et ces modifications provoquent une perte d'activité (Figure 25). Au total au minimum 5 positions de la toxine Lqh7.1, sont décrites comme jouant un rôle dans l'activité d'inhibition des courants chlorures; la phénylalanine en position 5, l'histidine en position 9, la tyrosine en position 26, l'asparagine en position 33, mais aussi la lysine en position 17, qui remplacée par un résidu d'acide glutamique dans Lqh2.2, conduit à un analogue de Lqh7.1 dix fois moins actif. La position relative de ces cinq résidus dans la structure, montre que ceux-ci sont dispersés à la surface de la toxine et que chacun d'eux occupe une face de la toxine.

Cette situation n'est pas courante dans le cas des toxines animales ayant pour cible des canaux ioniques. Généralement, seuls quelques résidus situés sur une même face sont essentiels pour l'interaction avec le canal. Dans la toxine PO5, toxine de scorpion qui inhibe avec une bonne affinité les canaux potassiques  $Ca^{2+}$ -dépendants de petite conductance, les trois arginines

essentielles pour l'interaction avec le canal, sont localisées sur l'hélice  $\alpha$  et sont relativement proches (Meunier et coll., 1993; Sabatier et coll., 1993). Dans le cas de la charybdotoxine, qui inhibe les canaux potassiques voltage-dépendants et maxi-K (Canaux potassiques Ca<sup>2+</sup>dépendants de forte conductance), 5 résidus ont été déterminés comme essentiels: la Lys27, la Tyr36, la Met29, l'Asn30 et l'Arg34. Ces cinq résidus sont situés sur la même face de la toxine, c'est à dire sur le feuillet  $\beta$  (Goldstein et Miller, 1993; Goldstein et coll., 1994; Stampe et coll., 1994; Dauplais et coll., 1997).

La sensibilité de Lqh7.1 vis-à-vis de toute variation dans sa séquence, suggère que la toxine Lqh7.1 adopte un mécanisme d'action différent de celui rencontré pour les autres toxines de scorpions, où toutes les faces de la toxine seraient impliquées dans l'interaction avec le canal. D'autre part, il est possible que Lqh7.1 ne se lie pas directement aux canaux chlorures. Cette toxine pourrait se lier à un récepteur indépendant, et moduler ainsi indirectement l'activité des canaux chlorures.

#### 3. 5. Partie expérimentale

#### 3. 5. 1. Marquage à l'iode de Lqh7.1 et test de liaison spécifique

#### 3. 5. 1. 1. Matériels

- Iodo Beads (billes de polystyrène uniformes non poreuses, de *N*-Cloro-benzènesulfonamide), Pierce (Interchim, France).

- [<sup>125</sup>I]Na (2200Ci/mmol), NEN (Bruxelles)

- Filtres de fibre de verre: GF/C de 25 mm de diamètre (Whatman GF/C).

#### 3. 5. 1. 2. Méthode

#### a. Marquage à l'iode de Lqh7.1

• Détermination des propriétés chromatographiques de Lqh7.1

Les propriétés chromatographiques de Lqh7.1 native ont été déterminées sur une colonne de phase inverse C8 LichroCart 100 RP8 (4 x 250 mm; 5  $\mu$ m; 100 Å) avec un gradient d'acétonitrile de 15 à 45 % en 37,5 min, sur un système HPLC Beckman Biosys 510. L'élution a été réalisée à température ambiante avec un débit de 1 ml/min. Lqh7.1 a été détectée à 215 nm.

• Marquage à basse radioactivité spécifique avec [<sup>127</sup>I]Na.

Le marquage à basse radioactivité spécifique a été réalisé sur 27,4 nmoles de Lqh7.1 avec un rapport de concentration [toxine] /  $[^{127}I]$ Na de 1 / 1, et une trace d'iode  $[^{125}I]$ Na. La radioactivté spécifique obtenue était de 46 Ci/mol.

27,4 nmoles de [<sup>127</sup>I]Na ont été incubées avec une bille d'oxydation "Iodo Bead" et 50  $\mu$ l d'une solution de Tris/HCl 1 M à pH 7,4 pendant 10 min à température ambiante (Volume final: 500  $\mu$ l). Une quantité équivalente de toxine (27,4 nmoles) a été ensuite ajoutée. Le milieu de réaction a été incubé pendant 30 min à température ambiante.

La solution de marquage a été ensuite injectée sur la colonne C8 LiChroCART et l'élution a été menée dans les mêmes conditions que pour la détermination des propriétéss chromatographiques de la toxine native.

L'élution des peptides marqués est suivie à 215 nm. 5  $\mu$ l de chaque fraction éluée à une minute d'intervalle, est collectée, puis soumise à un comptage de rayonnement  $\gamma$  par un compteur  $\gamma$  Riostar (Packard). Le profil de radioactivité est superposé au profil d'élution chromatographique.

• Marquage à haute radioactivité spécifique

1 nmole de Lqh7.1 a été marquée à l'iode 125. La solution d'iode 125 était à 2200 Ci/mM et 100 mCi/ml. Le marquage à l'iode 125 a été réalisé dans les mêmes conditions que le marquage à l'iode 127:

20  $\mu$ l de tampon Tris/HCl 1 M à pH 7,5, 22  $\mu$ l d'iode <sup>125</sup>I 3,7  $\mu$ l (1 nmole ) et 1 bille "Iodo Bead", sont préalablement incubés à température ambiante (volume final de 200  $\mu$ l). 1 nmole de Lqh7.1 est ensuite ajoutée à la solution. Les mêmes temps d'incubation que pour le marquage à à basse radioactivité spécifique, ont été utilisés.

La solution a été injectée sur la colonne C8 LiChroCART dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. L'élution a été suivie par la mesure de la radioactivité de chaque fraction alectée.

## b. Détermination du pourcentage de liaison spécifique sur les membranes de veine porte de bœuf

Un test de fixation sur les membranes de veine porte de bœuf a été effectué sur chaque fraction chromatographique collectée (intervalle 1min), obtenue après marquage à haute radioactivité spécifique.

Les essais ont été menés dans un volume final de 1 ml dans un tampon standart (mM) contenant: 50 Tris/HCl à pH 7,4, 130 NaCl, 5,6 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 0,24 MgCl<sub>2</sub>, 11 glucose et 0,2 % d'albumine bovine.

Des aliquots de membranes de veine porte de bœuf ont été incubés pendant 60 min à 4°C avec 0,8 nM de toxine marquée à l'iode 125. Parallèlement, des aliquots de membranes ont été incubés pendant le même temps avec 0,8 nM de toxine marquée et 0,1  $\mu$ M de toxine naturelle. Après incubation, 450  $\mu$ l de chaque milieu d'incubation ont été filtrés sur des filtres de fibre de verre (GF/C de 25 mm de diamètre, Whatman). Ces filtres ont été préincubés dans du tampon Tris/HCl 10 mM à pH 7,4 contenant 0,5% de PEI). Les filtres ont été ensuite lavés par 2 x 5 ml

de tampon de lavage (Tris/HCl 10 mM à pH 7,4). La radioactivité retenue par les filtres a été comptée.

Le pourcentage de liaison spécifique est calculé en soustrayant l'interaction nonspécifique, de l'interaction totale.

## 3. 5. 2. Synthèses peptidiques des analogues de Lqh7.1.

## 3. 5. 2. 1. Synthèses des analogues

### a. Synthèses peptidiques

• Matériels

#### l'agent de couplage

- HBTU: 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate

les solvants et réactifs

- DMF
- NMP
- DCM
- TFA, anhydride acétique, DiEA
- scavengers: p-crésol, p-thiocrésol
- $\beta$ -mercaptoéthanol

## <u>la résine</u>

*p*-Méthyl BenzHydrylAmine (MBHA) (Novabiochem) Charge: 0,57 mmol/g

les groupements protecteurs des chaînes latérales

Boc-Gly-OH	Boc-Pro-OH	Boc-Cys(MeBzl)-OH	Boc-Glu(OcHex)-OH,
Boc-Ala-OH	Boc-Phe-OH	Boc-Asn(Trt)-OH	Boc-His(Dnp)-OH
Boc-Leu-OH	Boc-Thr(Bzl)-OH	Boc-Gln(Trt)-OH	Boc-Lys(Cl-Z)-OH
Boc-Ile-OH	Boc-Tyr(Br-Z)-OH	Boc-Asp(OcHex)-OH	Boc-Arg(Tos)-OH

Méthodes

## Elongation de la chaîne polypeptidique

Les polypeptides ont été synthétisés sur 0,25 mmol de MBHA, selon la procédure standard décrite précédemment pour les analogues de Sf17.

Coupure de la liaison peptide-résine et déprotection des chaînes latérales

#### Déprotection de l'His "Dnp" avant la coupure HF

Le groupement protecteur "Dnp" (dinitrophényl) est stable en milieu acide fort. Afin d'éliminer le groupement Dnp, une attaque nucléophile en milieu basique est nécessaire, avant la coupure HF. Pour cela, la résine est mis en présence d'une solution de déprotection contenant

- 20% de  $\beta$ -mercaptoethanol

- 10% de DiEA

qsp DMF.

La déprotection s'accompagne de l'apparition d'une couleur jaune caractéristique, due à la libération du chromophore "Dnp". La réaction se déroule pendant 2 heures et est renouvelée jusqu'à ce que la couleur jaune disparaisse (généralement 2 fois). La résine est finalement lavée plusieurs fois avec du DMF, puis par du DCM et séchée avec de l'éther diéthylique.

#### "high HF"

1 g de résine est traité par 10 ml d'HF anhydre en présence de:

- 0,5 g de *p*-crésol

- 0,5 g de p-thiocrésol

La réaction est menée à 0°C pendant 2 heures sous agitation.

Après évaporation de l'HF, le peptide déprotégé est précipité dans 10 ml d'éther diéthylique. Les produits secondaires et les *scavengers* solubles dans l'éther, sont éliminés par filtration. Le peptide, lavé et séché, est dissout par 10 ml de TFA pur et immédiatement précipité dans 200 ml d'éther diéthylique. Le peptide est récupéré par centrifugation.

#### Purification des polypeptides linéaires

Le culot obtenu obtenu pour chaque peptide après centrifugation est solubilisé dans une solution de GuCl 6 M contenant 10 mg/ml de DTT. Une chromatographie préparative sur une colonne C18 Nucleosil ( $22 \times 500 \text{ mm}$ ,  $5 \mu \text{m}$ , 300 Å) est réalisée. Le gradient utilisé est: de 0 à 100 % de tampon B en 90 min avec un débit de 2 ml/min. Le tampon A est constitué de: 0,05 % de TFA dans l'eau, et le tampon B de: 80 % de CH<sub>3</sub>CN et 0,045 % de TFA dans H<sub>2</sub>O.

#### b. Repliement des mutants Lqh7.1

Les polypeptides ont été oxydés dans les conditions d'oxydation suivante:

- [polypeptides] dans la solution finale d'oxydation =  $2.10^{-5}$  M

- tampon Tris 0,2 M, pH 8,5
- couple rédox: Cystéine/Cystine; 2 mM/4 mM,
- température ambiante pendant une nuit.

Le repliement des polypeptides a été suivi par chromatographie analytique sur colonne C18 Nucléosyl (4,6 x 250 mm; 5µm; 100Å).

Le dessalage des peptides foldés a été réalisé par HPLC en phase inverse. La solution contenant le peptide oxydé a été au préalable acidifiée avec du TFA pur jusqu'à pH 2,0, puis filtré sur filtre millipore (0,22  $\mu$ m). La solution a été injectée sur une colonne C18 Vydac (22 x 500 mm, 10  $\mu$ m, 300 Å) (débit de 5 ml/min). Un gradient de 0 à 60% de tampon d'acétonitrile à 80% dans l'H<sub>2</sub>O a été utilisé.

#### Purification des polypeptides repliés

#### *Lqh7.1[F5Y/Y26F]*

Colonne:	échangeuse d'ions sulfonyle Vydac
Eluants:	tampon A: acide acétique à 1% dans l'eau
	tampon B: NaCl 1M dans de l'acide acétique à 1%
Débit:	1 ml/min
Détection:	280 nm
Température	ambiante
Gradient:	0 à 25% de tampon B en 60 min.
Dessalage	colonne préparative CN Nucleosil (10 x 500 mm; 5µm; 100 Å)

### Lqh7.1[H9Y/Y26F] I et II

Colonne:	CN Nucleosil, 10 x 500 mm; 5µm; 100 Å
Eluants:	tampon A: $H_2O + 0.05\%$ TFA
	tampon B: CH <sub>3</sub> CN 80% dans H <sub>2</sub> O + 0,045% TFA
Débit	2 ml/min
Détection	280 nm
Température	50°C
Gradient	0 à 30% de tampon B en 60 min.

## Lqh7.1 [N33Y/Y26F]

Colonne:	C18 Nucleosil, 10 x 500 mm; 5µm; 100 Å
Eluants:	tampon A: $H_2O + 0.05\%$ TFA
	tampon B: CH <sub>3</sub> CN 80% dans $H_2O + 0,045\%$ TFA
Débit	2 ml/min

Détection	280 nm
Température	50°C
Gradient	0 à 60% de tampon B en 60 min.

## Lqh7[Y(-1)/Y26F]

Colonne:	C18 Nucleosil, 10 x 500 mm; 5µm; 100 Å
Eluants:	tampon A: $H_2O + 0,05\%$ TFA
	tampon B: CH <sub>3</sub> CN 80% dans H <sub>2</sub> O + 0,045% TFA
Débit	2 ml/min
Détection	280 nm
Température	50°C
Gradient	15 à 60% de tampon B en 60 min.

## 3. 5. 2. 2. Caractérisation physico-chimique des analogues

## a. Méthodes

Les méthodes utilisées sont les mêmes que dans le cas des analogues de Sf17 (Partie 1, Chapitre 2).

#### b. résultats

Tableau 3: Composition en acides aminés et masses moléculaires des analogues de Lqh7.1. Les résultats sont exprimés en moles de résidus par mole de protéine. Les valeurs entre parenthèses représentent le nombre de résidus de la séquence.

acide aminé	Lqh7.1[F5Y/Y26F]	Lqh7.1 [H9Q/Q9Y/Y26F]	Lqh7.1 [H9Y/Y26F]	Lqh7.1 [N33Y/Y26F]	Lqh7.1 [Y(-1)/Y26F]
Asx	1,9 (2)	1,85 (2)	1,9 (2)	0,7 (1)	1,8 (2)
Thr	2,3 (3)	2,5 (3)	2,7 (3)	2,2 (2)	2,6 (3)
Glx	3,8 (4)	3,8 (4)	4 (4)	3,7 (4)	3,8 (4)
Pro	2,1 (2)	1,8 (2)	1,9 (2)	1,7 (2)	1,8 (2)
Gly	4,8 (5)	4,7 (5)	5,1 (5)	4,6 (5)	4,5 (5)
Ala	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
Cys	7,2	6,8 (8)	7,1 (8)	6,5 (8)	5,8 (6)
Ile	1,1 (1)	0,9 (1)	0,9 (1)	1 (1)	0,9 (1)
Leu	1,2 (1)	1(1)	1,1 (1)	1,2 (1)	1 (1)
Tyr	0,7 (1)	0,9 (1)	1 (1)	1,1 (1)	0,8 (1)
Phe	1,1 (1)	1,9 (2)	2,1 (2)	1,7 (2)	1,8 (2)
His	0,6 (1)	x	x	0,7 (1)	1,2 (1)
Lys	2,8 (3)	2,8 (3)	3 (3)	2,7 (3)	2,6 (3)
Arg	0,8 (1)	1 (1)	1,1 (1)	0,8 (1)	0,9 (1)
total	34	34	34	34	35
masse	3646,2	3656,3	3656,3	3679,3	3793,4
calculée					
masse	3646,2	3655,5	3656,2	3678,5	3794,5
observée					



Figure 26. Contrôle de pureté et spectre de masse ESMS de Lqh7.1[F5Y/Y26F]. (a) Chromatographie analytique, colonne C18 Vydac de 0 à 48 % d'acétonitrile en 60 min, débit 1 ml/min, 50°C, 215 nm. (b) Eléctrophorèse capillaire en tampon citrate 20 mM, pH 2,5. Spectre de masse ESMS.

Tous les analogues de Lqh7.1, ont été obtenus avec un pourcentage de purification supérieur à 98,5 %

## REFERENCES

- Abe T, Koyano K, Saisu H, Nishiuchi Y, Sakakibara S. Binding of omega-conotoxin to receptor sites associated with the voltage-sensitive calcium channel. *Neurosci Lett* 1986; <u>71</u> : 203-8
- Adams ME, Myers RA, Imperial JS, Olivera BM. Toxityping rat brain calcium channels with omega-toxins from spider and cone snail venoms. *Biochemistry* 1993; <u>32</u>: 12566-70
- Adjadj E, Naudat V, Quiniou E, Wouters D, Sautiere P, Craescu CT. Solution structure of Lqh-8/6, a toxin-like peptide from a scorpion venom-structural heterogeneity induced by proline cis/trans isomerization. *Eur J Biochem* 1997; 246: 218-27
- Agnel M, Vermat T, Culouscou JM. Identification of three novel members of the calcium-dependent chloride channel (CaCC) family predominantly expressed in the digestive tract and trachea. *FEBS Lett* 1999 ; <u>455</u> : 295-301
- Alton EW, Norris AA. Chloride transport and the actions of nedocromil sodium and cromolyn sodium in asthma. J Allergy Clin Immunol 1996; <u>98</u>: S102-5; discussion S105-6
- Arseniev AS, Kondakov VI, Maiorov VN, Bystrov V. NMR solution spatial structure of "short" scorpion insectotoxin I 5A. FEBS Lett 1984; 165: 57-62
- Auguste P, Hugues M, Grave B, Gesquiere JC, Maes P, Tartar A, Romey G, Schweitz H, Lazdunski M. Leiurotoxin I (scyllatoxin), a peptide ligand for Ca2(+)-activated K+ channels. Chemical synthesis, radiolabeling, and receptor characterization. J Biol Chem 1990; 265: 4753-9
- Barhanin J, Schmid A, Lazdunski M. Properties of structure and interaction of the receptor for omega-conotoxin, a polypeptide active on Ca<sup>2+</sup> channels. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; <u>150</u>: 1051-62
- Baron A, Pacaud P, Loirand G, Mironneau C, Mironneau J. Pharmacological block of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl- current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflugers Arch* 1991 ; <u>419</u> : 553-8
- Bechis G, Sampieri F, Yuan PM, Brando T, Martin MF, Diniz CR, Rochat H. Amino acid sequence of toxin VII, a beta-toxin from the venom of the scorpion Tityus serrulatus. *Biochem Biophys Res Commun* 1984 ; <u>122</u> : 1146-53
- Betz H. Glycine receptors: heterogeneous and widespread in the mammalian brain. *Trends Neurosci* 1991 ; <u>14</u> : 458-61

- Bontems F, Roumestand C, Boyot P, Gilquin B, Doljansky Y, Menez A, Toma F (a). Three-dimensional structure of natural charybdotoxin in aqueous solution by 1H-NMR. Charybdotoxin possesses a structural motif found in other scorpion toxins. *Eur J Biochem* 1991; <u>196</u>: 19-28.
- Bontems F, Roumestand C, Gilquin B, Ménez A, Toma F (b). Refined structure of charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins. *Science* 1991; <u>254</u>: 1521-3
- Bruix M, Jimenez MA, Santoro J, Gonzalez C, Colilla FJ, Mendez E, Rico M. Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by 1H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry* 1993; <u>32</u>: 715-24
- Cabantchik ZI, Greger R. Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes. Am J Physiol 1992; <u>262</u>: C803-27
- Carbone E, Wanke E, Prestipino G, Possani LD, Maelicke A. Selective blockage of voltage-dependent K+ channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 1982 ; <u>296</u> : 90-1
- Carbone E, Prestipino G, Spadavecchia L, Franciolini F, Possani LD. Blocking of the squid axon K+ channel by noxiustoxin: a toxin from the venom of the scorpion *Centruroides noxius*. *Pflugers Arch* 1987; 408 : 423-31
- Chicchi GG, Gimenez-Gallego G, Ber E, Garcia ML, Winquist R, Cascieri MA. Purification and characterization of a unique, potent inhibitor of apamin binding from *Leiurus quinquestriatus* Hebraeus venom. *J Biol Chem* 1988; <u>263</u>: 10192-7
- Chuang RS, Jaffe H, Cribbs L, Perez-Reyes E, Swartz KJ. Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat Neurosci* 1998; <u>1</u>: 668-74

Collins FS Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. Science 1992; 256: 774-9

- Cooper EC, Jan LY. Ion channel genes and human neurological disease:recent progress, prospects, and challenges. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; <u>96</u>: 4759-66
- Couraud F, Jover E, Dubois JM, Rochat H. Two types of scorpion receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon* 1982; <u>20</u>: 9-16

Covelli I, Wolff J. Iodohistidine formation in ribonuclease A. J Biol Chem 1966; 241: 4444-51
- Cruz LJ, Johnson DS, Olivera BM. Characterization of the omega-conotoxin target. Evidence for tissue-specific heterogeneity in calcium channel types. *Biochemistry* 1987 ; <u>26</u>: 820-824
- Darbon H, Weber C, Braun W. Two-dimensional 1H 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; <u>30</u>: 1836-45
- 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 Protein Res 1982; 20: 320-30
- Dauplais M, Lecoq A, Song J, Cotton J, Jamin N, Gilquin B, Roumestand C, Vita C, de Medeiros CLC, Rowan EG, Harvey AL, Menez A. On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. J Biol Chem 1997; 272: 4302-9
- De Dianous S, Hoarau F, Rochat H. Re-examination of the specificity of the scorpion Androctonus australis Hector insect toxin towards arthropods. *Toxicon* 1987; <u>25</u>: 411-7

DeBin JA, Maggio JE, Strichartz GR. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am J Physiol* 1993 ; <u>264</u> : C361-9

- DeBin JA, Strichartz GR. Chloride channel inhibition by the venom of the scorpion Leiurus quinquestriatus. Toxicon 1991; 29 : 1403-8
- Devidas S, Guggino WB. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and ATP. Curr Opin Cell Biol 1997; <u>9</u>: 547-52
- Dreinhöfer J., Gögelein, H., Greger, R. Blocking kinetics of Cl- channels in colonic carcinoma cells (HT29) as revealed by 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB). *Biochim Biophys Acta* 1988 ; <u>946</u> : 135-42
- Elble RC, Widom J, Gruber AD, Abdel-Ghany M, Levine R, Goodwin A, Cheng HC, Pauli BU. Cloning and characterization of lung-endothelial cell adhesion molecule-1 suggest it is an endothelial chloride channel. J Biol Chem 1997; 272: 27853-61
- Eldefrawi AT, Eldefrawi ME. Receptors for gamma-aminobutyric acid and voltage-dependent chloride channels as targets for drugs and toxicants. *FASEB J* 1987; <u>1</u>: 262-71

- Fahlke C, Rhodes TH, Desai RR, George AL Jr. Pore stoichiometry of a voltage-gated chloride channel. *Nature* 1998; 394: 687-90
- Fahlke C, Zachar E, Rudel R. Chloride channels with reduced single-channel conductance in recessive myotonia congenita. *Neuron* 1993 ; <u>10</u> : 225-32
- Fazal A, Beg OU, Shafqat J, Zaidi ZH, Jornvall H. Characterization of two different peptides from the venom of the scorpion *Buthus sindicus*. *FEBS Lett* 1989; <u>257</u>: 260-2
- Fernandez I, Romi R, Szendeffy S, Martin-Eauclaire MF, Rochat H, Van Rietschoten J, Pons M, Giralt E. Kaliotoxin (1-37) shows structural differences with related potassium channel blockers. *Biochemistry* 1994 ; <u>33</u> : 14256-63
- Fontecilla-Camps JC, Almassy RJ, Suddath FL, Watt DD, Bugg CE. Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: a new structural class of neurotoxins. *Proc NatlAcad Sci U S A* 1980; <u>77</u>: 6496-500
- Fontecilla-Camps JC, Habersetzer-Rochat C, Rochat H. Orthorhombic crystals and threedimensional structure of the potent toxin II from the scorpion Androctonus australis Hector. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; <u>85</u>: 7443-7

Foskett JK. CIC and CFTR chloride channel gating. Annu Rev Physiol 1998 ; 60: 689-717

- Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calciumactivated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. J Biol Chem 1990; 265: 11083-90
- Garcia-Calvo M, Knaus HG, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Kempner ES Functional unit size of the charybdotoxin receptor in smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 4718-22
- Garcia-Calvo M, Leonard RJ, Novick J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels. *J Biol Chem* 1993; <u>268</u>: 18866-74
- Giangiacomo KM, Garcia-Calvo M, Hans-Gunther K, Mullmann TJ, Garcia ML, McManus O. Functional reconstitution of the large-conductance, calcium-activated potassium channel purified from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry* 1995; <u>34</u>: 15849-62

Gimenez-Gallego G, Navia MA, Reuben JP, Katz GM, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; <u>85</u>: 3329-33

Gögelein H. Chloride channels in epithelia. Biochim Biophys Acta 1988; 947: 521-47

- Gögelein, H, et Pfannmüller B. Diphenylamine-2-carboxylate inhibits and SITS activates nonselective cation channels in the rat exocrine pancreas. *Pflugers Arch.* 1988; <u>411</u> : R108
- Goldstein SA, Pheasant DJ, Miller C. The charybdotoxin receptor of a Shaker K+ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron* 1994; <u>12</u>: 1377-88
- Gordon D, Martin-Eauclaire MF, Cestele S, Kopeyan C, Carlier E, Khalifa RB, Pelhate M, Rochat H. Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels. J Biol Chem 1996; <u>271</u>: 8034-45
- Gordon D. Sodium channels as targets for neurotoxins. Mode of action and interaction of neurotoxins with receptor sites on sodium channels. *Toxins and Signal Transduction* (Gutman, Y. & Lazarowici, P., eds), 1997 pp. 119-149, Harwood Academic Publishers, The Netherlands.
- Gordon D, Savarin P, Gurevitz M, Zinn-Justin S. Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. J. Toxicol. Toxin Rev. 1998; <u>17</u>: 131-159
- Goyffon M, Landon C. Scorpion toxins and defensins. C R Seances Soc Biol Fil 1998; 192: 445-62
- Gray WR. Disulfide structures of highly bridged peptides: a new strategy for analysis. *Protein Sci* 1993; <u>2</u>: 1732-48
- Grishin EV, Soldatov NM, Tashmuchamedov BA, Atakuviev BU. Isolation, properties, and amino acid composition of toxins from the venom of the central Asiatic Buthus eupeus. Bioorg Khem 1978; <u>4</u>: 450-461
- Grishin, EV, Volkova TM, Soldatova LN. Sov. Bioor. Chem 1982; 8: 155-164
- Gruber AD, Elble RC, Ji HL, Schreur KD, Fuller CM, Pauli BU. Genomic cloning, molecular characterization, and functional analysis of human CLCA1, the first human member of the family of Ca<sup>2+</sup>-activated Clchannel proteins. *Genomics* 1998; <u>54</u>: 200-14

- Gruber AD, Schreur KD, Ji HL, Fuller CM, Pauli BU. Molecular cloning and transmembrane structure of hCLCA2 from human lung, trachea, and mammary gland. *Am J Physiol* 1999 ; <u>276</u> : C1261-70
- Horvath D., Van Belle D, Lippens G, Wodak SJ. Development and parametrization of continuum solvent models. I. Models based on the boundary element method. *J Chem Phys* 1996; <u>104</u>: 6679-6695
- Inoue, I. Modification of K conductance of the squid axon membrane by SITS. J Gen Physiol 1986; <u>88</u>: 507-20
- Jablonsky MJ, Watt DD, Krishna NR. Solution structure of an Old World-like neurotoxin from the venom of the New World scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing. *J Mol Biol* 1995 ; <u>248</u> : 449-58
- Jablonsky MJ, Jackson PL, Trent JO, Watt DD, Krishna NR. Solution structure of a beta-neurotoxin from the New World scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 406-12

Jentsch TJ. Chloride channels. Curr Opin Neurobiol 1993; 3: 316-21

Jentsch TJ, Günther W, Pusch M, Schwappach B. Properties of voltage-gated chloride channels of the ClC gene family. *Physiol (Lond)* 1995; <u>482</u>: 19S-25S

Jentsch TJ. Chloride channels: a molecular perspective. Curr Opin Neurobiol 1996; 6: 303-10

- Jentsch TJ, Friedrich T, Schriever A, Yamada H. The CLC chloride channel family. *Pflugers Arch* 1999 ; <u>437</u> : 783-95
- Johnson BA, Sugg EE. Determination of the three-dimensional structure of iberiotoxin in solution by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 1992; <u>31</u>: 8151-9
- Johnson BA, Stevens SP, Williamson JM. Determination of the three-dimensional structure of margatoxin by 1H, 13C, 15N triple-resonance nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 1994; <u>33</u>: 15061-70
- Kaczorowski GJ, Knaus HG, Leonard RJ, McManus OB, Garcia ML. High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. *J Bioenerg Biomembr* 1996; <u>28</u>: 255-67
- Kharrat R, Mansuelle P, Sampieri F, Crest M, Oughideni R, Van Rietschoten J, Martin-Eauclaire MF, Rochat H, El Ayeb M. Maurotoxin, a four disulfide bridge toxin from Scorpio maurus venom: purification, structure and action on potassium channels. *FEBS Lett* 1997; <u>406</u>: 284-90

- Kim JI, Takahashi M, Martin-Moutot N, Seagar MJ, Ohtake A, Sato K. Tyr13 is essential for the binding of omega-conotoxin MVIIC to the P/Q-type calcium channel. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; <u>214</u> : 305-9
- Klaus W, Broger C, Gerber P, Senn H. Determination of the disulphide bonding pattern in proteins by local and global analysis of nuclear magnetic resonance data. Application to flavoridin. J Mol Biol 1993; <u>232</u>: 897-906
- Knaus HG, Koch RO, Eberhart A, Kaczorowski GJ, Garcia ML, Slaughter RS. [125I]margatoxin, an extraordinarily high affinity ligand for voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *Biochemistry* 1995; <u>34</u>: 13627-34
- Koch MC, Steinmeyer K, Lorenz C, Ricker K, Wolf F, Otto M, Zoll B, Lehmann-Horn F, Grzeschik KH, Jentsch TJ. The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 1992 ; <u>257</u> : 797-800
- Kopeyan C, Martinez G, Lissitzky S, Miranda F, Rochat H (1974). Disulfide bonds of toxin II of the scorpion Androctonus australis Hector. Eur J Biochem 1974; 47: 483-9
- Kopeyan C, Martinez G, Rochat H. Amino acid sequence of neurotoxin III of the scorpion Androctonus austrialis Hector. Eur J Biochem 1979; <u>94</u>: 609-15
- Kopeyan C, Mansuelle P, Sampieri F, Brando T, Bahraoui EM, Rochat H, Granier C. Primary structure of scorpion anti-insect toxins isolated from the venom of *Leiurus quinquestriatus* Quinquestriatus. *FEBS Lett* 1990; 261:23-6
- Koschak A, Koch RO, Liu J, Kaczorowski GJ, Reinhart PH, Garcia ML, Knaus HG. [1251]Iberiotoxin-D19Y/Y36F, the first selective, high specific activity radioligand for high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry* 1997; <u>36</u>: 1943-52
- Kotlikoff MI, Wang YX. Calcium release and calcium-activated chloride channels in airway smooth muscle cells. Am J Respir Crit Care Med 1998; 158 : S109-14
- Koty PP, Pegoraro E, Hobson G, Marks HG, Turel A, Flagler D, Cadaldini M, Angelini C, Hoffman EP. Myotonia and the muscle chloride channel: dominant mutations show variable penetrance and founder effect. *Neurology* 1996; <u>47</u>: 963-8

- Krimm I, Gilles N, Sautiere P, Stankiewicz M, Pelhate M, Gordon D, Lancelin JM. NMR structures and activity of a novel alpha-like toxin from the scorpion *Leiurus quinquestriatus* Hebraeus. J Mol Biol 1999; <u>285</u>: 1749-63
- Landon C, Cornet B, Bonmatin JM, Kopeyan C, Rochat H, Vovelle F, Ptak M. 1H-NMR-derived secondary structure and the overall fold of the potent anti-mammal and anti-insect toxin III from the scorpion Leiurus quinquestriatus quinquestriatus. *Eur J Biochem* 1996; 236: 395-404
- Landon C, Sodano P, Cornet B, Bonmatin JM, Kopeyan C, Rochat H, Vovelle F, Ptak M. Refined solution structure of the anti-mammal and anti-insect LqqIII scorpion toxin: comparison with other scorpion toxins. *Proteins* 1997; <u>28</u>: 360-74
- Lebreton F, Delepierre M, Ramirez AN, Balderas C, Possani LD. Primary and NMR three-dimensional structure determination of a novel crustacean toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus* Limpidus Karsch. *Biochemistry* 1994; <u>33</u>: 11135-49
- Lebrun B, Romi-Lebrun R, Martin-Eauclaire MF, Yasuda A, Ishiguro M, Oyama Y, Pongs O, Nakajima T. A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K+ channels, isolated from *Heterometrus spinnifer* (Scorpionidae) venom. *Biochem J* 1997; <u>328</u>: 321-7
- Lee W, Jablonsky MJ, Watt DD, Krishna NR (a). Proton nuclear magnetic resonance and distance geometry/simulated annealing studies on the variant-1 neurotoxin from the New World scorpion *Centruroides* sculpturatus Ewing. Biochemistry 1994; <u>33</u>: 2468-75
- Lee W, Moore CH, Watt DD, Krishna NR (b). Solution structure of the variant-3 neurotoxin from *Centruroides* sculpturatus Ewing. Eur J Biochem 1994; 219: 89-95
- Legros C, Martin-Eauclaire MF. Scorpion toxins. C R Seances Soc Biol Fil 1997; 191: 345-80
- Li M, McCann JD, Liedtke CM, Nairn AC, Greengard P, Welsh MJ. Cyclic AMP-dependent protein kinase opens chloride channels in normal but not cystic fibrosis airway epithelium. *Nature* 1988; <u>331</u>: 358-60
- Lippens G, Najib J, Wodak SJ, Tartar A. NMR sequential assignments and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels. *Biochemistry* 1995; <u>34</u>: 13-21
- Loirand G, Dacquet C, Pacaud P, Rakotoarisoa L, Sayet I, Mironneau C, Mironneau J. Desmethoxyverapamilsensitive calcium channels in rat portal vein smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1989 ; <u>167</u> : 265-74

- Loret EP, Martin-Eauclaire MF, Mansuelle P, Sampieri F, Granier C, Rochat H. An anti-insect toxin purified from the scorpion *Androctonus australis* Hector also acts on the alpha- and beta-sites of the mammalian sodium channel: sequence and circular dichroism study. *Biochemistry* 1991; <u>30</u>: 633-40
- MacKinnon R, Reinhart PH, White MM. Charybdotoxin block of Shaker K+ channels suggests that different types of K+ channels share common structural features. *Neuron* 1988; <u>1</u>: 997-1001
- Marshall DL, Vatanpour H, Harvey AL, Boyot P, Pinkasfeld S, Doljansky Y, Bouet F, Menez A. Neuromuscular effects of some potassium channel blocking toxins from the venom of the scorpion *Leiurus* quinquestriatus Hebreus. Toxicon 1994; <u>32</u>: 1433-43
- Martin MF, Garcia y Perez LG, el Ayeb M, Kopeyan C, Bechis G, Jover E, Rochat H. Purification and chemical and biological characterizations of seven toxins from the Mexican scorpion, *Centruroides suffusus* Suffusus. J Biol Chem 1987; 262: 4452-9
- Ménez A et Dauplais M. As deadly... As a Scorpion's Sting. The diversity of toxins in scorpion venoms. Science Spectra 1997; <u>8</u>: 44-50
- Ménez A, Bontems F, Roumestand C, Gilquin B, Flavio T. Structural basis for functional diversity of animal toxins. Proceedings of the Royal Society of Edinburg 1992; <u>99B</u> : 83-103
- Ménez A, Functional archtectures of animal toxins: a clue to drug design? Toxicon 1998 ; 36 : 1557-72
- Meunier S, Bernassau JM, Sabatier JM, Martin-Eauclaire MF, Van Rietschoten J, Cambillau C, Darbon H. Solution structure of P05-NH2, a scorpion toxin analog with high affinity for the apamin-sensitive potassium channel. *Biochemistry* 1993; <u>2</u>:1969-76
- Miljanich G. P., Ramachandran J. Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 707-34.
- Miller C. The charybdotoxin family of K+ channel-blocking peptides. Neuron 1995; 15: 5-10
- Miranda F, Lissitzky S, Scorpamins: the toxic proteins of scorpion venoms. Nature 1961; 190: 443-444
- Miranda F, Kupeyan C, Rochat H, Rochat C, Lissitzky S. Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of four neurotoxins from two different sources of *Naja haje* venom. *Eur J Biochem* 1970; <u>17</u>: 477-84

- Morel J-L, Drobecq H, Sautiere P, Tartar A, Mironneau J, Qar J, Lavie J-L, Hugues M. Purification of a new dimeric protein from *Cliona vastifica* sponge, which specifically blocks a non-L-type calcium channel in mouse duodenal myocytes. *Mol Pharmaco.* 1997; <u>51</u>: 1042-1052.
- Morel JL, Macrez-Lepretre N, Mironneau J. Angiotensin II-activated Ca2+ entry-induced release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores in rat portal vein myocytes. *Br J Pharmacol* 1996; <u>118</u>: 73-8
- Nilius B, Viana F, Droogmans G. Ion channels in vascular endothelium. Annu Rev Physiol 1997; 59: 145-70
- Novello JC, Arantes EC, Varanda WA, Oliveira B, Giglio JR, Marangoni S. TsTX-IV, a short chain fourdisulfide-bridged neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom which acts on Ca2+-activated K+ channels. *Toxicon* 1999; <u>37</u>: 651-60
- Olamendi-Portugal T, Gomez-Lagunas F, Gurrola GB, Possani LD. A novel structural class of K+-channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem J* 1996; <u>315</u>: 977-81
- Pashkov VS, Maiorov VN, Bystrov VF, Hoang AN, Volkova TM, Grishin EV. Solution spatial structure of 'long' neurotoxin M9 from the scorpion *Buthus eupeus* by 1H-NMR spectroscopy. *Biophys Chem* 1988; <u>31</u>: 121-31
- Pintar A, Possani LD, Delepierre M. Solution structure of toxin 2 from *centruroides noxius* Hoffmann, a betascorpion neurotoxin acting on sodium channels. *J Mol Biol* 1999; <u>287</u>: 359-67
- Possani LD, Martin BM, Svendsen I. The primary structure of noxiustoxin: a K<sup>+</sup> channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroide noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res Commun* 1982; <u>47</u>, 285-289
- Possani LD. In: Handbook of Natural Toxins (Tu, A. T., Ed.), Vol. 3 pp. 513-550, Marcel Dekker, 1994; New York.
- Rabow LE, Russek SJ, Farb DH. From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABAA receptor research. *Synapse* 1995; <u>21</u>: 189-274
- Ran S, Benos DJ. Immunopurification and structural analysis of a putative epithelial Cl- channel protein isolated from bovine trachea. J Biol Chem 1992; <u>267</u>: 3618-25
- Ran S, Fuller CM, Arrate MP, Latorre R, Benos DJ. Functional reconstitution of a chloride channel protein from bovine trachea. *Biol Chem* 1992; <u>267</u>: 20630-7

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989 ; <u>245</u> : 1066-73

Riordan JR. The molecular biology of chloride channels. Curr Opin Nephrol Hypertens 1992; 1: 34-42

- Rochat H, Rochat C, Miranda F, Lissitzky S, Edman P. The amino acid sequence of neurotoxin I of Androctonus australis hector. *Eur J Biochem* 1970; <u>17</u>: 262-6
- Rochat H, Rochat C, Sampieri F, Miranda F, Lissitzky S. The amino-acid sequence of neurotoxin II of Androctonus australis Hector. *Eur J Biochem* 1972; <u>28</u>: 381-8
- Rochat H, Bernard P, Couraud F. Scorpion toxins: chemistry and mode of action. *Adv Cytopharmacol* 1979; <u>3</u>: 325-34
- Sabatier JM, Zerrouk H, Darbon H, Mabrouk K, Benslimane A, Rochat H, Martin-Eauclaire MF, Van Rietschoten J. P05, a new leiurotoxin I-like scorpion toxin: synthesis and structure-activity relationships of the alpha-amidated analog, a ligand of Ca(2+)-activated K+ channels with increased affinity. *Biochemistry* 1993; <u>32</u>: 2763-70
- Sautiere P, Cestele S, Kopeyan C, Martinage A, Drobecq H, Doljansky Y, Gordon D. New toxins acting on sodium channels from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus* suggest a clue to mammalian vs insect selectivity. *Toxicon* 1998; <u>36</u>: 1141-54
- Schweitz H, Stansfeld CE, Bidard JN, Fagni L, Maes P, Lazdunski M. Charybdotoxin blocks dendrotoxinsensitive voltage-activated K+ channels. *FEBS Lett* 1989; 250: 519-22
- Selisko B, Garcia C, Becerril B, Delepierre M, Possani LD. An insect-specific toxin from Centruroides noxius Hoffmann. cDNA, primary structure, three-dimensional model and electrostatic surface potentials in comparison with other toxin variants. Eur J Biochem 1996; 242: 235-42

Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. Physiol Rev 1999; 79: S23-45

Smith C, Phillips M, Miller C. Purification of charybdotoxin, a specific inhibitor of the high-conductance Ca<sup>2+</sup>activated K+ channel. *J Biol Chem* 1986; <u>261</u>: 14607-13

- Soroceanu L, Gillespie Y, Khazaeli MB, Sontheimer H. Use of chlorotoxin for targeting of primary braintumors. *Cancer Res* 1998; 58: 4871-9
- Stampe P, Kolmakova-Partensky L, Miller C. Intimations of K+ channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. *Biochemistry* 1994; <u>33</u>: 443-50
- Strange K, Emma F, Jackson PS. Cellular and molecular physiology of volume-sensitiveanion channels. Am J Physiol 1996; 270 : C711-30
- Tugarinov V, Kustanovich I, Zilberberg N, Gurevitz M, Anglister J. Solution structures of a highly insecticidal recombinant scorpion alpha-toxin and a mutant with increased activity. *Biochemistry* 1996; <u>36</u>: 2414-24
- Tytgat J, Debont T, Rostoll K, Muller GJ, Verdonck F, Daenens P, van der Walt JJ, Possani LD. Purification and partial characterization of a 'short' insectotoxin-like peptide from the venom of the scorpion *Parabuthus schlechteri. FEBS Lett* 1998; <u>441</u>: 387-91
- Ullrich N, Gillespie GY, Sontheimer H. Human astrocytoma cells express a unique chloride current. *Neuroreport* 1996; <u>7</u>: 1020-4
- Ullrich N, Sontheimer H. Biophysical and pharmacological characterization of chloride currents in human astrocytoma cells. Am J Physiol 1996; 270: C1511-21
- Valdivia HH, Kirby MS, Lederer WJ, Coronado R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; <u>89</u>: 12185-9

Valverde MA, Hardy SP, Sepulveda FV Chloride channels: a state of flux. FASEB J 1995; 9: 509-15

- Vazquez J, Feigenbaum P, Katz G, King VF, Reuben JP, Roy-Contancin L, Slaughter RS, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in sarcolemmal membranes from bovine aortic smooth muscle. Evidence for a direct association with the high conductance calcium-activated potassium channel. J Biol Chem 1989; 264: 20902-9
- Vazquez J, Feigenbaum P, King VF, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in synaptic plasma membranes from rat brain. Evidence for a direct association with an inactivating, voltage-dependent, potassium channel. *J Biol Chem* 1990; <u>265</u> : 15564-71

- Wangemann P, Wittner M, Di Stefano A, Englert HC, Lang HJ, Schlatter E, Greger R. Cl(-)-channel blockers in the thick ascending limb of the loop of Henle. Structure activity relationship. *Pflugers Arch* 1986; <u>407</u> Suppl 2 : S128-41
- Yamaguchi T, Saisu H, Mitsui H, Abe T. Solubilization of the omega-conotoxin receptor associated with voltage-sensitive calcium channels from bovine brain. J Biol Chem 1988; 263: 9491-8
- Zerrouk H, Laraba-Djebari F, Fremont V, Meki A, Darbon H, Mansuelle P, Oughideni R, van Rietschoten J, Rochat H, Martin-Eauclaire MF. Characterization of PO1, a new peptide ligand of the apamin-sensitive Ca<sup>2+</sup>activated K+ channel. *Int J Pept Protein Res* 1996; <u>48</u>: 514-21
- Zerrouk H, Mansuelle P, Benslimane A, Rochat H, Martin-Eauclaire MF. Characterization of a new leiurotoxin I-like scorpion toxin. PO5 from Androctonus mauretanicus Mauretanicus. FEBS Lett 1993 ; 320 : 189-92
- Zhdanova LN, Adamovich TB, Nazimov IV, Grishin EV, Ovchinnikov YA. Sov J Bioorg Chem 1978; <u>3</u>: 366-372
- Zlotkin, E., Miranda, F. et Rochat, H. Chemistry and pharmacology of Buthinae scorpion venoms. 1978 ; in : Arthropod Venoms (Handbook Exp. Pharm.) (Bettini, S., Ed.) <u>48</u> : 317-369, Springer-Verlag, Berlin

PARTIE III. Stratégie alternative pour la purification de constituants à partir de mélanges complexes.

# **Introduction**

Dans le but d'exploiter la richesse d'un venin animal, il est nécessaire d'en séparer les constituants afin d'analyser leurs propriétés pharmacologiques et structurales. En effet, les venins animaux sont des mélanges complexes de substances toxiques diverses. De plus, il est nécessaire de purifier suffisamment de produit pour les études biologiques et structurales, l'intérêt étant de purifier rapidement les différents constituants, avec de bons rendements.

Une grande majorité des substances produites dans les venins, sont des neurotoxines de nature polypeptidique, de moins de 100 résidus d'acides aminés. Parmi les différentes méthodes de chromatographie, la chromatographie en phase inverse apparaît comme une technique de choix pour la purification de mélanges peptidiques complexes, tels que les venins animaux. Cette technique est très résolutive et permet de séparer des constituants peptidiques de structure très proche, n'ayant parfois qu'un résidu d'acide aminé de différence. Cependant, en chromatographie préparative, la séparation complète d'un mélange est souvent limitée par l'élargissement des pics dû à une surcharge de la colonne et par les difficultés à collecter avec précision les pics chromatographiques. Généralement, chaque fraction collectée doit être injectée à nouveau sur la colonne afin d'exploiter de façon maximale le pouvoir résolutif de la colonne et du gradient. A partir d'un mélange aussi complexe que les venins animaux, cette méthode implique un nombre très élevé de nouvelles étapes de chromatographie et une augmentation exponentielle des risques d'erreurs liés aux multiples manipulations. Dans le soucis d'éviter ces deux inconvénients majeurs, une stratégie alternative a été imaginée. Cette stratégie met en œuvre le "re-mélange" judicieux des fractions provenant de la chromatographie initiale, en deux groupes, avant la seconde injection. Le premier groupe contient les fractions paires et le deuxième groupe les fractions impaires, ainsi toutes les fractions voisines dans le second gradient sont séparées.

Cette méthode a été testée sur le venin de serpent *Dendroaspis viridis* et les résultats obtenus ont été publiés dans le périodique "Journal of Chromatography A".

# "Alternate pooling for optimizing high-performance liquid chromatographic fractionation of complex peptides mixtures"

**Reprinted from** 

# JOURNAL of CHROMATOGRAPHY A

Journal of Chromatography A, 839 (1999) 57-69

Alternate pooling for optimizing high-performance liquid chromatographic fractionation of complex peptide mixtures

Nathalie Mokrzycki<sup>\*</sup>, Hérvé Drobecq, Hélène Gras, André Tartar Institut de Biologie et Institut Pasteur de Lille. Département V, URA CNRS 1309, 1 Rue du Professeur Calmette, B.P. 447, 59021 Lille.

France

÷

Received 27 October 1998: received in revised form 28 January 1999; accepted 4 February 1999





Journal of Chromatography A, 839 (1999) 57-69

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

# Alternate pooling for optimizing high-performance liquid chromatographic fractionation of complex peptide mixtures

Nathalie Mokrzycki\*, Hérvé Drobecq, Hélène Gras, André Tartar

Institut de Biologie et Institut Pasteur de Lille, Département V, URA CNRS 1309, 1 Rue du Professeur Calmette, B.P. 447, 59021 Lille. France

Received 27 October 1998; received in revised form 28 January 1999; accepted 4 February 1999

## Abstract

Complete resolution of multi-component mixtures is achieved following a single RP-HPLC run. The resolution is generally limited both by peak broadening, which occurs due to an overloading of the column, and by the limited number of fractions which can be collected. In order to take full advantage of the separation capacity of the gradient, each fraction is often individually submitted to a second chromatographic run under the same conditions. Starting from a complex mixture from which a large number of compounds are expected, this conventional process implies multiple parallel chromatographic steps and rapidly generates a large number of samples resulting in considerable time-consuming manipulations and an increase of errors. To overcome these major drawbacks we propose an original strategy which relies upon the rational pooling of fractions issued from the initial chromatography in two groups, A and B. Since Group A and Group B contain the odd- and even-numbered fractions, respectively, each fraction is removed from its closest neighbors. Each group is then submitted to an additional fractionation under the same chromatographic conditions as used previously. The separation of toxins from *Dendroaspis viridis* snake venom was performed according to this strategy. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Optimization; Toxins; Peptides

# 1. Introduction

High-performance liquid chromatography (HPLC) is the most versatile method for the separation and purification of polypeptides from both natural and synthetic origin [1-3]. This chromatographic technique affords rapid resolution of very complex mixtures including those comprising very similar polypeptides. Nevertheless, the approach to the purification of polypeptides must be tailored to the separation goals. Thus, purification of a single

\*Corresponding author.

polypeptide from a complex mixture will require a different approach to that necessary for separating all components from a mixture. Separation methods employed for this purpose need to be highly resolutive, however this requirement can be restricted to the limited diversity of impurities closely related to the target compound and which must be eliminated during the purification. In some other cases, the aim is to separate all the components of a complex mixture, each one being of particular importance. For this type of separation, reversed-phase HPLC (RP-HPLC), using a gradient of organic modifier, is ideally suited since it allows the separation of a large

0021-9673/99/S - see front matter © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved. PII: S0021-9673(99)00197-1

variety of compounds from very hydrophilic to very hydrophobic during the same chromatographic procedure [2,4–6]. Classical examples of this type of separation include natural mixtures such as the venoms of poisonous animals which contain complex mixtures of toxins or, more recently, mixtures of peptides eluted from MHC class I and class II molecules [7–10]. This is also the case for peptide fragments obtained from protein cleavage in which the complexity will depend upon the nature and efficiency of the enzymatic or chemical agent used [11,12].

However, for most applications, fractionation of complex peptide mixtures is not only performed upon an analytical scale, since components of each fraction will be collected and submitted to various other methods of biological evaluation and/or structural determination such as amino-acid analysis, Edman degradation and/or mass spectrometry, or even NMR. The baseline separation of multi-component mixtures for preparative purposes is, in general, difficult to achieve using a single HPLC run. Even when the theoretical separation capacity of the chromatographic system suggests that it is adequate enough, practically, the resolution is limited both by peak broadening which occurs due to an overloading of the column and by the limited number of fractions which can be collected [13-17]. Not only can the overall resolution not exceed the total number of fractions but even the way the collection of a fraction is started or terminated can determine both the degree of purity and the yield of each component. It is obvious that, for highly complex mixtures, the probability of peak overlap increases with the number and diversity of components present [18]. With respect to these factors, only a limited part of the theoretical resolution capacity of the chromatographic system is generally used (this can be estimated by a comparison with the result for an analytical injection using a short time response for the detector). Thus it is not illogical to run a second chromatography under the same conditions with each of the fractions from the initial separation. Both the decrease in the quantity of neighboring contaminants and the possibility of performing a more accurate fraction collection lead, in general, to additional purification. However, this method has two major restrictions in being time-consuming, since each

fraction must be processed individually, and leading to an exponential number of fractions which rapidly overwhelm storage capacities. Therefore, we report in this paper an alternative strategy, which to our knowledge has never been reported, and which allows optimization of the use of the resolving power of the preparative RP-HPLC system while avoiding the restrictions described above. This strategy, which is well adapted to the case of multi-component peptide mixtures, relies upon the rational pooling of fractions collected during the initial chromatography into two groups which are then 're-injected' separately. The pooling is organized in such a way as to optimize further separation of the mixtures. In order to illustrate this method, we describe below its use for the fractionation of a venom containing a wide variety of peptide toxins.

# 2. Experimental

#### 2.1. Materials and reagents

Lyophilized crude venom from the snake *Den-droaspis viridis* was obtained from Latoxan (Rosans, France). Sephadex G-50 Fine media was from Pharmacia Biotech (Sweden) and C<sub>18</sub> Nucleosil Silica Gel Spherical reversed phase (5  $\mu$ m particle size, 300 Å pore size) from Marcherey–Nagel (Düren, Germany). The sources of reagents were: acetic acid glacial from Carlo Erba (Val de Reuil, France), trifluoroacetic acid (TFA) from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France), and acetonitrile from Merck (Darmstadt, Germany). Distilled water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

## 2.2. Sample preparation

Crude venom (100 mg) was dissolved in 2.5 ml of 1% acetic acid and filtered through a 1  $\mu$ m acrodisc (Gelman) before loading onto a Sephadex G-50 Fine column (1000 mm×25 mm I.D.). The column was equilibrated and eluted with 1% acetic acid at a flow-rate of 40 ml/h. The elution was monitored at 280 nm. The fractions were screened by plasma desorption mass spectrometry (PD-MS) on a Bio-Ion

20  $^{252}$ Cf fission fragment ionization time-of-flight (TOF) mass spectrometer (Uppsala, Sweden) for the presence of low-molecular-mass toxins ( $M_r$ , 3000–8000). The fractions containing these polypeptides were pooled and lyophilized leading to 40 mg of a complex mixture of peptide toxins.

#### 2.3. Preparative RP-HPLC

A preparative column with dimensions  $500 \times 10$ mm I.D. was packed with Nucleosil C<sub>18</sub> reversed phase (See Materials and reagents). Eluent A was an aqueous solution of 0.05% TFA in Milli-Q water, Eluent B was a 80% solution of acetonitrile in Milli-Q water containing 0.045% TFA. The elution gradient was 0 to 5% B over 15 min, 5 to 60% B over 90 min, and 60 to 100% B over 15 min. The flow-rate was kept at 2.5 ml/min, and the column was maintained at 50°C. The UV absorbance of the eluate was monitored at 215 and 280 nm. Fractions were collected manually according to UV absorbance. The HPLC apparatus (Beckman) consisted of a module 126 system Gold programmable solvent pump, and a module 168 system Gold diode array detector. System control and data acquisition were performed using the Gold Noveau date system.

## 2.4. Analytical RP-HPLC

The analytical column with dimensions  $150 \times 4.6$  mm I.D. was packed with the same C<sub>18</sub> Nucleosil reversed phase used for the preparative column. Eluent A was 0.05% TFA in Milli-Q water and eluent B was 80% acetonitrile containing 0.045% TFA in Milli-Q water, as during the preparative chromatography. The elution gradient was 0 to 60% of eluent B over 30 min. The flow-rate was kept at 1 ml/min and the column was maintained at 50°C. The UV absorbance was monitored at 215 nm. The HPLC apparatus (Shimadzu) consisted of a LC-10AS liquid chromatograph system pump, a SPD-10A UV–Vis detector and a SIL-10AXL autoinjector.

#### 2.5. Capillary electrophoresis (CZE).

CZE was carried out on an Applied Biosystem HPCE 270A-HT capillary electrophoresis system (Foster City, CA, USA) in 20 mM sodium citrate buffer pH 2.5 at 30°C for 10 min, using a 50 cm×50  $\mu$ m diameter capillary. Samples were injected under 5-in. Hg vacuum (1 in.=2.54 cm; 1 cm Hg=1333.22 Pa). Electrophoretic separation was monitored at 200 nm.

## 2.6. Edman sequencing

Peptides were spotted on a glassfiber filter previously treated with Biobrene Plus. Sequences were performed on an Applied Biosystem, Procise 492 protein sequencer, using standard pulse liquid program. Phenylthiohydantoin (PTH) derivatives were separated and quantified by RP-HPLC over a Brownlee Spheri-5 PTH 5  $\mu$ m, C<sub>18</sub> column (220×2.1 mm I.D.) using the Model 140C Microgradient Delivery System and the Model 785A UV detector.

#### 3. Results and discussion

The venomous glands of animals produce a complex mixture of toxins among which small peptidic toxins ranging in size from  $M_r$  3000 to 8000 affect cellular receptors or ion channels with high selectivities and prove therefore to be of the highest interest for the characterization of these receptors [19,20]. Structural and pharmacological studies of these toxins are often hampered by the difficulties encountered in their purification which constitutes a critical step in these studies. RP-HPLC is by far the most widely used mode of HPLC at present. The ability of this technique to separate peptides of very closely related structure is ideally suited for the separation of peptidic toxins from complex samples. It performs separation in a practical and convenient manner. For these reasons, RP-HPLC using a gradient of organic modifier was selected from amongst the different modes of purification for the separation of the peptidic compounds from Dendroaspis viridis venom.

In order to select toxins in the range  $M_r$  3000– 8000, the venom was first submitted to gel filtration in order to discard compounds of low molecular mass, such as salts or organic polyamine components and large biomolecules corresponding to mucines or enzymes, thereby facilitating the following investigation of the polypeptidic mixture by RP-HPLC. Gel filtration of the crude *Dendroaspis viridis* snake venom was performed on a Sephadex G-50 Fine column (1000×26 mm I.D.). TOF-PD-MS allowed the selection of a fraction containing polypeptides with a mass ranging from 3000 to 8000. After lyophilization, the mixture of peptidic toxins (40 mg) was dissolved in 0.05% TFA and loaded onto a preparative  $C_{18}$  Nucleosil column (500×10 mm I.D.). The elution gradient was 5 to 60% solvent B over 90 min and peaks were collected manually between two inflexion points. At the end of this first purification, 27 fractions were obtained (Fig. 1a). Each of these fractions was then controlled using two different criteria. Analytical RP-HPLC was performed with the same eluting buffers and a  $C_{18}$ 

2

(a)

Nucleosil column  $(250 \times 4.6 \text{ mm I.D.})$  packed with the same stationary phase as preparative RP-HPLC. This method performed in non-overloading conditions was used to evaluate the resolving capacity of the chromatographic system under ideal conditions. Thus, the ability of this analytical system to separate several peaks in an individually collected fraction indicated that the separation capacity had not been fully exploited, due to both column overloading and/ or inaccuracy in fraction collection. The second control was performed using an orthogonal method, capillary zone electrophoresis (CZE). In this case, it was possible to evaluate the homogeneity/heterogeneity of each fraction better, though no information was forthcoming concerning the possible

100



12<sub>13</sub>

15

Fig. 1. (a) Initial RP-HPLC of the peptidic fraction from *Dendroaspis viridis* snake venom; (b) and (c) alternate second RP-HPLC of pool A containing odd fractions and pool B containing even fractions, respectively. Experimental conditions: column,  $500 \times 10$  mm I.D., packed with C<sub>18</sub> Nucleosil reversed phase, 5  $\mu$ m, 300 Å; flow-rate, 2.5 ml/min; gradient elution, 5 to 60% B in 75 min; detection, UV at 215 and 280 nm; temperature, 50°C.

separation of these components using the initial system.

Due to the complexity of the initial peptide mixture, to the overloading of the column and to the difficulty of collecting fractions with accuracy, only five (1, 2, 16, 23 and 26) of the 27 fractions collected were found to be homogeneous according to both analytical RP-HPLC and CZE criteria. When examined by analytical RP-HPLC, most of the remaining fractions displayed several component indicating that the actual resolving capacity of the chromatographic system (stationary phase and gradient) had been underexploited (Fig. 2). This observation implies that further purification could still be obtained by re-injecting each fraction under the same chromatographic conditions. In order to accelerate and simplify the chromatographic steps to be

repeated, we have adopted an original pooling strategy before the re-injection. Fractions 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 and 27 were pooled leading to 'pool A' while fractions 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 and 26 were pooled leading to 'pool B'. Thus, as illustrated in Fig. 3 (left) the pooling is organized in such a way that when a peak is present in pool A, both the peak eluting immediately before and after it in the gradient will be added to 'pool B'. The incidence of overloading on peak overlapping is greatly decreased due to the fact that each major peak in a pool is now contaminated by only traces of its most closely eluting congeners. This not only decreases contamination by peak overlapping but also allows more accurate fraction collection consistent with the decrease in the number of peaks in the chromatogram [Fig. 3 (right)]. Pools



Fig. 2. Analytical RP-HPLC profiles following initial chromatography of fractions 19 (a), 20 (b) and 21 (c). Experimental conditions: column,  $150 \times 4.6$  mm I.D., packed with the same reversed phase used for the preparative column; flow-rate, 1.0 ml/min; elution gradient, 0 to 60% B in 30 min; detection, UV at 215 nm; temperature, 50°C.



Fig. 3. (Left) Alternate pooling. Following the initial separation, the collected fractions are systematically pooled in two groups in such a manner that the two neighbors of each peak (n - 1 and n + 1) will be added to the other pool. For example, pool A will contain peaks 1, 3 and 5 while pool B will contain peaks 2, 4 and 6. (Right) Initial chromatography and alternate second chromatographies under the same conditions as used for the initial chromatography, with pool A and pool B.

A and B were submitted to lyophilization and then fractionated separately using the same preparative column and the same gradient elution as previously (Fig. 1b). It should be noted that an optimal utilization of the gradient is thus performed during the second chromatography compared to the case where fractions are re-injected individually and only a small portion of the gradient is involved in the separation. An additional advantage is the limiting of the effect of non-specific adsorption, aggravated when a small quantity is loaded on a column.

Following the second chromatographic run, each collected fraction was submitted to the same analytical evaluation as indicated above, analytical RP-HPLC and CZE. The identity of each component was assessed by its retention time during analytical RP-HPLC. Table 1 presents the relative proportions of the major species in each fraction as estimated by the integration of the peak area following the initial and the alternate second chromatography. The evolution of the major component was representative of the progress of the purification process. For 15 of the 22 fractions, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21 25 and 27, which contained at least two components at the end of the initial chromatography, the re-injection was beneficial. The degree of purity of some of these fractions was slightly improved without complete removal of the contaminants. For instance, fractions 10 and 11 were contaminated by 12% and fraction 11 by 24% of impurities (Fig. 4). Judging by the retention time of the major component of both fractions, the contamination of fraction 10 came from fraction 11 and vice versa. Following the alternate second chromatographic run, peak 11 decreased from 12 to 7% in fraction 10 and peak 10 from 24 to 12% in fraction 11. So, less than half of the impurities were removed from these fractions following the alternate second chromatographic run. Fractions 7, 8 and 17 were also slightly improved. Best results were obtained for the fractions 5, 6, 14, 18, 19, 20, 21 and 25, which were clearly enriched in their own component following the alternate second chromatographic run. The apparent impurities of fractions 19 and 21 revealed by analytical RP-HPLC were removed (Fig. 5c,d and g.h). A similar improvement was also observed for fraction 5. The contaminants of fractions 6, 14, 18, 20 and 25 did not totally disappear, but a significant

#### Table 1

Percentage of major component in each fraction following the initial and alternate RP-HPLC chromatography. The percentage is estimated by integration of the analytical RP-HPLC profiles. Experimental conditions: column  $150 \times 4.6$  mm I.D., C<sub>18</sub> Nucleosil reversed phase, 5  $\mu$ m, 300 Å; flow-rate, 1.0 ml/min; elution gradient, 0 to 60% B over 30 min; detection, UV 215 nm; temperature, 50°C

Fraction number	RP-HPLC	
	Initial	Alternate
l	100	100
2	100	100
3	h⁺	h
4	h	h
5	89	100
6	78 、	92
7	90 `	94
8	83	88
9	h	h
10	88	93
11	75	85
12	73	74
13	h	h
14	66	96
15	35	57
16	100	100
17	82	88
18	74	93
19	79	100
20	60	88
21	91	100
22	83	83
23	100	100
24	62	62
25	68	92
26	100	100
27	40	60

<sup>a</sup>h, heterogeneous.

increase in the degree of purity, was observed. Fig. 4 displays the RP-HPLC analytical profiles of fractions 14 (a, b); 20 (e, f) and 25 (i, j) before and following the alternate second chromatographic run. For these five fractions the contaminating species decrease at least two-thirds following the alternate second chromatography. In order to evaluate the method for fractions 19 and 20, both were submitted to Edman sequencing following each chromatographic step (Fig. 6). The efficiency of Edman degradation depends upon the proteins; for both contaminated fractions the sequence determination of the major component remained difficult at the end of the initial



Fig. 4. Comparison of the analytical RP-HPLC profiles of fractions 10 (a, b) and 11 (c, d) following the initial chromatography and the alternate second chromatography. Experimental conditions as in Fig. 2.

chromatographic run. As displayed in the chromatogram of the first cycle of Edman degradation, two and three PTH-amino acid derivatives in fractions 19 and 20, respectively, were released with a similar ratio preventing the direct determination of the first residue of each major component following the initial chromatographic run. By the end of the second chromatographic run, the decrease in PTH-Met in sample 19 indicated that the first amino acid residue of the major component was a leucine residue. In the case of fraction 20, the PTH-Met and the PTH-Leu in the first cycle of Edman degradation disappeared following the second chromatographic run which led to the determination of an arginine as the first amino acid residue of the major component of fraction 20. In the same manner, the second residue of each component was unambiguously determined following the second chromatographic run. It should be noted that Edman sequencing revealed remaining contaminant in fraction 19 following the alternate second chromatography which was not detected by analytical RP-HPLC and CZE, where only a single

peak was detected following each chromatographic run.

Although the benefit of the alternate second chromatographic run on fractions 15 and 27 was not clear, interesting results were obtained. Both fractions were severely contaminated by their closest neighboring fraction, which were recovered in higher yield than the major component following the initial chromatographic run. Fig. 7 displays the chromatographic profile of fractions 15 and 16. Following the first chromatographic run, peak 16 was almost twice as large as peak 15 in fraction 15. This was not surprising when the strong overlap of peak 16 upon peak 15 in the initial preparative chromatography is considered. Following the second run, peak 16 decreased significantly, rendering peak 15 the larger of the two. Then, the second chromatographic run clearly enriched fraction 15 with its own component. A complementary method of separation could take advantage of this improvement. Similar data were obtained with fraction 27, which was contaminated with peak 26.



Fig. 5. Comparison of the analytical RP-HPLC profiles of fractions 14 (a, b), 19 (c, d), 20 (e, f), 21 (g, h) and 25 (i, j) following the initial chromatography and the alternate second chromatography, respectively. Experimental conditions as in Fig. 2.



Fig. 6. First and second cycle of Edman degradation performed on fraction 19 (a, b) and 20 (c, d) following the initial chromatography and the alternate second chromatography. PTH-R (phenylthiohydantoin-arginine), PTH-M (phenylthiohydantoin-methionine), PTH-L (phenylthiohydantoin-leucine), PTH-E (phenylthiohydantoin-glutamic acid), PTH-P (phenylthiohydantoin-proline), PTH-K (phenylthiohydantoin-lysine). PTH-Amino acid were separated and quantified by reversed-phase HPLC over a Brownlee Spheri-5 PTH 5  $\mu$ m, C<sub>18</sub> column, 220×2.1 mm I.D. Mepitc: methylphenylthiocarbamate.



Fig. 7. Analytical RP-HPLC profiles of fractions 15 (a, b) and 16 (c, d) following the initial and the alternate second chromatography, respectively. Experimental procedure as in Fig. 2.

For seven of the heterogeneous fractions following the initial chromatographic run, no improvement was observed. Although the contaminant of the major component of fraction 12 was resolved during the analytical RP-HPLC (Fig. 8a,b), no decrease of this contaminant was observed after the second chromatographic run. Fraction 12 was large and still overlapped its contaminant following the second preparative chromatographic run. In this case it may be necessary to sacrifice sample load to expect elimination of the contaminating compound. As for fraction 12, fraction 22 was not improved. Fraction 13 contained several major components which could not be resolved during the initial chromatography and had been collected simultaneously, preventing them from being alternatively pooled (Fig. 8c,d). The same phenomenon was observed for fractions 4, 9 and 24. In the case of fraction 3, the contaminants co-eluted in analytical RP-HPLC and could only be revealed using the orthogonal CZE method (Fig.

8e,f), indicating that no separation by RP-HPLC could be expected and another purification method should be found.

Finally, the fractions which could be improved by the alternate second chromatographic run were improved, making eventual further purification steps easier.

## 4. Conclusion

The process of alternate pooling is very simple, allowing us to achieve optimal utilization of the chromatographic system (gradient and column) in a minimum time, avoiding exponential multiplication of collected fractions and limiting the risk of losses of material by non-specific adsorption which occurs when small quantities are injected alone during further purification steps. The direct coupling of the second runs with mass spectrometry can be envis-



Fig. 8. Analytical RP-HPLC profiles following the initial and the alternate second chromatography of fraction 12 (a, b), fraction 13 (c, d) and fraction 3 (e, f). Experimental conditions as in Fig. 2. Capillary electrophoretic profiles following the initial (e') and the alternate second chromatography (f'). Experimental conditions: 50 cm  $\times$  50  $\mu$ m I.D. capillary; buffer, 20 mM sodium citrate pH 2.5; electrophoretic migration, 10 min; detection, UV at 200 nm; temperature, 30°C.

aged. More generally, this method will allow the partitioning of natural extracts or other complex mixtures of peptides or organic compounds in a format that can be useful for systematic parallel analytical determination, and inclusion in high throughput screening for pharmacological evaluation.

## Acknowledgements

We thank Steve Brooks for proof reading the English.

#### References

- [1] C. Mant, R. Hodges, J. Liq. Chromatogr. 12 (1989) 139-172.
- [2] J.-X. Huang, G. Guiochon, J. Chromatogr. 492 (1989) 431– 469.
- [3] M. Hearn, Adv. Chromatogr. 20 (1982) 1.
- [4] P. Jandera, J. Churacek, Gradient Elution in Column Liquid Chromatography - Theory and Practice, Elsevier, Amsterdam, 1985.
- [5] F. Regnier, Science 222 (1983) 245.
- [6] C. Mant, R. Hodges, in: K. Gooding, F. Regnier (Eds.), High-performance Liquid Chromatography of Biological Macromolecules: Methods and Applications, Marcel Dekker, New York, 1990.
- [7] J.-R. De Weille, H. Schweitz, P. Maes, A. Tartar, M. Lazdunski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 2437-2440.

- [8] M. Adams, V. Bindokas, L. Hasegawa, V. Venema, J. Biol. Chem. 265 (1990) 861-867.
- [9] K. Falk, O. Rötzschke, S. Stevanovic, G. Jung, H.-G. Rammensee, Nature 351 (1991) 290-296.
- [10] T. Jardetzky, W. Lane, R. Robinson, D. Madden, D. Wiley, Nature 353 (1991) 326-329.
- [11] D. Corradini, LC·GC Int. 9 (1996) 732-740.
- [12] A. Babu, K. Puri, T. Gowda, Int. J. Peptide Protein Res. 46 (1995) 69-72.
- [13] P. Gareil, L. Personnaz, J.-P. Feraud, M. Caude, J. Chromatogr. 192 (1980) 53-74.
- [14] G. Cox, L. Snyder, J. Dolan, J. Chromatogr. 484 (1989) 409-423.
- [15] N. Wilson, J. Kern, J.W. Dolan, LC·GC Int. 9 (1998) 350– 354.
- [16] G. Guiochon, S. Golshan-Shirazi, A. Jaulmes, Anal. Chem. 60 (1988) 1856.
- [17] Y.-B. Yang, K. Harrison, D. Carr, G. Guiochon, J. Chromatogr. 590 (1992) 35-47.
- [18] V. Meyer, T. Welsch, LC·GC Int. 9 (10) (1996) 670-681.
- [19] M. Dauplais, A. Ménez, Sci. Spectra 8 (1997) 44-50.
- [20] D. Jerusalinsky, A.L. Harvey, Trends Pharmacol. Sci. 15 (1994) 424-430.

**CONCLUSION GENERALE** 

# **CONCLUSION GENERALE**

La caractérisation de nouvelles toxines animales, pour lesquelles les cibles spécifiques sont connues, représente un apport scientifique essentiel à deux égards. L'identification de nouveaux antagonistes polypeptidiques aussi spécifiques et affins que les toxines animales, contribue à la classification des innombrables sous-types de canaux ioniques, et à la compréhension de leur rôle physiologique. D'autre part, la connaissance de nouvelles séquences de toxines appartenant à des familles présentant des topographies différentes, est nécessaire pour comprendre les mécanismes d'action et les éléments essentiels qui sont à l'origine de la spécificité de ces toxines.

L'identification d'une nouvelle famille de toxines, agissant sur les canaux calciques à partir du venin de l'araignée *Segestria florentina*, rentre dans cette double perspective. Les six toxines ayant des spécificités différentes pour les canaux calciques neuronaux, permettront de mieux caractériser les différents sous-types de canaux calciques. De plus, l'une d'entre-elle, la toxine Sf20, présente une activité intéressante sur les canaux de type R- exprimés par le gène  $\alpha_{1E}$ , pour lesquels des ligands spécifiques sont encore très recherchés. Des études biologiques plus détaillées sont cependant encore nécessaires pour juger plus précisément de l'utilité de chacune de ces toxines dans l'étude des canaux calciques.

D'autre part, cette nouvelle famille de toxines adopte une distribution originale des acides aminés et pour la première fois, un motif en hélice  $\alpha$  a été mis en évidence dans la structure tertiaire de toxines d'araignées agissant sur les canaux calciques. La comparaison des séquences primaires des toxines de *Segestria florentina* avec les  $\omega$ -Aga IV A et B, isolées du venin d'araignée *Agelenopsis aperta*, permet de suggérer que ces toxines utilisent un mécanisme de double interaction avec le canal, faisant intervenir un motif chargé positivement et un segment hydrophobe. Des analogues de Sf17 ont été synthétisés pour permettre de valider cette hypothèse. L'activité biologique de ces analogues, qui n'a pas pu être étudiée pour le moment, devrait nous renseigner sur ce mécanisme. Finalement, la caractérisation de cette nouvelle famille de toxines de spécificités différentes vis-à-vis des canaux calciques neuronaux, permettra de mieux comprendre les mécanismes d'action des toxines animales et de mieux discerner les éléments essentiels à l'origine de la sélectivité des toxines animales.

Dans le cadre de l'étude des canaux calciques, des récepteurs sensibles à la mapacalcine ont été mis en évidence dans le cerveau de rat. Cette toxine d'éponge de mer bloque spécifiquement un nouveau sous-type de canal calcique, pour lequel aucun ligand spécifique n'est connu. D'autres récepteurs sensibles à la mapacalcine ont déjà été mis en évidence sur les myocytes d'intestin de souris et sur les cellules hépatocytaires. Il semble donc, que le canal calcique sensible à la mapacalcine soit présent dans de nombreux tissus. Pour le moment, très peu d'informations sont disponibles sur ce canal. La mise au point de la mapacalcine couplée à la biotine, qui conserve l'activité de la toxine naturelle, permettra de purifier le récepteur de la mapacalcine et de déterminer s'il s'agit d'un canal calcique classique, ou d'une sous-unité régulatrice de ce canal.

Aujourd'hui, des ligands spécifiques et affins ciblés contre les canaux chlorures sont très recherchés pour caractériser et classer les différents sous-types de cette famille de canaux ioniques. Lqh7.1 est une toxine isolée à partir du venin de scorpion *Leiurus quinquestriatus* Hebraeus, capable d'inhiber avec une bonne affinité des courants chlorures Ca<sup>2+</sup>-dépendants situés sur les myocytes vasculaires. Afin, d'obtenir un ligand pharmacologique détectable de cette toxine, pour envisager la détermination exacte de son affinité et la purification de son récepteur, celle-ci a été marquée à l'iode 125. Du fait de la perte d'activité de la toxine suite au marquage, plusieurs analogues de cette toxine dans lesquels le site de fixation de l'atome d'iode a été déplacé, ont été synthétisés. Cependant, aucun de ces analogues n'a permis d'aboutir à un ligand pharmacologique utilisable. En effet, toutes les faces de la toxine sont sensibles au marquage à l'iode ou aux mutations. Si Lqh7.1 se lie directement sur le canal chlorure, ces résultats suggèrent que celle-ci, adopte un mode d'interaction avec le canal, différent de celui rencontré pour les autres toxines animales, où toutes les faces de la toxine seraient impliquées dans l'interaction.

Enfin, une stratégie alternative de purification de constituants à partir de mélanges complexes, a été développée est testée. Celle-ci a été utilisée avec succès dans la purification des toxines à partir du venin de serpent *Dendroaspis viridis*. Cette nouvelle stratégie permet, en un minimum de temps, d'utiliser de façon optimale le système de chromatographie choisi. Elle limite la multiplication des fractions collectées, les risques d'erreurs et la perte de matériel due à l'adsorption non-spécifique qui survient lorsque de faibles quantités sont injectées sur une colonne chromatographique. Cette méthode simple de purification pourra être appliquée à d'autres types de mélanges complexes, constitués de polypeptides ou de substances organiques. D'autre part, elle facilitera le criblage pharmacologique de substances organiques ou peptidiques à partir de mélanges complexes.

