

CHROM. 9894

Note

Synthèse d'un N-méthylacridinium-Sépharose: son utilisation dans la purification des cholinestérases

G. BLANCHET, J. PICARD et P. MORELIS

Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Division de Chimie et Pharmacologie, 69272 Lyon Cedex 1 (France)

(Reçu le 22 décembre 1976)

L'ion N-méthylacridinium (MA) est un inhibiteur des cholinestérases par le jeu d'une fixation de l'atome d'azote quaternaire sur le sous-site anionique^{1,2}. La faible constante de dissociation, à force ionique élevée (1 M), du complexe enzyme-N-méthylacridinium est à la base d'une méthode permettant la purification des formes natives 14 et 18 S de l'acétylcholinestérase (AChE) d'*Electrophorus electricus*^{3,4}.

Nous avons voulu vérifier si l'ion acridinium pouvait permettre la préparation d'AChE des organes électriques de *Torpedo marmorata*.

Par ailleurs, dans la purification de la butyrylcholinestérase (BuChE) du sérum humain par chromatographie d'affinité, nous avons montré la nécessité d'utiliser des gels qui permettent de travailler à force ionique élevée, minimisant ainsi les phénomènes d'échange d'ions aspécifiques⁵. La faible constante de dissociation, ajoutée au caractère compétitif de l'inhibition des BuChE par les ions acridinium, nous a incité à synthétiser une colonne N-méthylacridinium-Sépharose, en vue de leur purification.

Cependant, devant les difficultés de la réalisation de la colonne d'affinité préconisée par Dudai et Silman⁴, nous avons été amenés à modifier le schéma de synthèse de la matrice.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Préparation du gel d'affinité

Synthèse du 9-chloro-10-méthylacridinium (9-CMA). La 9-chloroacridine (9-CA) est synthétisée selon la méthode d'Albert⁶. Il est impératif de purifier la 9-CA par recristallisation, dans un mélange éthanol-eau ammoniacquée (0.5%, v/v), suivie d'une deuxième recristallisation dans le benzène, pour éliminer l'acridone.

La méthylation de la 9-CA par le diméthyle sulfate est pratiquée sous reflux de toluène. Le produit brut précipite et on le lave avec du toluène, puis de l'éther anhydre et froid. Le 9-CMA se présente sous la forme d'une poudre orange se décomposant vers 90°. Il est très soluble dans l'eau, où il développe une fluorescence verte intense. La solution aqueuse se dégrade rapidement en N-méthylacridone.

Préparation du MA-Sépharose. Le Sépharose 4B, activé au bromure de cyano-gène, est traité par de l'acide 6-aminohexanoïque. On fixe ensuite le 1,3-diaminopropane en présence de N-cyclohexyl-N'-2-(4-morpholinyl)-éthyl carbodiimide méthyl-

p-toluène sulfonate à pH 5.2. Le gel est lavé, remis en suspension dans l'eau distillée et le pH est fixé à 8 par addition de soude 20%. Le 9-CMA est alors ajouté en très fort excès et on laisse la condensation se poursuivre pendant 12 h.

Le MA-Sépharose est lavé rapidement par un mélange éthanol-eau (1:1, v/v) pour éliminer la N-méthylacridone formée durant la réaction de couplage. Nous avons vérifié au microscope que ce traitement à l'alcool n'introduisait pas de modifications visibles des perles de Sépharose. Finalement, le gel est lavé abondamment à l'eau distillée, puis équilibré dans le tampon de fixation.

Mesure des activités

L'activité butyrylcholinestérasique est déterminée par la méthode d'Ellman *et al.*⁷, à 25° et à pH 7.4 avec, pour substrat, l'iodure d'acétylthiocholine (5 mM). L'unité d'activité (u) est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse l'hydrolyse de 1 μ mole d'iodure d'acétylthiocholine par min, à 25°. La mesure de l'activité acétylcholinestérasique est effectuée au pH-stat. Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry *et al.*⁸. L'activité spécifique est le nombre de μ moles de substrat hydrolysées par mg de protéine.

Obtention des préparations enzymatiques

Acétylcholinestérase. Les organes frais de *Torpedo marmorata*, découpés en petits morceaux, sont homogénéisés dans deux volumes de tampon phosphate 0.01 M-NaCl (1 M) (pH 7.4). L'homogénat est alors soumis à deux centrifugations: l'une à 10,000 g pendant 1 h, suivie d'une deuxième à 30,000 g pendant 2 h. Le surnageant de la deuxième centrifugation constitue notre matériel de départ.

Butyrylcholinestérase. Le MA-Sépharose a été testé dans la purification de la cholinestérase de sérum de cheval, par chromatographie du sérum préalablement dialysé contre un tampon phosphate 0.01 M-NaCl 0.16 M (pH 7.4).

Protocole général de chromatographie

Le MA-Sépharose (40 ml) est équilibré dans une colonne 1.6 \times 20 cm par un tampon phosphate 0.01 M-NaCl 1 M (pH 7.4; tampon A) pour les BuChE, ou par un tampon phosphate 0.01 M-NaCl 1 M (pH 7.4; tampon B) pour l'AChE. La préparation enzymatique est admise sur le gel (20 ml/h).

Le lavage des colonnes pour éliminer les protéines étrangères est pratiqué par 40 volumes de tampon B (AChE) ou par le même volume de tampon phosphate 0.01 M-NaCl 0.6 M (pH 7.4; tampon C) pour la BuChE. L'éluion des cholinestérasés est assurée soit par 5 volumes de Décaméthonium 2×10^{-2} M dans le tampon B (AChE), soit par 5 volumes de NaCl 1.5 M dans le tampon A (BuChE).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chromatographie de l'AChE de T. marmorata

Le Tableau I montre que l'on purifie l'AChE 90 fois en un seul passage sur le MA-Sépharose. Cependant, le rendement est faible (17.5%). Sur les 100,000 unités (u) déposées, 53,000 u se retrouvent dans les eaux de lavage. La capacité opérationnelle de la colonne est donc de 1,200 u/ml environ. Par ailleurs, on ne retrouve, dans l'éluat (Décaméthonium 20 mM), que 37% de l'AChE fixée. Cette impossibilité de

TABLEAU I

CHROMATOGRAPHIE DE L'ACHÉ DE *TORPEDO MARMORATA* SUR LE MA-SÉPHAROSE

L'activité dans l'éluat Décaméthonium est déterminée après dialyse et concentration (4 fois) sur PM 30.

| Expériment | Protéines totales (mg) | Unités (u) | Activité spécifique (u/mg) | Rendement (%) | | Enrichissement |
|---------------------|------------------------------|---------------|----------------------------------|---------------|-------|----------------|
| | | | | Étape | Total | |
| Échantillon | 3,385 | 101,750 | 30 | 100 | 100 | 1 |
| Éluat Décaméthonium | 6.6 | 17,735 | 2687 | 17.42 | 17.42 | 89.6 |

décrocher l'enzyme pourrait s'expliquer par une fixation, en grande partie irréversible, de l'ACHé sur l'ion N-méthylacridinium⁹.

Chromatographie de la BuChE du sérum de cheval

Deux passages successifs du sérum brut sur le MA-Sépharose permettent d'obtenir une préparation purifiée plus de 2,000 fois, avec un rendement excellent (Tableau II). On remarquera que cet enrichissement est obtenu sans l'aide de contre-ligand. Des essais préliminaires ont montré que cette colonne ne fixait pas la BuChE à forte force ionique (1 M), contrairement à l'ACHé. En appliquant un gradient linéaire de 0.6 à 1.5 M NaCl dans le tampon A, l'activité enzymatique apparaît dans les fractions dès 0.65 M NaCl, le maximum d'éluat étant obtenu pour 0.85 M NaCl.

TABLEAU II

CHROMATOGRAPHIE DE LA BuChE DE SERUM DE CHEVAL SUR LE MA-SEPHAROSE

| Expériment | Protéines totales (mg) | Unités (u) | Activité spécifique (u/mg) | Rendement (%) | | Enrichissement |
|-------------------------------|------------------------------|---------------|----------------------------------|---------------|-------|----------------|
| | | | | Étape | Total | |
| Sérum (20 ml) | 21,200 | 1680 | 0.079 | 100 | 100 | 1 |
| 1er Passage sur MA-Sépharose | 40 | 1980 | 49 | 118 | 118 | 620 |
| 2ème Passage sur MA-Sépharose | 11.2 | 1920 | 172 | 97 | 115 | 2176 |

Le MA-Sépharose permet donc une bonne purification de la BuChE du sérum de cheval qui devrait être améliorée par une éluat biospécifique. La force ionique élevée utilisée dans le tampon de lavage évite le phénomène d'échange d'ions qui gêne aux forces ioniques plus faibles.

Les comportements de l'ACHé et de la BuChE sont très différentes vis-à-vis de la colonne MA-Sépharose. L'ACHé se fixe à très forte force ionique et, pour une grande part, de façon irréversible; la BuChE ne s'accroche qu'à force ionique modérée et de façon parfaitement réversible.

L'interaction entre l'ion N-méthylacridinium et les cholinestérases fait intervenir des forces coulombiennes et hydrophobes, et il semble que la participation du noyau acridinium lui-même soit essentielle¹⁰. L'irréversibilité de la fixation de l'ACHé de *Torpedo marmorata* pourrait donc s'expliquer par des interactions particulière-

ment fortes entre les zones hydrophobes de la périphérie du site catalytique et le noyau acridinium^{9,11}. Par contre, la réversibilité de l'adsorption de la fixation de la BuChE est en faveur d'une participation beaucoup plus modeste des forces hydrophobes.

CONCLUSIONS

La colonne de MA-Sépharose utilisée dans ce travail a permis une bonne purification de la BuChE du sérum de cheval. Par contre, elle se révèle parfaitement inefficace pour l'AcChE de *T. marmorata*. Ceci suggère une différence notable dans la répartition des zones hydrophobes autour du site actif de ces deux enzymes. Le schéma de synthèse proposé dans la préparation du MA-Sépharose se caractérise par la grande simplicité de la mise en oeuvre.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 G. Mooser, H. Schulman et D. S. Sigman, *Biochemistry*, 11 (1972) 1595.
- 2 H. C. Froede et I. B. Wilson, dans P. D. Boyer (Éditeur), *The Enzymes*, Vol. V, Academic Press, New York, 3me éd., 1971, p. 87.
- 3 Y. Dudai, I. Silman, M. Shinitzky et S. Blumberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 69 (1972) 2400.
- 4 Y. Dudai et I. Silman, *Methods Enzymol.*, 34 (1974) 571.
- 5 J. Picard, *C.R. Acad. Sci., Ser. D*, 282 (1976) 235.
- 6 A. Albert, *The Acridines*, Edward Arnold, London, 2me éd., 1966, p. 50.
- 7 G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres et R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.*, 7 (1961) 88.
- 8 O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr et R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 9 J. Massoulié et S. Bon, *Eur. J. Biochem.*, 68 (1976) 531.
- 10 L. M. Chan, C. M. Himel et A. R. Main, *Biochemistry*, 13 (1974) 86.
- 11 M. I. Kabachnik, A. P. Brestkin, N. N. Godovikov, M. J. Michelson, E. V. Rozengart et V. I. Rozengart, *Pharmacol. Rev.*, 22 (1970) 355.