

UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE II
FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

ETUDE DE L'INTERACTION DE LA PYRIMETHAMINE
AVEC UNE DIHYDROFOLATE REDUCTASE DE MAMMIFERE

T H E S E

Présentée et publiquement soutenue devant
la Faculté de Pharmacie de MARSEILLE

Le 24 Avril 1984

par

Moussa Issa DIARRA

Né le 5 Mai 1954

Pharmacien

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE 3E CYCLE
SPECIALITE PHARMACOLOGIE

Examineurs de la Thèse :

Mademoiselle le Professeur BRIAND

Président

Monsieur le Professeur CANO

Madame le Professeur BOURDEAUX

Monsieur le Professeur PENE

Monsieur le Professeur SARI

Monsieur le Professeur BISSET



FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

ADMINISTRATION

Doyen : J.P. CANO

Assesseurs : C. BRIAND, P. TIMON-DAVID

Attaché Principal Responsable
des Services Administratifs : C. AVENI

Professeurs Honoraires : F. MERCIER, M. MOURGUE, P. PELLISSIER

Professeurs :

Biologie Humaine	M. LANZA
Biophysique	A. CREVAT
Botanique et Cryptogamie	P. REGLI C. VENOT
Bromatologie Diététique et Analyse appliquée à l'expertise	A. GAYTE-SORBIER
Chimie Analytique	J. PASTOR A.M. PAULI
Chimie Biologique	J. REYNAUD F. LUCCIONI D. GARCON
Chimie Générale	R. BARET
Chimie Minérale, Hydrologie et Molysmologie aquatique	A. ARNOUX J. BARBE
Chimie Organique	C. GHIGLIONE J. MALDONADO
Chimie Thérapeutique, Droit et Economie de la Pharmacie	B. CRISTAU J.C. SOYFER
Matière Médicale	G. BALANSARD
Microbiologie, Hygiène microbienne et Immunologie	A. CREMIEUX G. DUMENIL
Microbiologie, Hygiène, Parasitologie et Zoologie	C. GREBUS P. TIMON-DAVID
Pharmacie Galénique	A. BOVIS J.P. REYNIER
Pharmacodynamie	J. MERCIER
Physique Pharmaceutique et Mathématiques	C. BRIAND M. BOURDEAUX
Toxicocinétique	J.P. CANO
Toxicologie générale et Biotoxicologie	A. VIALA F. GOUezo

Maîtres-Assistants :

Biologie Humaine	J.P. LANZA P. ETZENSPERGER
Biophysique	A.M. CHAUVET J. FONDARAI
Botanique et Cryptogamie	Y. BUFFARD H. FERRARI M. GOUDARD M.D. STEINMETZ
Bromatologie Diététique et Analyse Appliquée à l'Expertise	C. AIRAUDO
Chimie Analytique	C. ARFI M. BORDONNEAU B. DUMOULIN J. KALOUSTIAN H. PORTUGAL E. RENACCO
Chimie Biologique	A. BARLATIER M. CASTAY B. LAURENT
Chimie Générale	C. GIRARD J.M. MIANE
Chimie Minérale, Hydrologie et Molysmologie Aquatique	A. BLANC J. TATOSSIAN
Chimie Organique	M. GIRAUD A. TUBUL
Chimie Thérapeutique, Droit et Economie de la Pharmacie	G. GIOVANNANGELI M. PLACIDI J.P. REBOUL
Microbiologie, Hygiène Microbienne et Immunologie	H. GUIRAUD
Microbiologie, Hygiène, Parasitologie et Zoologie	A. ANDRAC A. CUGNARDEY M.J. JULIEN
Matière Médicale	M. LALLEMAND D. LEMORDANT
Pharmacodynamie	S. DESSAIGNE A.M. SCOTTO DI TELLA
Physique Pharmaceutique et Mathématiques	M. SARRAZIN
Toxicocinétique et Pharmacocinétique	J. CATALIN
Toxicologie Générale et Biotoxicologie	A. DURAND

L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses.

Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

A TOUTE MA FAMILLE.

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Mademoiselle le Professeur C. BRIAND

Vous avez bien voulu nous faire l'honneur d'être le Président du Jury de cette thèse.

Aucun mot ne saurait exprimer notre reconnaissance pour tout l'intérêt que vous avez bien voulu nous manifester.

Par la constance de vos conseils, par la bienveillance de vos encouragements, vous nous avez toujours permis de mener à bien la réalisation de cette thèse.

Trouvez dans ce travail, où vous nous avez guidé avec bienveillance, l'expression de notre déférente gratitude et de notre profonde reconnaissance.

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur J.P. CANO

*Nous vous remercions pour le grand honneur d'accepter de faire partie de notre jury de thèse malgré vos nombreuses obligations.
Veuillez bien trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.*

A Madame le Professeur BOURDEAUX

*Votre présence dans notre jury est un grand honneur
mais aussi une grande joie.*

*Vous avez suivi notre travail depuis le début.
Vous nous avez consacré, avec beaucoup de patience
et de bienveillance, un temps toujours précieux.
Vous nous avez grandement aidé à mener à bien
cette thèse.*

*Qu'il nous soit donné ici de vous remercier et
de vous assurer de notre gratitude.*

A Monsieur le Professeur PENE

*Nous n'oublierons jamais votre accueil chaleureux
et la bienveillance que vous nous avez toujours
manifestée.*

*Veillez croire à notre profonde reconnaissance
et à notre respectueuse gratitude.*

A Monsieur le Professeur J.C. SARI

Vos connaissances, votre importante collaboration dans la réalisation de cette thèse, l'amabilité et la sympathie que vous nous avez toujours témoignées nous ont été précieuses.

Nous vous remercions d'avoir bien voulu faire partie de notre jury de thèse ; nous vous assurons de notre reconnaissance.

A Monsieur le Professeur BISSET

*Nous le remercions de l'accueil amical et spontané
qu'il nous a réservé.
Nous tenons à lui exprimer notre gratitude et
notre dévouement.*

A TOUS CEUX dont la collaboration nous a permis de mener à bien cette thèse, et tout particulièrement :

A Robert GILLI et Michèle CHAUVET

Pour leur aide permanente tant sur le plan pratique que théorique.

Vous n'avez pas épargné votre temps pour relire en détail notre manuscrit, y apportant les retouches nécessaires.

Nous vous prions de trouver ici nos plus sincères remerciements et notre très profonde reconnaissance.

A Marcel SARRAZIN

Pour sa contribution informatique.

A Henri BOUTEILLE

Pour sa participation iconographique et son assistance technique.

A TOUS LES MEMBRES DES LABORATOIRES DE PHYSIQUE
PHARMACEUTIQUE ET DE BIOPHYSIQUE

Qui m'ont facilité la tâche dans l'élaboration de ce travail.

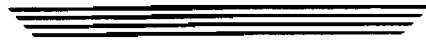
Ce travail a été réalisé grâce à un don de la Recherche Médicale.

Nous remercions le Laboratoire Specia qui nous a fourni gracieusement la Pyriméthamine et le Méthotrexate.

NOTATIONS

n	Nombre de sites
P_T	Concentration en protéine
Lx	Concentration en médicament
SL	Concentration en sites complexés
PYR	Pyriméthamine
MTX	Methotrexate
DHF	Acide dihydrofolique
K_m	Constante de Michaelis
K_i	Constante d'inhibition
R.M.N.	Résonance Magnétique Nucléaire
DHFR	Dihydrofolate Réductase

INTRODUCTION



Les variations de sensibilité des plasmodiums aux antipaludiques sont connues depuis le début du XXe siècle, mais ce n'est que depuis une date relativement récente que le problème de la résistance du "Plasmodium falciparum", le plus dangereux d'entre eux, a pris une telle acuité qu'il menace de réduire à néant dans de nombreux pays l'espoir d'endiguer efficacement la maladie.

En effet, dans certaines "places fortes" 90 % des cas de paludisme à Falciparum se sont révélés réfractaires au traitement radical par la chloroquine et sans cesse plus nombreux sont les malades sur lesquels ce médicament n'exerce aucun effet même passager.

La résistance à la Chloroquine décelée et confirmée presque simultanément en Amérique du Sud et en Asie, il y a une vingtaine d'années s'est largement répandue sur ces continents et a maintenant gagné l'Afrique (75). Dans les années 1950, on pensait qu'avec la synthèse de certains produits tels que la Chloroquine et la Primaquine, le problème de la chimiothérapie du paludisme était résolu. L'éradication du paludisme semblait possible grâce à ces médicaments et aux insecticides tels le DDT. Vingt années plus tard, on constate que la situation n'a pas changé dans bien des régions (59).

L'appauvrissement de l'arsenal prophylactique et thérapeutique exige qu'on utilise de toute urgence des antipaludiques de remplacement. A cet effet, la pyriméthamine et les associations pyriméthamine-sulfadoxine constituent la deuxième ligne de défense contre le paludisme (75).

Notons que c'est en 1943 que la pyriméthamine a été employée pour la première fois contre le paludisme.

Le schéma suivant résume l'action des antipaludiques en relation avec le cycle du parasite (Fig. 1). Sur ce schéma, il apparaît que la Pyriméthamine est un schizonticide. C'est un antimétabolite qui inhibe la dihydrofolate réductase (DHFR), enzyme intervenant dans la biosynthèse des bases puriques chez les hématozoaires ; on peut cependant se demander si elle n'exerce pas une action toxique chez l'hôte (54), notamment en inhibant la dihydrofolate reductase de ce dernier. Cette inhibition se traduit par une réaction équilibrée obéissant à la loi d'action de masse entre la PYR et la DHFR, caractérisée par une constante d'affinité K_a et un nombre de sites de liaison n de la protéine.

Actuellement, seules des mesures directes des paramètres de liaison de la PYR à l'aide de méthodes physico-chimiques ont été réalisées sur les DHFR de bactéries. Il s'avérait donc logique de travailler sur la DHFR d'un mammifère (boeuf par exemple) plus proche de l'homme et surtout de certaines lignées cellulaires tumorales (L 1210) (51, 74). Les seules mesures effectuées en fait sur des enzymes de mammifères ont été des mesures d'inhibition enzymatique .

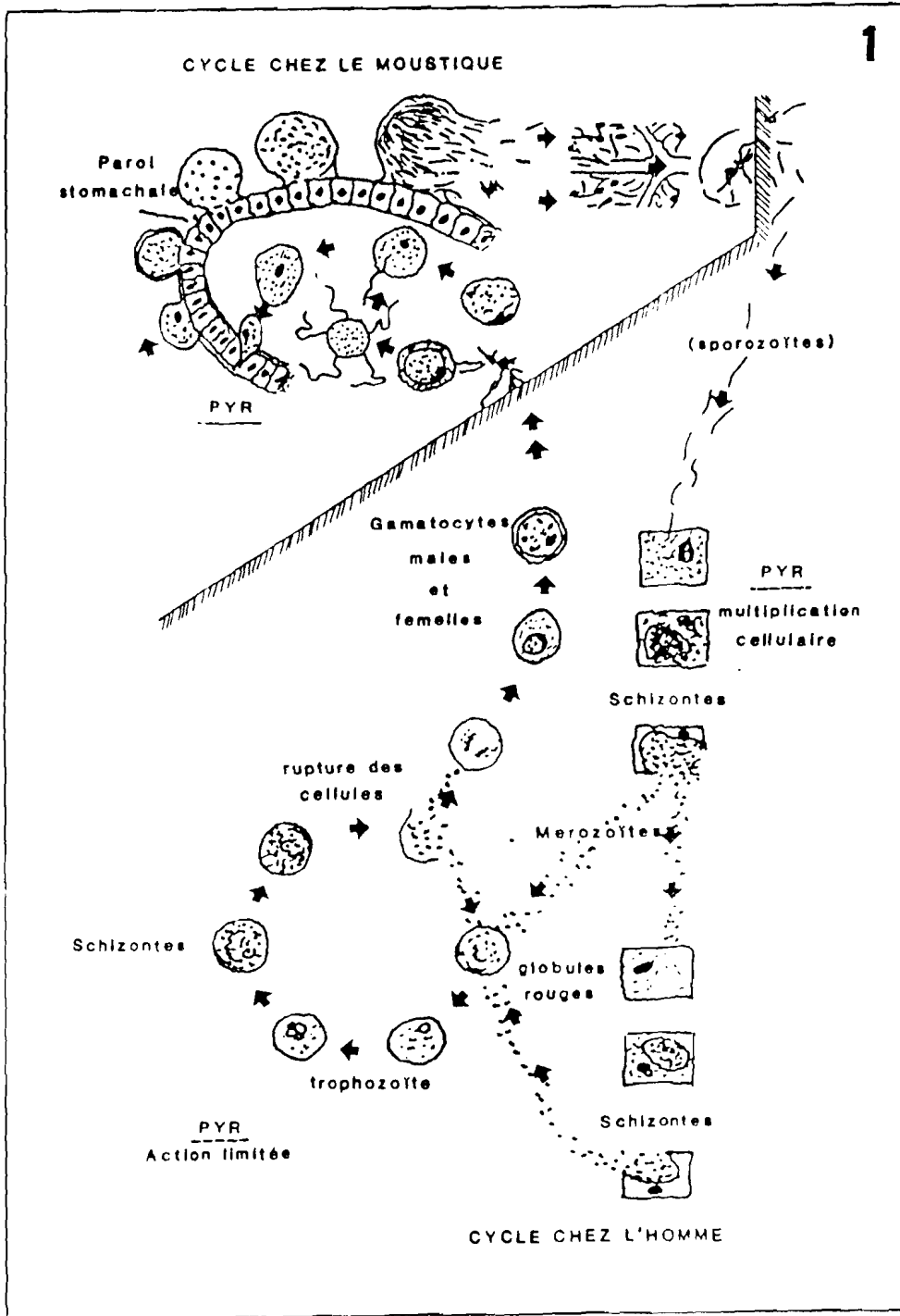
Vous nous sommes donc intéressé à la "Détermination par fluorescence et microcalorimétrie des paramètres d'interaction de la Pyriméthamine avec la DHFR de foie de boeuf".

Dans le chapitre I, nous traiterons essentiellement de la Pyriméthamine, notamment de ces propriétés chimiques et de sa pharmacocinétique.


Dans le chapitre II, nous présenterons la Dihydrofolate réductase.

Nous rappellerons, dans le chapitre III, les travaux antérieurs portant sur les liaisons des DHFR bactériens avec la Pyriméthamine.

Le chapitre IV concernera nos travaux personnels, c'est-à-dire les protocoles expérimentaux et les méthodes d'exploitation utilisées, ainsi que les résultats et discussions.



MODE D'ACTION DE LA PYRIMETHAMINE
EN RELATION AVEC LE CYCLE DU PARASITE

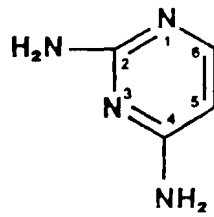


LA PYRIMETHAMINE

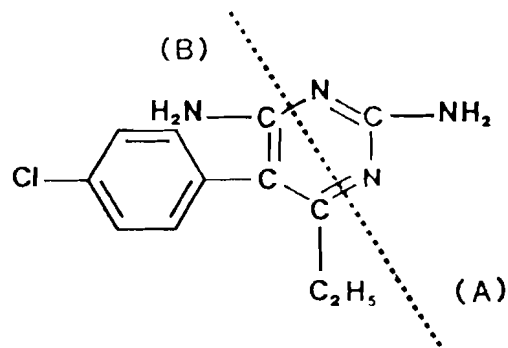
I. STRUCTURE CHIMIQUE

La Pyriméthamine est commercialisée sous les noms Doraprimé, Malocide et Pyrixine. C'est la 2-4 p chlorophenyl 5 éthyl-6 pyrimidine (Fig. 2).

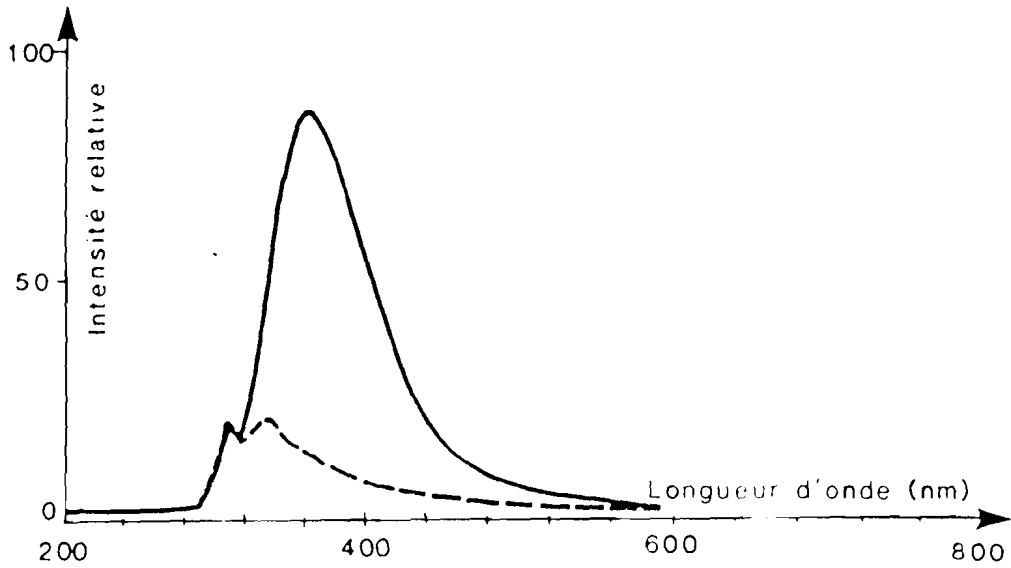
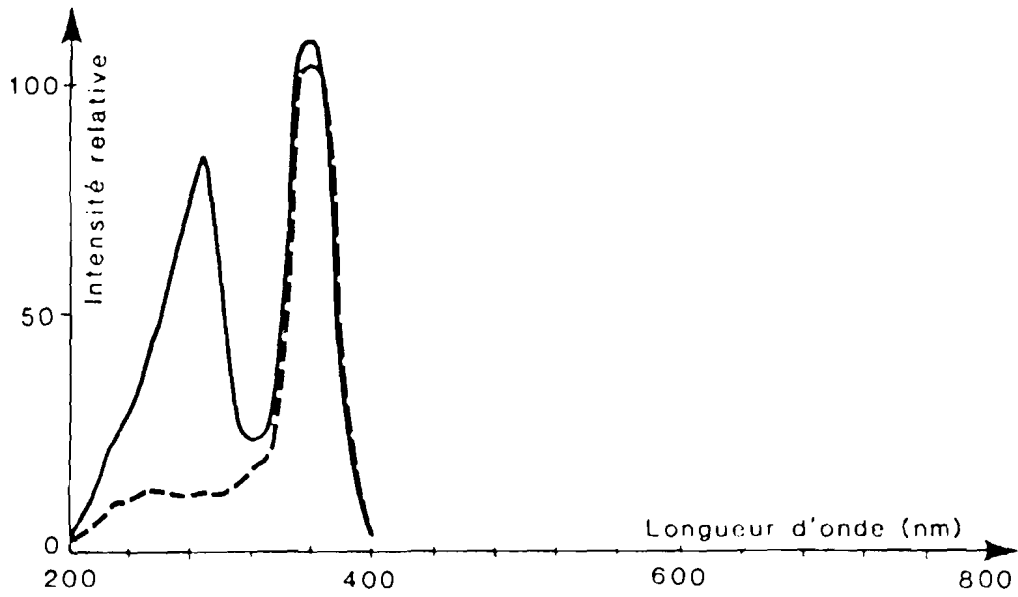
L'examen de sa formule met en évidence un fragment (A) guanidique que l'on fait réagir au cours de la synthèse de ce médicament sur un acide β cétonique conformément au mode classique de préparation des pyrimidines possédant cette structure. L'ester β cétonique devra introduire le fragment (B). Cet ester cétonique s'obtient par condensation du nitril p-chlorophenylacétique et du propionate d'éthyl. On accède ainsi à une amino-hydroxypyrimidine dont, après protection du NH_2 déjà existant par acétylation, l'hydroxyle est remplacé successivement par le Cl (par POCl_3) puis par NH_2 à l'aide d'ammoniaque.



Diamino 2-4 pyrimidine



La Pyriméthamine



SPECTRES DE LA FLUORESCENCE DE LA PYRIMETHAMINE

TABLEAU I

	pKa	Log P
Pyriméthamine	7,34	2,69
Methotrexate	4,7	- 1,85
D.D.M.P.	7,15	2,82
D.D.E.P.	7,20	3,19

Propriétés physiques de quelques 2-4 diaminopyrimidines
inhibiteurs de la dihydrofolate-réductase

D.D.M.P. = 2,4 diamino-5 (3,4 dichlorophenyl) 6-méthyl pyrimidine

D.D.E.P. = 2,4 diamino-5 (3,4 dichlorophenyl) 6-ethyl pyrimidine

III. MECANISME D'ACTION

La Pyriméthamine est un antifolique. Le mode d'action des antifoliques, en général, n'a été élucidé qu'avec l'identification et la purification de la DHFR (53).

La DHFR est l'enzyme responsable de la réduction de l'acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique, plaque tournante du métabolisme des folates. Le tableau n° 2 représente le métabolisme des folates naturels.

Il faut signaler qu'au niveau du plasma les folates, sont sous forme libre et sous forme de monoglutamate. Une petite fraction est liée à une protéine de haute masse molaire : le cytosyl (Cytosil I, II, III).

En effet, l'acide folique n'est jamais directement impliqué dans le métabolisme intermédiaire. Il doit être transformé en dérivé biochimiquement et physiologiquement actif c'est-à-dire subir deux réductions successives en acide dihydrofolique, tout d'abord par hydrogénation en 5-6, réaction catalysée par l'acide folique réductase, puis en acide tétrahydrofolique, seconde étape catalysée par la dihydrofolate réductase. C'est l'acide tétrahydrofolique qui représente le composé actif (tableau 3). Il a la propriété de fixer différents groupements chimiques sur ses azotes en position cinq ou six :

- Fonction formimino $\text{CH} = \text{NH}$,
- Fonction formyle - CHO ,
- Fonction méthényle = CH ,
- Fonction méthylène = CH_2 ,
- Fonction méthyle - CH_3 .

Ce qui donne naissance à plusieurs types de coenzymes foliques :

- N_5 formimino THF,
- N_{10} formyl THF,
- $\text{N}_5 \text{N}_{10}$ méthylène THF,
- N_5 méthyl THF.

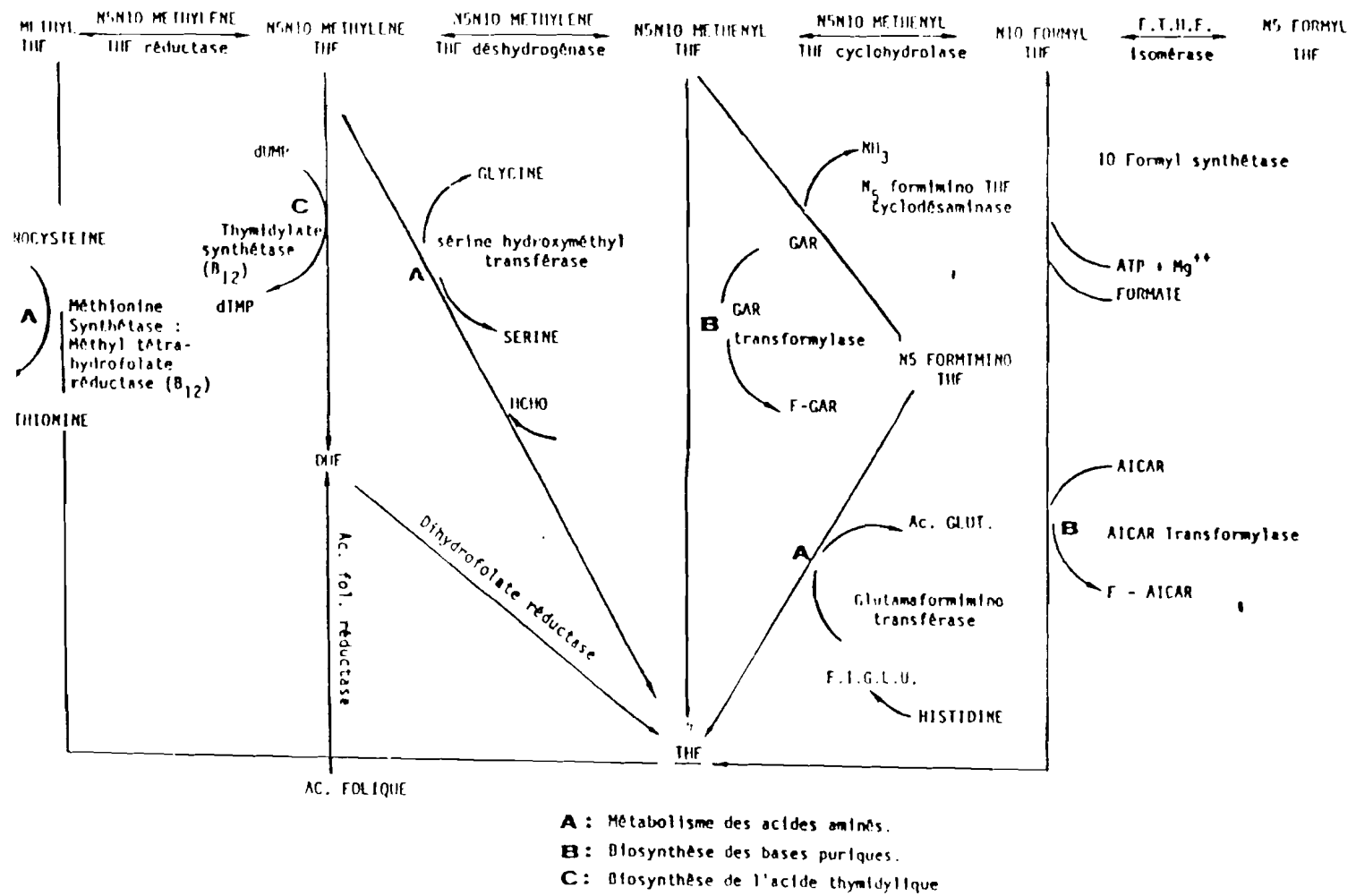
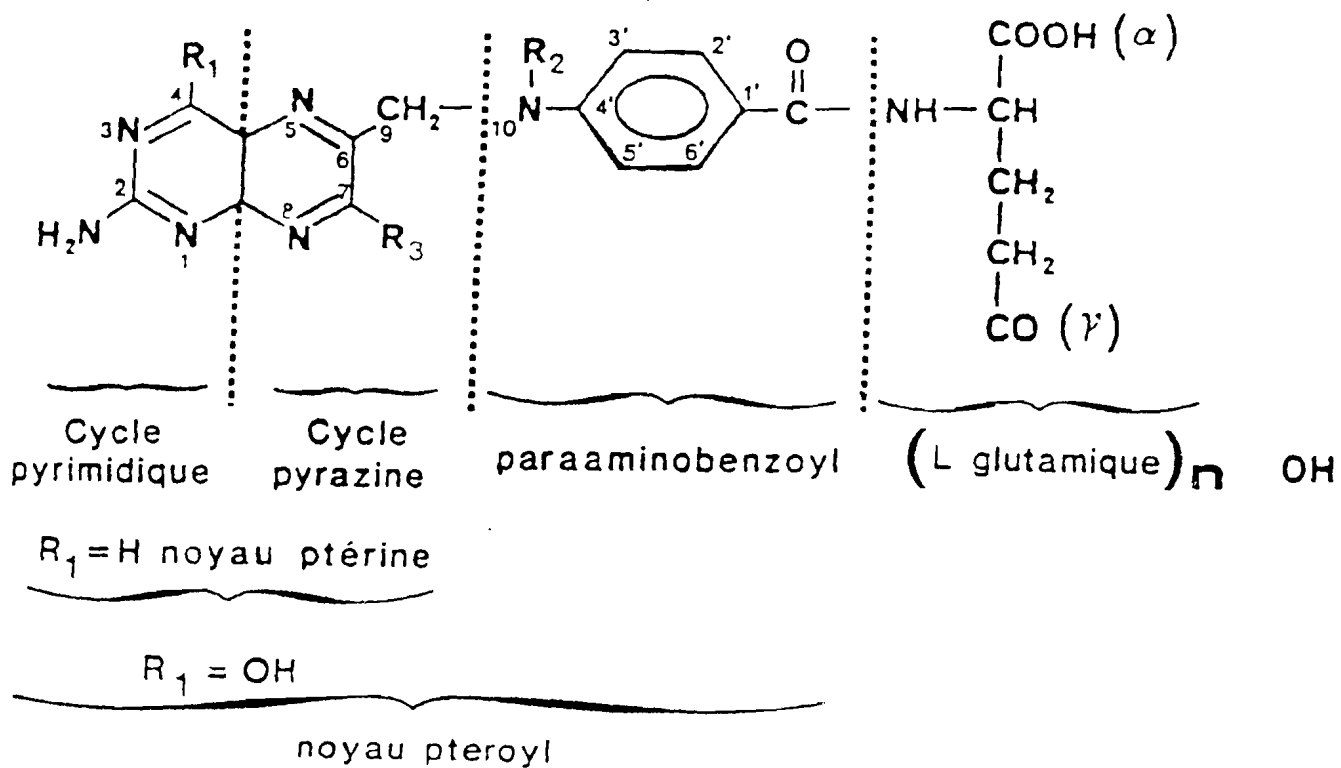


TABLEAU N° 2 - METABOLISME DES FOLATES NATURELS



Double liaison	Double liaison	R_1	R_2	R_3	n	
5-6	7-8	OH	H	H	1	Acide folique
Non	Oui	OH	H	H	1	Acide dihydrofolique
Non	Non	OH	H	H	1	Acide tétrahydrofolique

TABLEAU 3

Structure des folates et de leurs dérivés

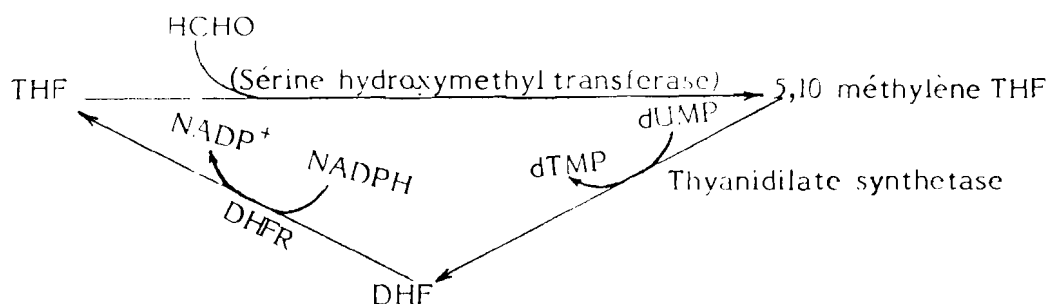
Ces formes sont interconvertibles, leur origine et leurs interrelations sont figurées sur le tableau 4.

La forme prédominante est représentée par l'acide N₅ éthyl tétrahydrofolique aussi bien au niveau du foie que dans les différents tissus et dans le plasma.

Suivant les groupements chimiques substitués chacune des coenzymes formées joue un rôle différent. Plusieurs voies métaboliques importantes nécessitent leur intervention :

- le métabolisme et l'interconversion de certains acides aminés,
- la biosynthèse des bases puriques et celles des bases pyrimidiques: processus vitaux puisque conduisant aux précurseurs immédiats de l'ARN et de l'ADN,
- la biosynthèse de l'acide thymidilique.

Ces réactions confirment le rôle joué par l'acide folique dans le transport des radicaux à un atome de carbone qui proviennent essentiellement de la dégradation de l'histidine et de la sérine et qui sont utilisés pour la synthèse de la méthionine, des purines et des pyrimidines. La transformation catalysée par la DHFR en présence de NADPH, du DHF en THF (fig. 4) intervient donc soit pour les folates apportés par l'alimentation soit pour ceux fournis par la synthèse de dTMP, tous les autres processus biochimiques dont nous avons parlé conduisant au THF.



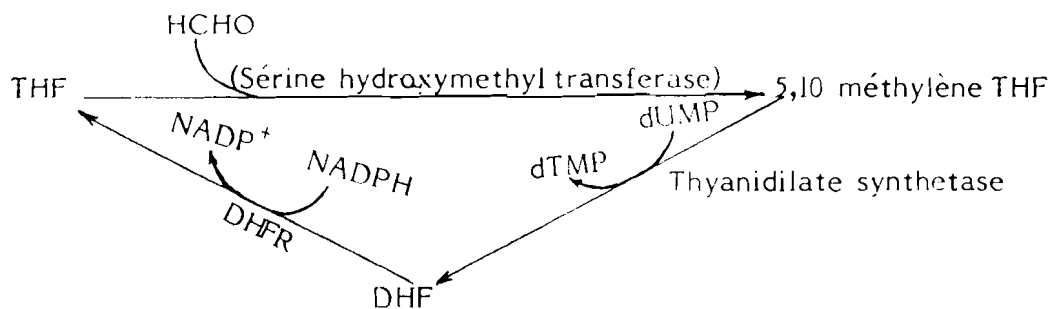
Ces formes sont interconvertibles, leur origine et leurs interrelations sont figurées sur le tableau 4.

La forme prédominante est représentée par l'acide N₅ éthyl tétrahydrofolique aussi bien au niveau du foie que dans les différents tissus et dans le plasma.

Suivant les groupements chimiques substitués chacune des coenzymes formées joue un rôle différent. Plusieurs voies métaboliques importantes nécessitent leur intervention :

- le métabolisme et l'interconversion de certains acides aminés,
- la biosynthèse des bases puriques et celles des bases pyrimidiques: processus vitaux puisque conduisant aux précurseurs immédiats de l'ARN et de l'ADN,
- la biosynthèse de l'acide thymidilique.

Ces réactions confirment le rôle joué par l'acide folique dans le transport des radicaux à un atome de carbone qui proviennent essentiellement de la dégradation de l'histidine et de la sérine et qui sont utilisés pour la synthèse de la méthionine, des purines et des pyrimidines. La transformation catalysée par la DHFR en présence de NADPH, du DHF en THF (fig. 4) intervient donc soit pour les folates apportés par l'alimentation soit pour ceux fournis par la synthèse de dTMP, tous les autres processus biochimiques dont nous avons parlé conduisant au THF.



SUBSTITUTION	COENZYME	FONCTIONS
CH ₃ en 5	5 Méthyl THF	Synthèse Méthionine
CH en 5 en 10	N ₅ Formyl THF (ac.folinique) N ₁₀ Formyl THF	Synthèse Purines
CH ₂ entre 5 et 10	N ₅ N ₁₀ Méthylène THF	Biosynthèse Thymidylate Interconversion Glycine-sérine
CH = NH en 5	N ₅ Formimino THF	Catabolisme Histidine
CH entre 5 et 10	N ₅ N ₁₀ Méthonyl THF	Biosynthèse Purines

TABLEAU N° 4

Coenzymes foliques

Ainsi un blocage de cette réaction entraînera une diminution du DHF et un blocage équivalent de tous les métabolismes dont nous avons parlé, en particulier des processus d'importance primordiale dans la prolifération cellulaire tels que la biosynthèse de l'acide thymidilique nucléotide spécifique de l'ADN et la biosynthèse de l'acide inosinique, précurseur des bases puriques nécessaires à la fois aux synthèses d'ADN et d'ARN.

Contrairement à l'homme, le plasmodium qui est un microorganisme peut synthétiser l'acide folique à partir des précurseurs de la ptéridine(21).

Le métabolisme des folates chez le plasmodium (fig. 4, 5) reste pratiquement identique à celui de l'homme.

Chez le plasmodium la Pyriméthamine inhibe la DHFR. L'activité de cette enzyme augmente durant le cycle intraérythrocytaire, juste avant la première division cellulaire.

Cette enzyme a une masse moléculaire comprise entre 100.000 et 200.000 daltons (déterminé par filtration sur gel). Cette masse moléculaire est cinq à dix fois plus grande que celles d'enzymes d'autre source (par exemple la DHFR de foie de boeuf a une masse moléculaire de 22500 daltons).

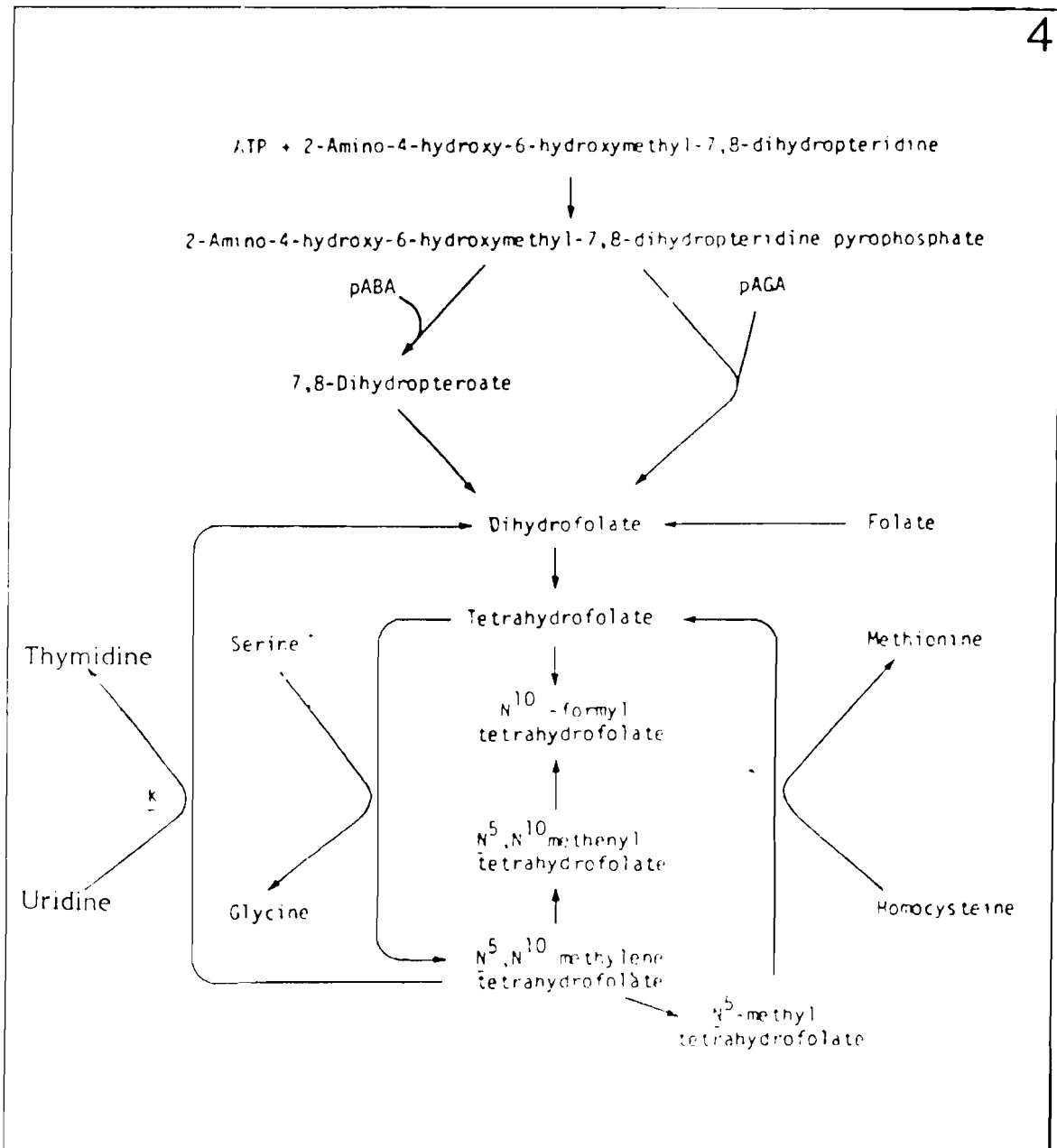
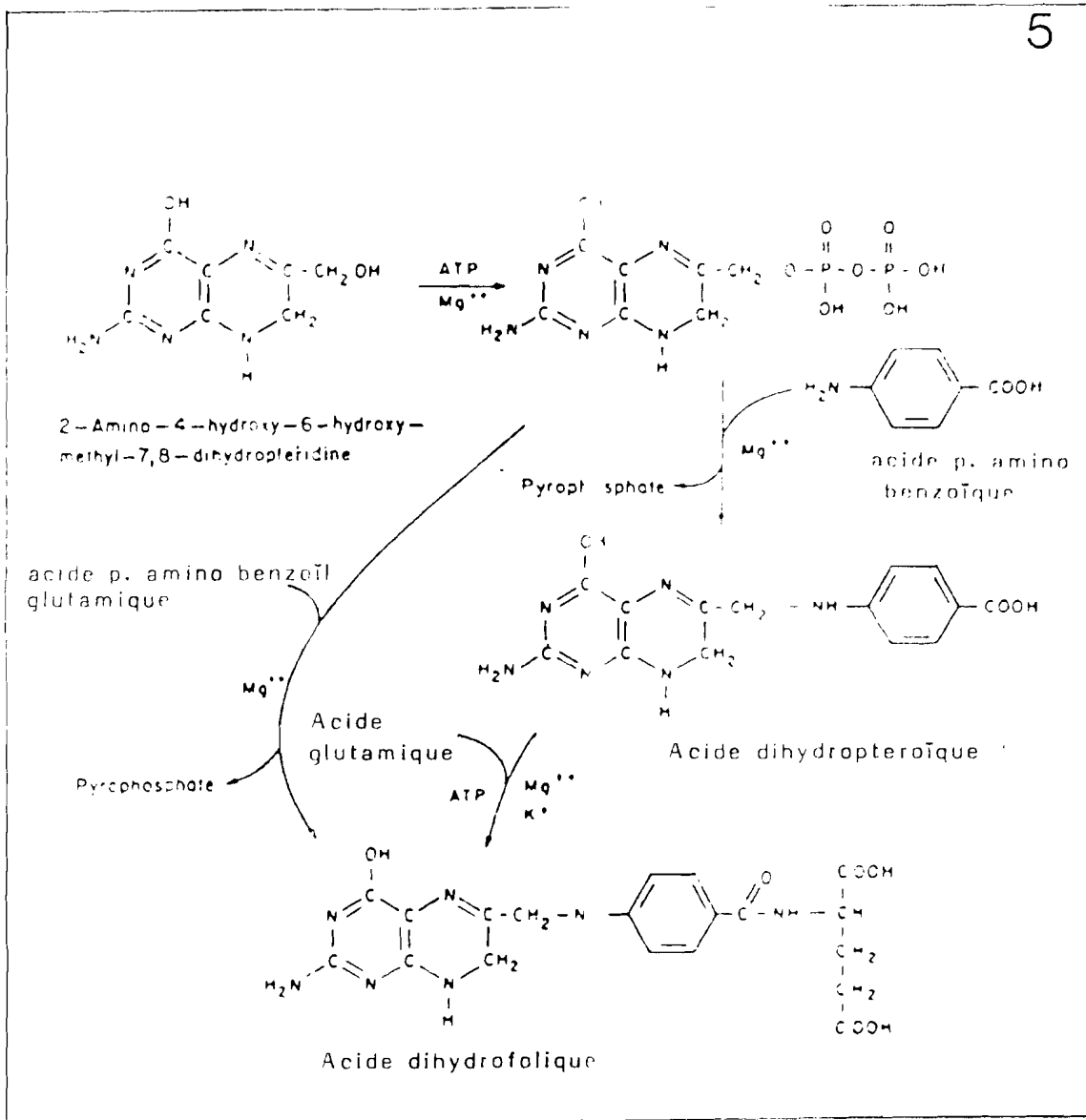


FIGURE 4

Métabolisme des folates chez le plasmodium

5



REACTIONS ENZYMATIQUES CONDUISANT A LA BIOSYNTHESE DE L'ACIDE DIHYDROFOLIQUE CHEZ LE PLASMODIUM

IV. LA TOXICITE DE LA PYRIMETHAMINE

Plusieurs auteurs font état de la toxicité de la Pyriméthamine qui se manifeste essentiellement au niveau sanguin. Les mécanismes qui entraînent cette toxicité chez l'homme ne sont pas clairement établis (54).

Ces mêmes auteurs (47, 54, 71, 76) rapportent des thrombocytopénies, des anémies mégaloblastiques macrocytaires et normochromes. Ils signalent aussi des leucopénies et des neutropénies.

V. MEDICAMENTS ASSOCIES

Certains médicaments tels les sulfonamides associés à la Pyriméthamine peuvent augmenter son action antipaludique.

Il en est de même pour l'association Pyriméthamine-Sulfadoxine (FANSIDAR) (22, 75). Ce médicament est contre-indiqué chez les femmes enceintes.

VI. MODE D'ADMINISTRATION, POSOLOGIE, INDICATIONS

La Pyriméthamine a une activité schizonticide particulièrement marquée à l'égard du *Plasmodium falciparum*. Elle est utilisée en traitement curatif des accès paludéens (0,16 g en une ou deux prises à 12 heures d'intervalle) et dans un but de prophylaxie collective : 0,05 g une fois par semaine.

Signalons que la Pyriméthamine peut être prescrite dans le traitement de la toxoplasmose.

VII. PHARMACOCINETIQUE

Chez la souris, le rat, le chien, la concentration plasmatique maximale est atteinte au bout de quatre heures après administration d'une dose unique de 2,8 mg/kg et la durée de vie plasmatique $t_{1/2} = 23$ h. La distribution tissulaire s'effectue au niveau du cerveau, des poumons et du pancréas (19). Le taux de fixation aux protéines plasmatiques déterminé par dialyse à l'équilibre s'avère être de 78 %. 1 à 2 % du médicament sont excrétés sous forme inchangée pendant les premières 24 heures.

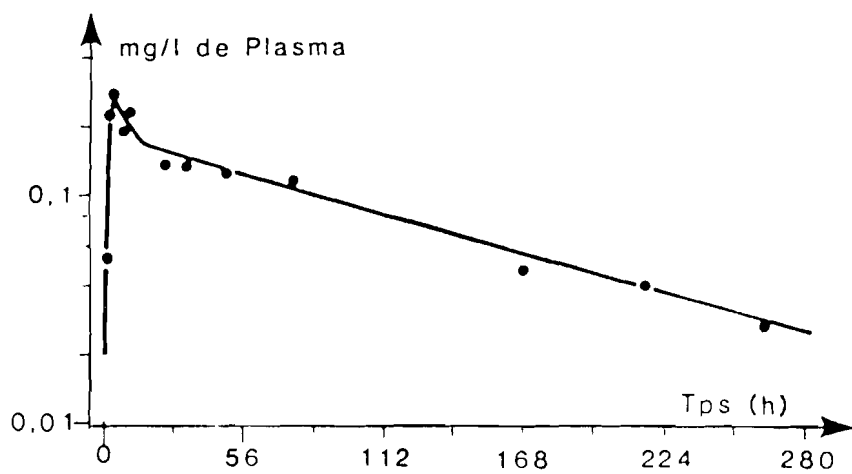
Chez le porc un modèle ouvert à trois compartiments rend compte de la pharmacocinétique; la clairance plasmatique est de 0,682l/h/kg et le volume total de distribution de 12,1 litre (65).

Chez l'homme, la Pyriméthamine est presque entièrement absorbée au niveau du tractus gastrointestinal.

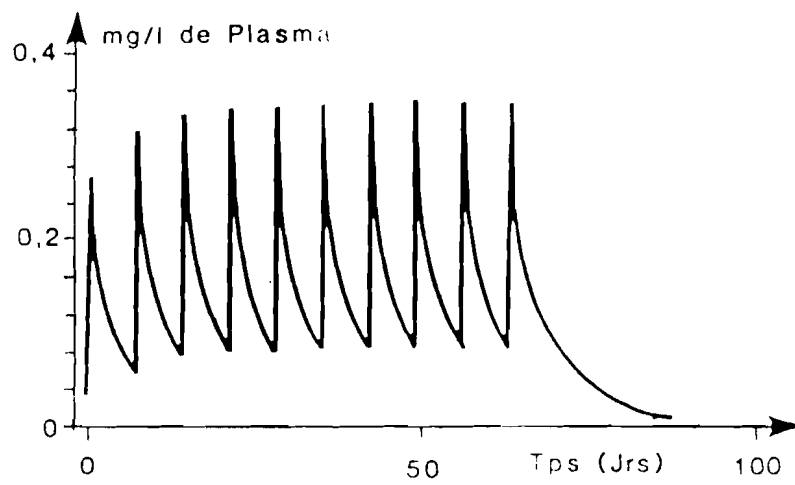
Plusieurs études pharmacocinétiques de la Pyriméthamine ont été réalisées (26, 60, 66, 72, 77).

E. WEIDEKMAN et al. (77) déterminent les concentrations plasmatiques de la Pyriméthamine. Après administration d'une dose unique de 25 mg par voie orale, la concentration maximale est atteinte en 4,2 heures ; les variations individuelles des demi-vie plasmatiques oscillent de 46 à 150 h, résultats en bon accord avec ceux publiés par CAVALLITO (19). Les profils de concentration obtenus ont été le mieux décrits par une cinétique à deux compartiments non linéaires. La période d'élimination finale moyenne calculée à partir de ces coordonnées est de $95,5 \text{ h} \pm 30,6 \text{ h}$ (, figures 6 et 7).

Il se révèle par d'autres études pharmacocinétiques (2, 3) que la Pyriméthamine se lie aux protéines plasmatiques à 87 %.



CONCENTRATION PLASMATIQUE DE LA PYRIMETHAMINE APRES
ADMINISTRATION D'UN COMPRIME DE FANSIDAR
(25 mg de Pyriméthamine et 500 mg de Sulfadoxine)



SIMULATION PAR ORDINATEUR DE LA CONCENTRATION PLASMATIQUE
DE LA PYRIMETHAMINE APRES ADMINISTRATION
D'UN COMPRIME DE FANSIDAR PAR SEMAINE

PENETRATION DANS LA CELLULE

La Pyriméthamine pénètre facilement à l'intérieur des cellules par simple diffusion (79, 80) à l'inverse d'autres inhibiteurs de la DHFR comme le MTX ; de même qu'elle passe à travers la membrane des cellules, la Pyriméthamine passe à travers la membrane du plasmodium.

Il a été mis en évidence une relation structure activité pour l'absorption du produit (21).

METABOLISME

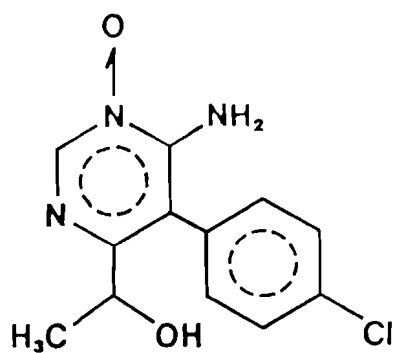
Des études de biotransformation ont été effectuées chez le rat. Il apparaît que la biotransformation se fait principalement par une N oxydation en position 3' du noyau pyrimidine et une hydroxylation en position α du groupe 6 ethyl. Les métabolites ont été isolés à partir d'urine de rat. Au bout de sept jours 83 % (79 % dans les premières heures) de la dose administrée sont excrétés dans l'urine et 14 % dans les fèces: la Pyriméthamine est donc fortement métabolisée.

L'analyse de l'urine par chromatographie en couche mince bidimensionnelle et autoradiographie a révélé l'existence de seize métabolites avec un métabolite majeur (Fig. 8), constituant à lui seul 34 % de la dose administrée après 72 heures. Le traitement des urines par la β glucuronidase a permis de mettre en évidence six composés gluco-conjugués (i, 36, 39).

DOSAGE DE LA PYRIMETHAMINE

Nous pouvons noter que les méthodes analytiques de dosage plasmatique de la Pyriméthamine sont très variées ; mais l'originalité de la méthode microbiologique utilisée par WEIDEKMAN mérite d'être soulignée (77).

8



METABOLITE MAJEUR DE LA PYRIMETHAMINE CHEZ LE RAT



**LES DIHYDROFOLATE
REDUCTASES**



Un effort considérable de recherche a été consacré à l'étude de la DHFR (5, 6, 7, 8 tétrahydrofolate : NADP⁺ oxydoréductase) (E.C. 1.5.1.3.) en particulier dans l'espoir de mettre en évidence des particularités de la liaison d'antifolates à cette enzyme.

L'importance de ces travaux peut s'expliquer pour deux raisons :

- La DHFR représente la cible moléculaire de composés appelés antifoliques. Ce sont :

- . des agents anticancéreux à noyau ptéridine (Méthotrexate),
- . des agents antibactériens (thriméthoprime),
- . des agents antipaludéens (Pyriméthamine),
dont l'activité pharmacologique est différente.

- La taille réduite de cette macromolécule permet d'utiliser, dans les conditions optimales, de nombreuses techniques beaucoup plus difficiles à employer pour élucider la structure de protéines plus volumineuses.

Nous envisagerons, dans un premier paragraphe, la distribution de cette enzyme dans l'organisme puis dans la cellule.

Nous décrirons ensuite très rapidement les principes généraux de purification de la DHFR d'origine bactérienne ou de vertébrés et les propriétés physico-chimiques de ces molécules.

Nous traiterons enfin de la structure et de l'activité enzymatique.

DISTRIBUTION DE L'ENZYME

La distribution de la DHFR dans les tissus a été relativement peu étudiée et les publications sont à ce sujet, en général, très anciennes. Ces études ont été le plus souvent effectuées par dosage d'activités enzymatiques.

Plusieurs auteurs (10, 55, 61) ont étudié les tissus normaux de différents animaux. Presque tous les tissus testés contenaient au moins des taux détectables d'enzyme ; cependant des différences existent suivant les animaux considérés. Une forte concentration est toujours mise en évidence dans le foie, les reins, le thymus ; mais par contre, le taux est faible dans les muqueuses intestinales, le coeur, le cerveau et la rate pour atteindre une valeur pratiquement nulle dans les muscles et les poumons. Chez un malade atteint de leucémie myéloïde aiguë, le foie contient de la DHFR en quantité appréciable (61).

TOMATO et GRIGNANIF (32, 73) détectent l'enzyme dans le foie, les reins, la muqueuse gastrique, dans quelques échantillons de peau normale, dans l'épiderme des malades atteints de psoriasis et dans la moelle osseuse stimulée.

La synthèse de la DHFR est modulée en fonction du cycle cellulaire (17, 49, 78).

En ce qui concerne la distribution intracellulaire de l'enzyme, BROWN et al. (18), WONG et al. (81) mettent en évidence la DHFR dans la fraction cytoplasme plus les microsomes alors que les traces seulement sont détectables au niveau des noyaux. Le noyau doit contenir des quantités significatives de DHFR indispensables pour la régénération de THF à partir de DHF formé lors de la synthèse de la thymidilate qui a lieu dans le noyau.

Il a été récemment mis en évidence deux formes de DHFR : l'une d'origine cytoplasmique, l'autre d'origine mitochondriale (82). La première présente une activité spécifique plus élevée, mais existe en plus faible quantité que la seconde. Les deux formes se distinguent également par leur sensibilité à différents pH et à la présence de divers ions.

Au niveau des bactéries (4, 55), ainsi qu'au niveau des cellules de mammifères (33, 48), des isoenzymes ont été décrites.

KAN S.C. et SIDDIQUI (42), quant à eux, ont partiellement purifié et caractérisé la DHFR issue de *Plasmodium falciparum* qui présente une grande ressemblance avec les DHFR d'autres espèces de *Plasmodium*.

PURIFICATION DE L'ENZYME

Les premières méthodes de purifications de l'enzyme préconisaient en général un traitement au sulfate de protamine, une précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium, une chromatographie d'exclusion sur G 75, suivie d'une chromatographie sur hydroxylapatite, carboxyméthyle cellulose et DEAE (45, 46).

C'est la DHFR de foie de poulet qui a été la première enzyme de ce type partiellement purifiée et étudiée (30). On pouvait la séparer des autres protéines par filtration sur gel sephadex G 75 ou G 100. Cette molécule a une masse moléculaire comprise entre 21000 et 24000 daltons. Ces procédés conventionnels de purification de protéine présentaient de faibles rendements ; aussi la possibilité d'employer une méthode basée sur une interaction importante et spécifique enzyme-composé lié de façon covalente sur un support inerte, pour séparer la protéine désirée des autres protéines, permit-elle de faciliter grandement les préparations. La chromatographie d'affinité mise au point en 1953 allait trouver un long champ d'application pour la préparation de DHFR d'origines diverses.

L'abondance de publications concernant la purification de la DHFR utilisant la chromatographie d'affinité prouve l'intérêt de cette méthode (5, 6, 25, 31) qu'elle s'effectue à partir de souches bactériennes le plus souvent MEX résistantes, à partir de cultures cellulaires ou encore de tissus d'animaux.

PROPRIETES DE L'ENZYME

Quelle que soit l'origine de la DHFR, sa masse moléculaire se situe entre 15000 et 25000 daltons. Il faut souligner que la DHFR de plasmodium n'a été que partiellement purifiée par S.C. KAN et SIDDIQUI (42) ; ceci pourrait expliquer la valeur très élevée de sa masse moléculaire.

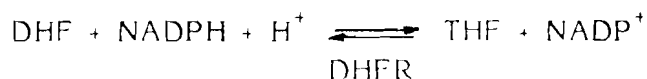
Au niveau de la structure primaire il existe toujours une grande analogie. Il est cependant classique de faire la distinction entre enzymes bactériennes et enzymes d'origines de mammifères. De plus l'analogie est vraiment remarquable entre la DHFR de foie de boeuf et celle de souches L 1210 issues de l'homme.

Il nous a donc semblé logique d'extraire l'enzyme de foie de boeuf, compte tenu de la facilité de se procurer cet organe, et nous ne nous intéresserons pour notre part qu'à cette macromolécule.

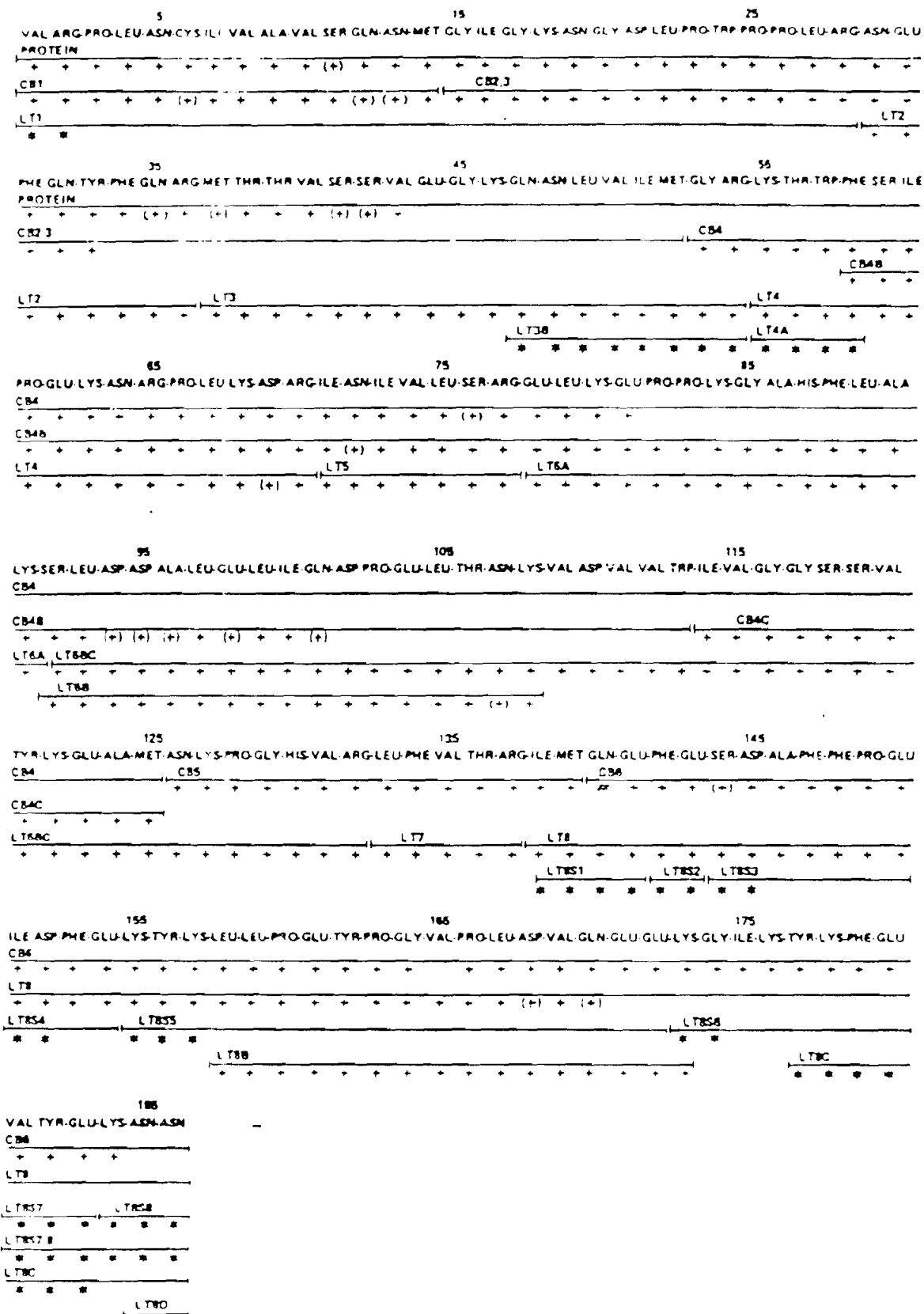
La séquence (fig. 9) comprend cent quatre vingt six résidus d'acides aminés. La masse moléculaire déterminée par sédimentation est de 22500 daltons ; le coefficient d'extinction moléculaire de $27280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Le tableau n° 5 représente les paramètres physiques, caractéristiques de l'enzyme de foie de boeuf.

ACTIVITE ENZYMATIQUE

La réaction enzymatique peut se schématiser comme suit :



Le mécanisme de réduction qui intervient dans la réaction biochimique généralement proposée dans la littérature est historiquement due à HUENNECKENS et SCRIMGEOUR (37).



SEQUENCE DE LA DHFR DE FOIE DE BOEUF

PARAMETRES PHYSIQUES DE LA DHFR DE FOIE DE BOEUF

Poids moléculaire	22500 daltons
Coefficient de sédimentation S°_{20}	$2,08 \cdot 10^{-13}$ s
Coefficient de diffusion D°_{20}	$10,93 \cdot 10^{-7}$ cm ² s ⁻¹
Coefficient de frottement f/f_0	1,043
Rayon de la sphère équivalente	19,2 Å
Point isoélectrique	6,80
Activité moléculaire spécifique	578

TABLEAU N° 5

Selon cette théorie, la réduction catalysée par l'enzyme est un processus en deux étapes : protonation de l'azote N₅ du DHF dans un premier temps, puis attaque nucléophile sur l'atome de carbone adjacent sur l'hydrure H⁻ provenant du NADPH. Ce raisonnement est déduit des propriétés redox générales des folates en solution, et il concorde également avec les mécanismes proposés par d'autres deshydrogénases.

Une autre possibilité est que le proton provienne tout simplement de l'eau.

Le problème de donneur de proton est donc loin d'être éclairci. Les travaux de microcalorimétrie de SUBRAMANIAN et KAUFMAN (67) sur la DHFR de foie de poulet suggèrent que la réaction ne nécessite pas d'être ordonnée du point de vue enthalpique, mais que l'augmentation de la liaison du NADPH dans le complexe binaire est d'origine entropique.

Des études de cinétique par fluorescence et par dialyse à l'équilibre (28, 48) montrent que la DHFR existe au moins sous deux formes interconvertibles dont les proportions relatives dépendent du pH: le NADPH ne peut se fixer rapidement que sur l'une des deux formes. La DHFR utilisée est d'origine bactérienne.

Il ressort de toutes ces études que les résultats concernant le processus de la réaction enzymatique sont plus ou moins contradictoires. La même hétérogénéité apparaît sur le plan pratique dans les expériences d'activité enzymatique, la nature chimique des tampons ; le pH, la force ionique, la présence de divers ions ou d'agents dénaturants modifient différemment les résultats suivant les auteurs et l'origine de la DHFR.

L'activité de l'enzyme du foie de boeuf en particulier augmente avec la force ionique du milieu ; elle est inhibée par les composés mécaniques et présente un seul pH d'activité optimum.

Contrairement à l'enzyme issu de *Plasmodium Berghei* dont l'activité est trois ou quatre fois plus importante en présence de KCl (4,5 M) ou uree (4,5 M), la DHFR issue de *Plasmodium falciparum* voit son activité diminuer en resence de ces différents agents aux mêmes

concentrations (42).

Notons enfin que le pH optimum des DHFR de Plasmodium se situe entre 6 et 7 (tableau 6).

SOURCE DE L'ENZYME	pH OPTIMUM	MASSE MOLECULAIRE (daltons)
Plasmodium		
Knowlesi	6 - 7,1	185.000
Berghei	7 - 7,2	190.000
Lophurdae	6,5	103.000
Falciparum	6,5	210.000

TABLEAU 6

Comparaison de dihydrofolate reductases provenant de différentes espèces de Plasmodium

On peut maintenant envisager les études qui ont essayé de préciser les résidus acides aminés de la DHFR intervenant spécifiquement dans l'activité enzymatique. Ces travaux s'opèrent en modifiant par un réactif des résidus précis et en observant alors les conséquences sur l'activité enzymatique. Les acides aminés concernés sont l'arginine, le tryptophane, la lysine, la cystéine, l'histidine, la méthionine et la tyrosine.

Un certain nombre de résidus acides aminés et en particulier les résidus Trp et Tyr sont impliqués dans la réaction biologique et donc vraisemblablement lors de la liaison des antifolates dont la formule chimique présente une certaine analogie avec le substrat DHF. Ces résidus Trp et Tyr sont les fluorophores de la macromolécule. Il ne sera donc pas surprenant de constater une variation de la fluorescence de la DHFR consécutive à la fixation de la Pyriméthamine en particulier, et en général des 2-4 diamino-pyrimidines.



TRAVAUX ANTERIEURS

Des études spectroscopiques mettant en jeu les phénomènes de fluorescence, dichroïsme circulaire et résonance magnétique nucléaire d'une part et des techniques telles que microcalorimétrie et dialyse à l'équilibre d'autre part, ont permis soit de déterminer les paramètres d'interaction, soit de préciser la conformation de l'enzyme et les niveaux d'interaction, enzyme-ligand, aussi bien dans les complexes binaires DHFR-inhibiteur que dans les complexes ternaires DHFR-inhibiteur-coenzyme.

Ces études contribuent le plus souvent à éclaircir la disposition du substrat par rapport à l'enzyme et les groupements mis en jeu lors de l'interaction tant du côté macromolécule que du côté ligand (53).

FLUORESCENCE

Les données de la littérature sont restreintes en ce qui concerne les paramètres d'interaction des DHFR d'origine bactérienne et de la pyriméthamine, que ce soit en présence ou en absence du cofacteur NADPH.

B.B.KITTCHEL et al. (8) cependant, étudient la fluorescence de DHFR d'*Escherichia coli* et de ses complexes binaires et ternaires, ainsi que sa variation en fonction de la température.

L'enzyme subit une dénaturation irréversible à 45°. Le NADPH exerce un effet protecteur vis à vis de cette dénaturation mais contrairement à d'autres antifoliques comme le MTX, la Pyriméthamine ne protège pas l'enzyme.

D'autre part, des études de polarisation de fluorescence mettent en évidence une transition réversible à 30° qui est modifiée par

le NADPH ou la Pyriméthamine. Les auteurs suggèrent que la formation des complexes induit des changements structuraux de la protéine.

D'autres études (68, 69) portant sur des mesures de cinétiques de fluorescence lors de la formation des complexes binaires de DHFR de *Lactobacillus casei* suggèrent que les capacités de liaison de la DHFR sont fortement influencées par la présence d'un ligand supplémentaire. Lors de la formation des complexes ternaires enzyme-coenzyme-inhibiteur les constantes de dissociation se situent entre $4 \cdot 10^{-7}$ M et $7 \cdot 10^{-6}$ M.

Aucun travail, à notre connaissance, ne concerne l'interaction PYR-DHFR d'origine de mammifère.

DICHROISME CIRCULAIRE

GREENFIELD (31,58) a déterminé la constante de dissociation de la Pyriméthamine dans les complexes binaires et ternaires de la DHFR d'*Escherichia coli*. La liaison de la Pyriméthamine avec l'enzyme induit de larges effets cotton. Le spectre de dichroïsme circulaire du complexe enzyme pyriméthamine est représenté sur la figure 10.

Apparemment la Pyriméthamine ne peut modifier la constante d'association du NADPH avec la DHFR.

La liaison initiale de la Pyriméthamine induit une activité optique dans la bande de 345 nm du NADHP quand le coenzyme est lié au complexe enzyme-Pyriméthamine. Cette liaison initiale de la Pyriméthamine modifie apparemment le site de liaison ou la géométrie du NADPH lié, mais elle ne semble pas affecter la constante d'association du cofacteur à l'enzyme.

Il faut noter également que l'inhibition de la DHFR par la Pyriméthamine n'est pas accrue par la préincubation de l'enzyme avec l'inhibiteur et le cofacteur, résultat opposé à ceux obtenus avec le méthotrexate.



LE DICHOISME CIRCULAIRE DES COMPLEXES DE LA DHFR AVEC LA PYRIMETHAMINE

La constante de dissociation du complexe enzyme-pyriméthamine est de 10^{-6} M.

LA MICROCALORIMETRIE

Une étude thermodynamique de l'interaction des folates avec la DHFR de foie de poulet a été effectuée par S. SUBRAMANIAN et B.T. KAUFMAN (67). Ces auteurs ont déterminé les variations d'enthalpie.

Nous verrons ultérieurement que la microcalorimétrie ne permet pas d'évaluer les constantes de formation de complexes dont la valeur excède 10^6M^{-1} . En conséquence, c'est en utilisant la technique de fluorescence que ces auteurs ont calculé les constantes d'équilibre de différents complexes. A partir des relations $\Delta G^\circ = -RT \log K$ et $\Delta G^\circ = \Delta H - T\Delta S$, SUBRAMANIAN et al. ont pu en déduire les paramètres thermodynamiques rassemblés dans le tableau 7. D'autre part, ils ont calculé le ΔH de liaison de ces mêmes composés dans le tampon phosphate de potassium et le Tris. HCl à pH = 7,4 et à 25°C (tableau 8). L'enthalpie de liaison du NADPH avec l'enzyme est de - 3,4 kcal mole⁻¹ dans le tampon phosphate de potassium et de - 4,4 kcal mole⁻¹ dans le Tris HCl. La différence de 1 kcal mole⁻¹ est faible mais significative. Cet excès indique une ionisation du NADPH qui perd un proton pour se lier à l'enzyme sous forme anionique. Il faut noter que les auteurs ont étudié la liaison du MTX (2-4 diamino pyrimidine) avec la DHFR dans les mêmes tampons. Le ΔH de liaison du MTX est de - 13,3 kcal mole⁻¹ dans le tampon phosphate de potassium et de - 2,9 kcal mole⁻¹ dans le Tris-HCl. Cette différence de 10,4 kcal mole⁻¹ selon le tampon peut s'expliquer par un transfert de protons car l'activité de la DHFR est identique dans les deux tampons.

Le ΔH de déprotonation du tampon Tris est de - 11,36 kcal mole⁻¹ à 25°C avec une force ionique de 0,1 et le ΔH de déprotonation de H_2PO_4^- est de 0,8 kcal mole⁻¹ à 25°C avec une force ionique de 0.

La différence de chaleur de déprotonation de ces deux tampons est donc de $-10,56 \text{ kcal mole}^{-1}$. Cette différence correspond à la liaison du MTX à la DHFR. D'autre part, le pKa de protonation de l' N^{-1} du MTX est de 5,71. Le pKa s'élève de 3 unités dans le complexe enzyme-méthrotrexate ; mais le MTX retient un proton (donné par le tampon) sur son N^{-1} parce que la liaison avec l'enzyme se fait à $\text{pH} = 7,4$.

LIGAND	$K_a (\text{M}^{-1})$	ΔG° kcal mole ⁻¹	ΔH° kcal mole ⁻¹	ΔS° kcal mole ⁻¹
NADP ⁺	$2,63 \cdot 10^5$	7,4	- 0,6	22,7
NADPH	$3,22 \cdot 10^6$	- 8,9	- 3,4	18,4
Folate	$1,49 \cdot 10^7$	- 9,8	- 11,3	- 4,7
Dihydrofolate	$7,14 \cdot 10^7$	- 10,7	- 11,3	- 20

TABLEAU N° 7

Paramètres thermodynamiques de la liaison du coenzyme et des folates avec la dihydrofolate réductase du foie de poulet dans le tampon phosphate 0,1M à $\text{pH} = 7,4$ et 25°C

LIGAND	ΔH° kcal mole	
	Tampon phosphate 0,1 M	Tampon Tris 0,2 M
Folate	- 11,3 \pm 0,2	- 11 \pm 0,2
Dihydrofolate	- 11,3 \pm 0,3	- 11,4 \pm 0,5
NADPH	- 3,4 \pm 0,2	- 4,4 \pm 0,2
NADP ⁺	- 0,6 \pm 0,2	

TABLEAU N° 8

Les enthalpies de liaison du folate et de sa forme réduite, ainsi que du coenzyme et de sa forme oxydée avec la DHFR d'E. coli dans les tampons phosphates de K et le Tris HCl à $\text{pH} = 7,4$ et à 25°C .

LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Peu de travaux font état des interactions de la PYR et des DHFR d'origine bactérienne.

Cependant, il faut noter que COCCO et al. (23) étudient par RMN du ^{13}C la liaison de la Pyriméthamine et de la DHFR. Le C_2 de l'hétérocycle est enrichi au ^{13}C .

En l'absence de DHFR le pKa de la PYR est de 7,85 et le carbone 2 (C_2) présente un seul pic. En présence de DHFR le C_2 a deux pics :

- un pic qui reste constant avec le pH : c'est la forme liée. On n'observe pas de déprotonation jusqu'à pH = 10 ce qui implique que le pKa soit supérieur à 10,
- un pic qui varie avec le pH : c'est la forme libre.

L'écart de 0,72 ppm entre le C_2 de la forme libre et le C_2 de la forme liée est dû à l'effet électronique du groupement carboxylique qui interagit avec NI avec une contribution supplémentaire due à une liaison hydrogène engagée par le groupe NH_2 en 2.

Les variations des valeurs des pKa ne suffisent pas à rendre compte de différences élevées observées pour les constantes d'association des différents composés étudiés (PYR, MTX).

LA DIALYSE A L'EQUILIBRE

La dialyse à l'équilibre a permis à B.B. PATTISHALL et al. (48) de déterminer l'affinité de la pyriméthamine pour les deux formes interconvertibles de la DHFR d'*Escherichia coli* qu'ils ont séparées.

La liaison de la pyriméthamine dans les complexes ternaires n'est pas modifiée par rapport aux complexes binaires.

La Pyriméthamine n'affecte pas la liaison du NADPH avec la DHFR dans les complexes ternaires.

Les constantes de dissociation et le nombre de sites pour chaque espèce sont représentés dans le tableau 9.

PARAMETRES	ENZYMES	
	E1	E2
Complexes binaires		
Kd (nM)	5	47
n	0,42	0,54
Complexes ternaires		
Kd (nM)	4	45
n	0,34	0,56

TABLEAU N° 9

Constantes de dissociation et nombre de sites de fixation
des DHFR d'Escherichia coli avec la Pyriméthamine

6. Enfin, des études de cinétique enzymatique ont permis à S.C. KAN et W.A. SIDDIQUI (42), après avoir séparé les DHFR de Plasmodium et d'Aotus trivigatus de déterminer les constantes de MICHAELIS (K_m) du DHF et du NADPH pour l'enzyme ainsi que la constante d'inhibition (K_i) pour la pyriméthamine (tableau 10).

Ces mêmes auteurs font une étude comparative de la constante de Michaelis du DHF et du NADPH pour les dihydrofolate reductases de différentes espèces de Plasmodium. Les K_m (constante de Michaelis) du DHF et du NADPH pour la DHFR du Plasmodium sont supérieurs à celles d'autres espèces. Ces résultats sont résumés dans le tableau n° 10.

SOURCES D'ENZYME	K_m DHF (μM)	K_m NADPH (μM)	K_i de la PYR (μM)
Plasmodium falciparum			
. Souches résistantes	21	16	1,5
. souches sensibles	18	17	2,1
Globules rouges d'Aotus	5,1	3,6	2500

TABLEAU N° 10

Constantes de Michaelis et d'inhibition du DHF et du NADPH pour la dihydrofolate reductase de différentes souches de Plasmodium et des globules d'Aotus trivigatus

SOURCE DE L'ENZYME	K _m du DHF (μ M)	K _m du NADPH (μ M)
Plasmodium		
Knowlesi	3	1
Berghei	36	1,3
Lohpurdoe	14	10
Falciparum	21	16

TABLEAU N° 11

Constantes de Michaelis (K_m) du DHF et du NADPH
des DHFR de différentes souches de Plasmodium

EN CONCLUSION

On peut dire qu'aucune étude d'interaction n'a été réalisée entre les DHFR de mammifère et la Pyriméthamine.

La PYR semble très différente dans son comportement vis à vis de la DHFR de bactérie ou de Plasmodium des autres antifoliques tel le MTX.

La PYR a une affinité pour les deux formes interconvertibles de la DHFR d'*Escherichia coli*.

TRAVAUX PERSONNELS



Dans ce chapitre, après avoir souligné l'intérêt pharmacologique et biochimique de notre travail, nous aborderons le côté technique de notre étude, les appareils utilisés lors de notre expérimentation, les produits commerciaux employés dont la pureté s'est avérée suffisante pour nos préparations. Nous développerons plus particulièrement l'extraction et la purification de la dihydrofolate réductase d'origine bovine.

Nous exposerons ensuite les deux méthodologies qui nous ont permis de mener à bien l'étude de la fixation d'un antifolate à la DHFR, nous aborderons le mode d'exploitation des données expérimentales et nous conclurons par les résultats que nous discuterons.

Remarque

Pour rester conforme et pouvoir nous référer à des publications antérieures du laboratoire concernant soit la fluorescence, soit la microcalorimétrie, les symboles littéraux utilisés dans les deux méthodes pour désigner la concentration en médicament et en complexe seront différents.

I. OBJET DU TRAVAIL

A l'inverse de nombreux inhibiteurs de la DHFR, il n'existe donc, à notre connaissance, aucune valeur dans la littérature concernant les paramètres de liaison de la Pyriméthamine à une dihydrofolate réductase de mammifère, aussi bien en l'absence qu'en présence du cofacteur NADPH. Etant donné les différences mises en évidence pour le triméthopri- me (7) de ces paramètres de liaison avec les enzymes de différentes espèces, différences qui conditionnent aussi bien l'activité que la toxicité du produit, il nous a paru important sur le plan pharmacologique de déterminer les valeurs de la constante d'affinité et de la variation enthalpique de l'interac- tion PYR-DHFR de mammifère en présence et en l'absence de NADPH.

Nous avons choisi comme enzyme la DHFR de foie de boeuf dont la technique de purification par chromatographie d'affinité a été mise au point notamment par KAUFMAN (44).

Toujours dans un but pharmacologique, une comparaison avec les paramètres de fixation du MTX (déterminés dans les mêmes condi- tions) utilisé comme anticancéreux du fait de sa fixation sur la DHFR humaine et dont la toxicité est importante, a été réalisée.

Par ailleurs, dans un but plus fondamental, la connaissance de l'ensemble des paramètres thermodynamiques de l'interaction peut nous renseigner sur le type de forces engagées dans cette liaison et sur le caractère dominant enthalpique ou entropique de celle-ci.

Des études de compétition avec le MTX nous ont permis d'aborder le site de liaison du médicament avec l'enzyme.

Enfin, la variation dans le temps, d'une part de paramètres de liaison des complexes binaires et ternaires, d'autre part de l'activité de l'enzyme conditionnée par la formation du complexe ternaire substrat naturel (DHF) cofacteur (NADPH), enzyme (DHFR), nous a renseigné sur le rôle joué par le coenzyme.

De même, la comparaison pour une même préparation enzymatique du nombre de sites et de la constante d'affinité pour les complexes binaires et ternaires, permettra de mettre en évidence une éventuelle coopérativité qui a été découverte dans le cas du Triméthoprim (23) et du Methotrexate (14).

Pour réaliser l'ensemble de ces objectifs tant pharmacologiques que biochimiques, nous avons tout d'abord mis au point une technique de purification de la DHFR de foie de boeuf directement inspirée de la technique de KAUFMAN.

Nous avons ensuite utilisé deux techniques d'étude des interactions moléculaires qui sont l'inhibition de fluorescence et la microcalorimétrie.

La première de ces techniques nous a permis pour chaque préparation enzymatique de déterminer les constantes d'affinité et le nombre de sites de fixation sur la protéine. La microcalorimétrie nous a permis de déterminer directement la variation d'enthalpie et l'existence d'éventuelles compétitions. Cette même technique calorimétrique permet également d'appréhender le nombre de sites de fixation et les rapports entre les constantes d'affinité de deux compétiteurs. Ceci a donc constitué un contrôle de la cohérence des deux techniques d'étude utilisées.

2. APPAREILLAGES ET TECHNIQUES

APPAREILLAGES

- Les mesures de fluorescence ont été réalisées grâce à un spectrofluorimètre KONTRON S.F.M. 25 à cuves thermostatables indispensables étant donné la grande sensibilité de ce processus de luminescence vis à vis de la température. Nous avons reporté sur la figure n° 11 le schéma de principe de cet appareil.

La source et une lampe au Xenon de 150 Watts.

La correction à l'émission est assurée par l'intermédiaire d'une photodiode.

Les monochromateurs couvrent une gamme de 200 à 800 nm

Les éléments diffractants sont des réseaux définis par 1200 traits par mm.

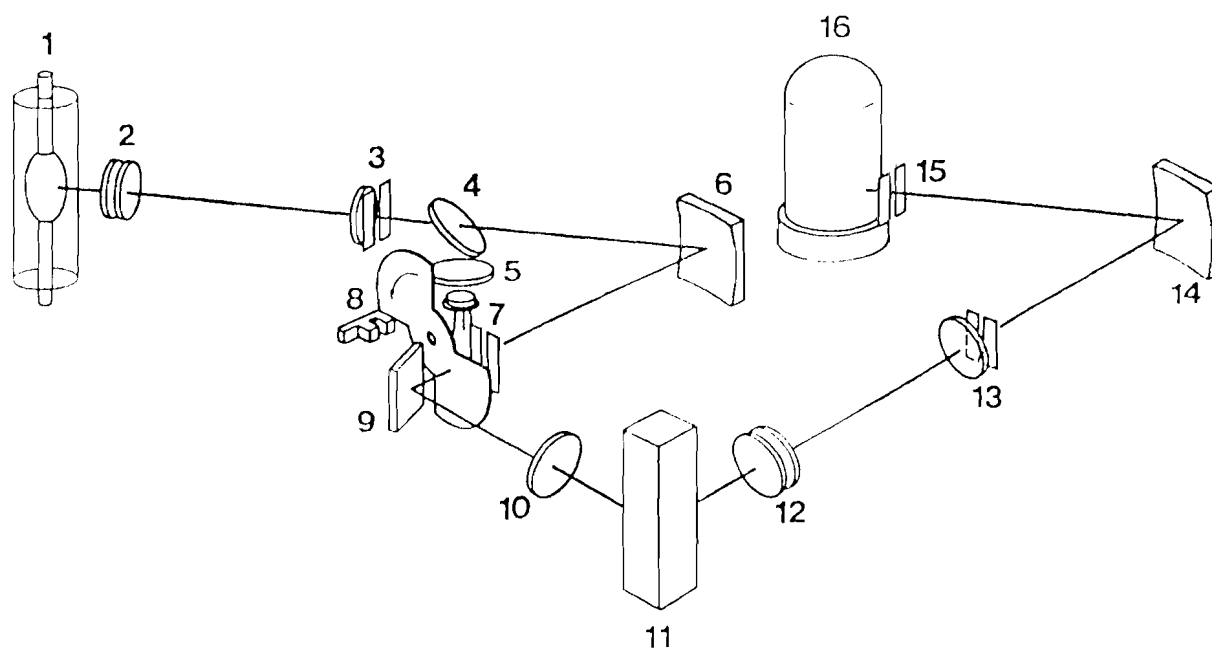
Les fentes sont de 10 nm à l'excitation et à l'émission.

Le porte cuve est thermostaté par un système de circulation d'eau.

La lumière de fluorescence émise par l'échantillon est recueillie sur un photomultiplicateur R 212 (200-600 nm).

Le contrôle des opérations s'effectue par l'intermédiaire de trois microprocesseurs. Il est ainsi possible soit de choisir a priori la haute tension d'alimentation du photomultiplicateur et donc sa sensibilité, soit de calibrer l'appareil de façon à ce que la fluorescence du produit corresponde à 100 sur le digit ce qui facilite l'enregistrement pleine échelle sur l'enregistreur, la déduction automatique du bruit de fond mesure sur une cuve ne contenant que le tampon est également réalisable. Dans notre cas, cette opération permettait de corriger notamment l'effet Raman. Nous avons préféré utiliser la première des solutions, c'est-à-dire choisir la tension d'alimentation du P.M. qui variait de 400 à 500 volts. Nous avons d'autre part systématiquement mesuré le "bruit de fond" sur le tampon dont toutes les mesures ont été corrigées.

Un enregistreur W + W 600 TARKAN couplé au spectrophotomètre permet l'enregistrement des spectres.



1. Lampe Xenon
2. Lentille
3. Fente d'entrée du monochro-d'excitation
4. Beam splitter
5. Détecteur référence (photo diode)
6. Réseau (excitation)
7. Fente réglable (sortie monochromateur excitation)
8. "Chopper"
9. Miroir plan
10. Lentille
11. Cuve echantillon
12. Lentille
13. Fente réglable (entrée du monochromateur d'émission)
14. Réseau
15. Fente réglable (sortie du monochromateur d'émission)
16. Photomultiplicateur

SCHEMA DE PRINCIPE DU SPECTROFLUORIMETRE SFM 25

- Les mesures microcalorimétriques ont été effectuées sur un fluxmètre à circulation (Bioactivity Monitor) récemment commercialisé par la société L.K.B. (fig. 12).

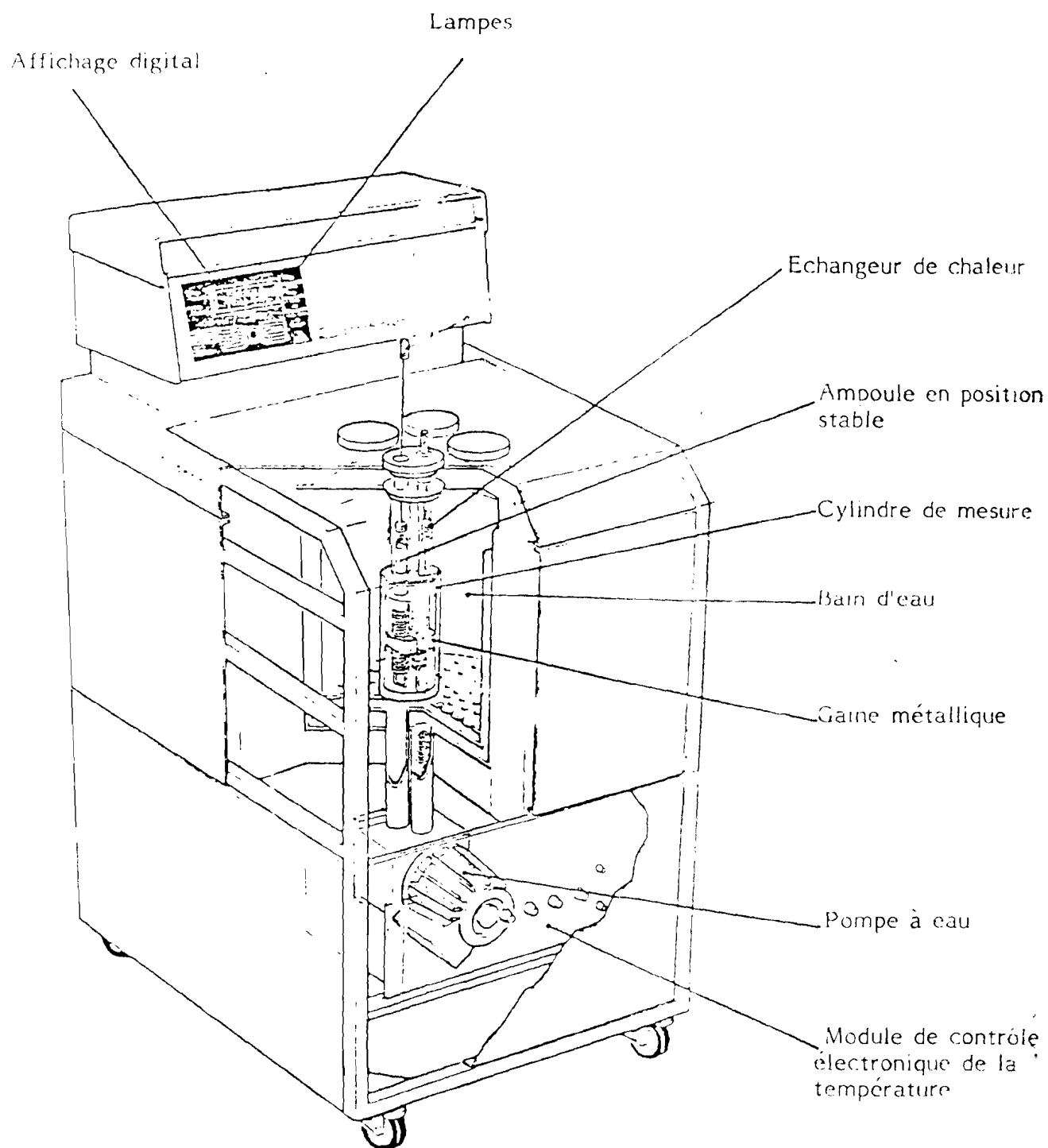
Le calorimètre comprend quatre modules constitués chacun par une cellule de mélange et une cellule de référence (fig. 13).

L'ensemble est immergé dans un bain thermostaté de 23 litres dont la stabilité thermique est supérieure à $2 \cdot 10^{-4}^{\circ}\text{C}$ sur huit heures. L'intervalle des températures d'utilisation est compris entre 10°C et 80°C . La durée de stabilisation lorsque la température varie par exemple de 10°C à 37°C ou inversement, est de l'ordre de 12 heures. La vitesse de chacune des deux pompes (l'une pour le circuit protéine et l'autre pour le ligand) préconisé par le constructeur est de 20 ml/h. La sensibilité des détecteurs est de $0,30 \mu\text{v}$. La constante de temps est de 124 s. Les différents calibres d'utilisation de chaque module directement gradué en μw vont de $3 \mu\text{w}$ à $3000 \mu\text{w}$ /pleine échelle. Sur l'expansion d'échelle $10 \mu\text{w}$ utilisée pour les enregistrements des figures et pour un débit de pompe global de 40 ml/h, le bruit de fond est de l'ordre de $\pm 1 \mu\text{w}$ et la stabilité de la ligne de base, sur une durée de huit heures, est supérieure à $\pm 0,3 \mu\text{w}$. Pour favoriser l'homogénéisation des réactifs, le diamètre du tuyau à l'entrée de la cellule de mélange (vol. = 0,6 ml) présente un rétrécissement de 1 à 0,2mm.

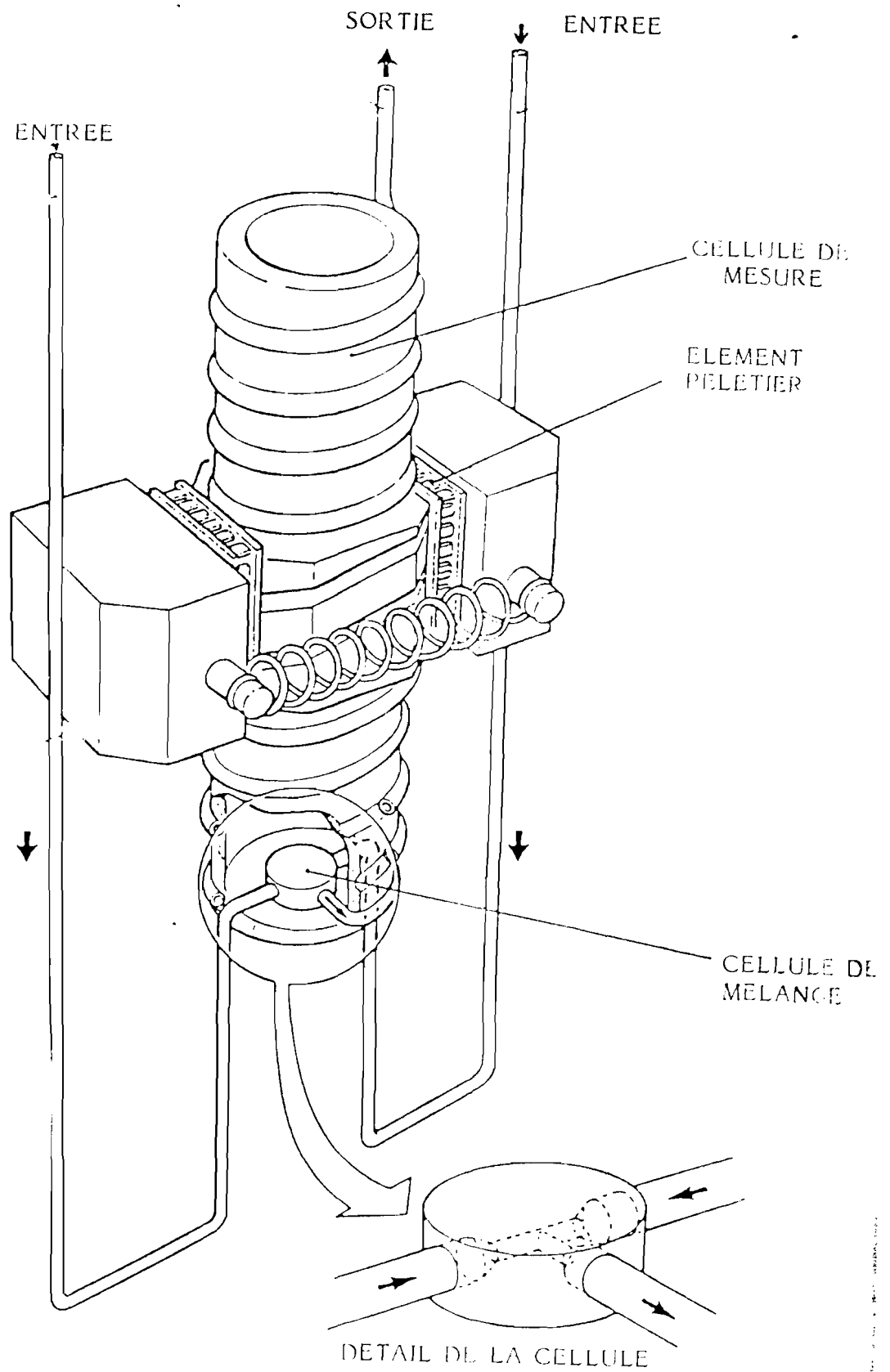
L'appareil s'avère, de ce fait, extrêmement sensible aux bulles gazeuses qui pourraient éventuellement obstruer la cellule : il est indispensable de dégazer les réactifs avant leur utilisation.

- Les dosages spectrophotométriques ont été réalisés sur spectrophotomètre d'absorption UVIKON 820 de la firme Roche Bioélectronique KONTRON et dont les cuves sont également thermostatables, ce qui est indispensable pour les mesures d'activité enzymatique opérant suivant le cas avec une lampe à halogène pour le domaine du visible, ou avec une lampe à deuterium pour l'ultraviolet.

- Nous avons ajusté les pH de nos solutions à l'aide d'un pH mètre Taccussel de type P 60 à électrode de verre combinée type T.B.C.



LE LKB 2277 (BIOACTIVITY MONITOR)



SYSTEME DE MELANGE DE FLUIDE

- Toutes les chromatographies ont été réalisées à débit contrôlé grâce à des pompes micropex L.K.B. 2132 dans des colonnes de diamètre calibré à pistons ajustables fournies par Pharmacia Fine Chemicals. La collection des éluats est assurée par un collecteur de fractions LKB 2112 Redirac et le diagramme des mesures de densité optique obtenu par un détecteur L.K.B. 2138 UVIKORD pourvu d'une lampe émettant à 206 et 280 nm et d'un filtre interférentiel permettant de sélectionner la longueur d'onde de 280 nm, et enregistré sur un enregistreur SEFRAM de type SERVOTRACE.

- Un système d'ultrafiltration AMICON muni de membrane Diaflo YM 10 qui retient les molécules de masse moléculaire supérieure à 10.000 daltons, nous a permis de concentrer les solutions protéiques. Un lavage abondant à l'eau distillée assure le conditionnement de membranes supprimant la couche protectrice de glycérine.

- Toutes les centrifugations ont été réalisées à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée HERAUS-CHRIST-ZETA 20, munie d'un rotor angulaire permettant de traiter en une fois 1,95 litre (6 x 325 ml).

- Le broyage du foie de bœuf a été réalisé dans un mixer Waring Blendor.

- La préparation de la DHFR a été poursuivie en chambre froide à 4°C.

PRODUITS

- AB Sepharose 4B, Sephadex G 75, DLAE Sephacel étaient des produits de Pharmacia Fine Chemical.

- Biorad Laboratories nous a fourni l'hydroxyl apatite biogel HTP.

- Le tris-hydroxyméthyl ammonométhane (Tris), l'éthylène diamine tétraacétique (EDTA), le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$.

Le mercapto-2-éthanol ($\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), l'ammoniaque (NH_4OH), le chlorure de manganèse (Mn-Cl_2), le sulfate de Zn (Zn-SO_4), le chlorure de sodium (Na-Cl), l'acide chlorhydrique (H-Cl), le dipotassium hydrogénophosphate (K_2HPO_4), le potassium dihydrogénophosphate (KH_2PO_4) étaient des produits de qualité R.P. Normapur Prolabo.

- Les produits FLUKA tels que le merthiolate, le N (3-Diméthyl-aminopropyl) le N ' ethyl carbodimide de qualité purum nous ont donné entière satisfaction.

- Sigma Chemical Company nous a fourni l'acide dihydrofolique (DHF), l'adenine dinucléotide β nicotinamide diphosphate (NADPH). Il faut enlever l'alcool du NADPH en l'évaporant.

- L'acide acétique glacial était un réactif Carlo-Erba.

- Le laboratoire SPECIA nous a gracieusement fourni la yriméthamine, ainsi que le méthotrexate de pureté proche de 95 % qui a subi une purification supplémentaire suivant la méthode de JOHNS et TILLOO (tableaux 12, 13).

Enfin, nous avons isolé et purifié la DHFR de foie de bœuf suivant la méthode de KAUFMAN et KEMERER.

PYRIMETHAMINE

Caractères généraux	conformes
Réaction d'identité	conformes
Limpidité et coloration	conformes
Métaux lourds	conformes
Perte à la dessiccation	0,10 p. 100
Cendres sulfuriques	conformes
Titre (sur sec.)	99,65 p. 100

Conclusion : conforme

TABLEAU N° 12

Fiche analytique de la Pyriméthamine (SPECIA)

METHOTREXATE

Caractères organoleptiques	Conformes
Identification	Conformes
Eau (Fischer)	6,7 p. 100
Cendres sulfuriques	0,02 p. 100
Titre (sur sec)	101,7 p. 100

Conclusion : conforme

TABLEAU N° 13

Fiche analytique du MTX (SPECIA)

METHODOLOGIE

PREPARATION DE LA DIHYDROFOLATE REDUCTASE

Nous avons pris comme référence la méthode de KAUFMAN et KEMERER (44) que nous avons modifiée à notre convenance.

Cette préparation comprend plusieurs chromatographies successives basées sur des principes tout à fait différents : chromatographie d'affinité, filtration sur gel, chromatographie sur hydroxylapatite. Le problème initial qui se pose est d'isoler la DHFR à partir d'un extractif de foie de boeuf, très riche en protéines diverses. Cette étape doit donc présenter un caractère très sélectif et est assurée par chromatographie d'affinité. Cette technique relativement récente et largement utilisée pour la préparation de nombreuses macromolécules biologiques repose sur l'interaction très importante et spécifique entre l'enzyme à isoler, la DHFR et un inhibiteur, dans notre cas le méthotrexate, lui-même lié de façon covalente à une matrice insoluble.

La colonne absorbe donc, quand on la charge, l'enzyme à préparer.

L'éluion tout aussi spécifique est amorcée par une solution concentrée d'acide dihydrofolique capable de se fixer également à la DHFR quoique de façon moindre et c'est le rapport de concentration entre MTX et DHFR qui détermine la désorption de la DHFR, favorisée par le pH choisi et la fixation du MTX sur la matrice.

Cette chromatographie d'affinité est suivie d'une filtration sur gel afin d'éliminer des protéines de poids moléculaire plus élevé que la DHFR qui, malgré la sélectivité de l'étape précédente, seraient présentes dans l'éluat de la colonne d'affinité.

Enfin, le passage sur hydroxylapatite permet de séparer deux pics, l'un correspondant à la DHFR isolée alors que l'autre représente le complexe DHFR-DHF.

La préparation et le conditionnement de la colonne d'affinité constituent donc des étapes essentielles pour l'isolement de la DHFR.

Réalisation de la colonne d'affinité

- Principe

Il repose sur la formation d'un dérivé ω -aminoalkyl par la réaction d'une alkyldiamine appropriée sur de l' amino-hexyl Sepharose 4 B, Sepharose préalablement activée au bromure de cyanogène commercialisée par Pharmacia Fine Chemicals et couplage par liaison covalente du ligant MTX aux groupements aminés libres de l'AH Sépharose 4 B constituant des "bras latéraux", par l'intermédiaire de formation de liaisons peptidiques en présence de carbodiimide.

- Protocole expérimental

Pratiquement, la colonne d'affinité de 20 cm de hauteur et 2,5 cm de diamètre nécessite l'utilisation de 22 g de Sepharose activée mis à gonfler quinze minutes dans un bécher contenant 200 ml d'eau distillée. Un lavage sur verre fritté G₃ s'effectue avec 4,5 l de chlorure de sodium 0,5 M et 1,1 l d'eau à pH = 6,5 afin d'éliminer tous les additifs.

Dans un mortier on pulvérise 0,5 g de MTX que l'on dissout dans 50 ml de chlorure de sodium 0,1 M (quelques gouttes de potasse normale ajoutées préalablement permettent une dissolution rapide).

Le mélange MTX, AH-Sepharose 4 B est alors réalisé dans un rapport volumique (1 : 4) très lentement, en agitant manuellement et avec précaution afin d'éviter toute détérioration mécanique des bras latéraux nécessaires à la fixation du ligand.

Le couplage par l'intermédiaire de carbodiimide a lieu par addition à quinze minutes d'intervalle et en trois fractions de 1,5 g de 1, ethyl 3, 3 diméthyl aminoproyl carbodiimide préalablement solubilisés dans de l'eau distillée. Pendant cette opération, le pH est maintenu à 6,5 par addition éventuelle d'HCl (N) ; l'acidité est ensuite abaissée, une heure après, à la fin de l'addition de carbodiimide à pH = 6 et la réaction se poursuit pendant deux heures à température ambiante.

La suspension est filtrée sur verre fritté G₁ et lavée avec avec 50 ml d'eau distillée.

Le gel ainsi conditionné de couleur jaune orangé intense est de nouveau rincé, à deux reprises respectivement à l'aide des solutions suivantes :

250 ml de Na Cl (1 M)
 500 ml H₂O distillée
 250 ml K₂ HPO₄ (1 M)
 puis 500 ml H₂O distillée
 250 ml K₂ HPO₄ (1 M)
 1000 ml H₂O.

Les filtrats sont conservés afin de déterminer spectrophotométriquement les quantités de MTX qui n'ont pas réagi par mesure de la densité optique à $\lambda = 302$ nm ($\epsilon = 22\ 100$ M⁻¹ cm⁻¹) et $\lambda = 257$ nm ($\epsilon = 23000$ M⁻¹ cm⁻¹) dans KOH 0,1 N.

On évalue à 60 % la quantité de MTX couplé soit environ 10 micromoles de ligand par ml de gel conditionné. Le gel est ensuite mis en suspension dans du tampon phosphate de potassium (KH₂PO₄) 10 mM, pH = 5,6 puis versé dans la colonne sur une hauteur de 20 cm pour un diamètre de 2,5 cm.

En dépit d'un lavage important, il s'avère que du MTX non lié peut rester fortement adsorbé sur la Sépharose ; ce MTX serait désorbé lors de la fixation des premiers extraits de foie contenant l'enzyme et entraînerait un rendement de préparation faible lors de la première utilisation d'une colonne d'affinité fraîchement conditionnée.

Un pretraitement de la colonne à l'aide d'une solution concentrée d'acide folique (0,5 g dans 5 ml de tampon K₂ HPO₄ molaire en milieu basique) permet de trouver un palliatif.

Deux rinçages suivent : 100 ml K₂ HPO₄ (1 M)
 200 ml KH₂ PO₄ (0,1 M)

contenant 1 M Na Cl, pH = 5,6, puis un volume de tampon phosphate de potassium (KH_2PO_4 10 mM) suffisant pour que la densité optique de l'éluat soit pratiquement nulle à $\lambda = 280$ nm, preuve de l'absence de MTX en excès susceptible de se désorber lors de l'éluion de la colonne d'affinité.

La purification de la DHFR par chromatographie d'affinité peut alors être mise en oeuvre. Les dimensions de la colonne permettent de traiter une quantité de foie de boeuf d'une dizaine de kilogrammes par fraction de 750 g avant de procéder à l'éluion.

Après cette dernière opération, la colonne d'affinité peut être régénérée par lavage au tampon Tris (100 ml, 0,2 M), et rinçage par un litre de tampon phosphate potassium 10 mM, pH = 5,6.

La conservation entre deux manipulations de purification nécessite la présence d'un agent bacteriostatique convenable (Merthiolate à 0,02 %) et une température de 4°C .

En ce qui concerne les deux autres colonnes de chromatographie utilisée, nous préciserons dans le mode opératoire les méthodes classiques de conditionnement du gel SephadexG-75 assurant la chromatographie d'exclusion, et de l'hydroxylapatite dont le mécanisme de séparation correspond à une adsorption très particulière. Il s'agit en fait d'une interaction soit de groupements chargés négativement (acide carboxylique et phosphate) avec les ions Ca^{++} en surface des cristaux, soit des groupements chargés positivement avec les ions phosphates de l'hydroxylapatite. L'éluion qui s'opère avec une solution de phosphate de potassium n'est pas provoquée par un effet de force ionique ; il y a en fait compétition entre les cations et la substance chromatographiée par une interaction préférentielle avec les ions phosphates des cristaux d'hydroxylapatite.

Avant de décrire avec précision les étapes successives d'isolation et de purification de la DHFR, il nous semble logique de préciser les conditions de l'essai enzymatique qui nous a permis de contrôler tous les stades de notre méthode.

Méthode de dosage enzymatique

L'unité d'activité enzymatique de DHFR est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la réduction d'une micromole de substrat (DHF) par minute, à pH = 6,9 pour une température de 28°

Nous avons réalisé l'essai enzymatique par spectrophotométrie UV basé sur la diminution de densité optique lors de la transformation du NADPH et de l'acide dihydrofolique (DHF) respectivement en NADP⁺ et acide tétrahydrofolate (THF) en présence de DHFR. La variation du coefficient d'extinction moléculaire $\Delta\epsilon$ est égale à $12300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Les conditions du dosage sont un compromis entre les méthodes de KAUFMAN et MATTEWS et sont les suivantes :

Mise à incubation pendant deux minutes à 28°C de :

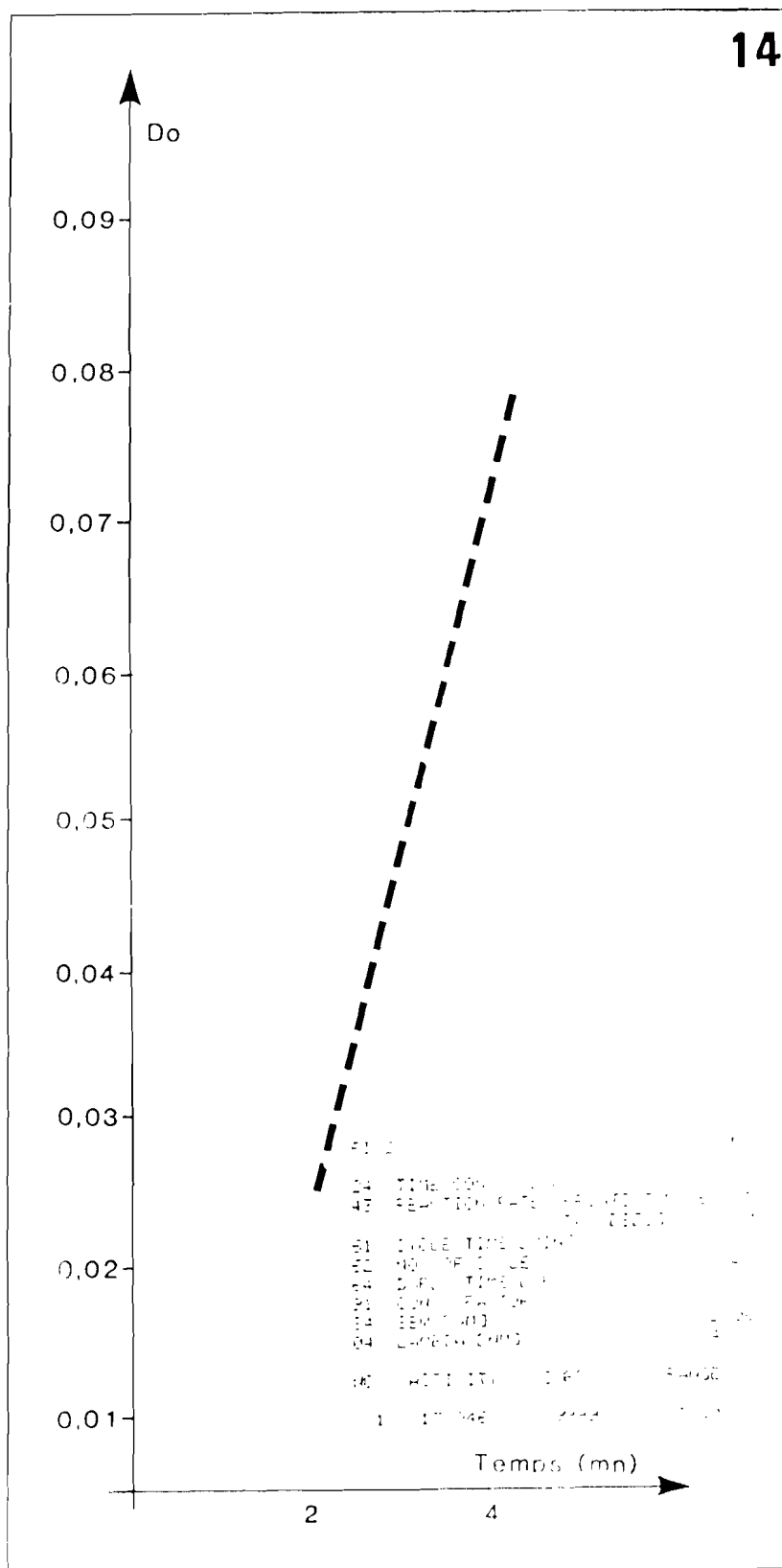
- 2,5 cm³ de tampon tris-maléate,
- 0,2 cm³ d'une solution de mercapto-éthanol 0,1 M
(dans le tampon tris-maléate),
- 0,08 cm³ NADPH 4 mM,
- 0,1 cm³ DHF 2.2 nM (contenant du mercapto-éthanol 0,05 M).

La réaction est ensuite initiée par 10 µl d'enzyme ; la cinétique de la réaction est linéaire.

L'analyse de cette cinétique s'effectue pour vingt points de mesures (cycle n° 20), le temps entre deux points de mesure étant fixé à 0,1 minute (cycle time = 0,1 minute) et le temps de mesure sur chaque point correspondant au temps d'enregistrement graphique (dwell time) à 2 secondes.

Le programme utilisé sur l'UVIKON nous donne trois résultats d'analyse : activité, coefficient de corrélation et identification des points de mesure utilisés pour ce calcul (figure n° 14).

On tient compte d'un facteur de concentration (concentration factor) déterminé par le rapport :



CINETIQUE ENZYMATIQUE

$$\left(\frac{\text{Volume essai (ml)}}{\Delta \epsilon (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times \text{quantité enzyme (ml)}} \right)$$

et exprimé en M.cm.

Le décalage du 0 est assuré avant initiation de la réaction pour pouvoir disposer de la meilleure expansion d'échelle d'enregistrement.

L'addition d'EDTA (0,02 cm³) 9,12 mM est nécessaire pour les essais antérieurs à la chromatographie d'affinité afin de minimiser les effets d'exaltation d'activité enzymatique dus à la présence de sels minéraux dans le milieu (Mg SO₄, KCl, NaCl), utilisés dans les premières étapes de l'extraction.

D'autre part, un essai témoin en absence de DHF nous a donné la possibilité d'évaluer l'activité peroxydase des extrait de foie de boeuf avant la colonne d'affinité afin de corriger les dosages entachés d'erreur par excès. La sélectivité de la chromatographie d'affinité évite, pour tous les dosages des préparations ultérieures à ce stade, cette correction.

Procédé d'extraction de la DHFR

- Isolement

Dans un premier temps, on découpe en petits morceaux 750 g de foie de boeuf (congelé à -40°C par nos soins dès l'abattage), que l'on homogénéise dans deux volumes d'une solution de chlorure de manganèse (75 mM) dans un mixer Waring Blender, deux minutes à vitesse lente, deux minutes à vitesse rapide.

L'homogénéisat est centrifugé vingt minutes à 18000 g. (13000 rotations par minute).

L'action de 20 ml d'une solution de sulfate de zinc (1 M)

précipite la première fraction protéique éliminée dans le culot de centrifugation à 18000 g (13000 rotations par minute). Le surnageant en effet, recueilli après la première centrifugation dans un b cher de 4 l. entouré de glace est agit  lentement à l'aide d'une canne de verre, par addition lente de cette solution de $Zn\ SO_4$ M jusqu'à une concentration finale en sel de l'ordre de 16 mM.

Toujours sous agitation, on ajuste le pH à 7,8, avec NH_4OH concentré ; 0,15 volume d'eau est ajouté au mélange après cinq minutes d'agitation supplémentaire. Une centrifugation de dix minutes à 18000 g suit, soit 13000 rotations par minute ; le culot est éliminé tandis que le pH du surnageant est soigneusement reajust    6,5 par une solution d'acide acétique 5 N.

Une nouvelle précipitation intervient lors de l'addition de 23 g pour 100 ml de surnageant, de sulfate d'ammonium cristallisé en quinze minutes d'agitation.

Une centrifugation, une fois encore, d'un quart d'heure à 18000 g (13000 rotations par minute) permet d'éliminer le précipité. L'étape suivante correspond à l'ajout de 35 g pour 100 ml de surnageant, de sulfate d'ammonium et agitation d'une demi-heure. Le culot séparé par centrifugation à 18000 g (13000 rotations par minute) pendant une vingtaine de minutes est dissout dans un volume minimum de phosphate de potassium 10 mM, pH = 5,6.

Les moindres traces de précipité sont écartées après nouvelle centrifugation à même vitesse de rotation.

Le surnageant rouge clair qui en résulte est alors adsorbé sur la colonne d'affinité avec un débit inférieur à 1 ml/min., adsorption immédiatement suivie d'un lavage au tampon phosphate de potassium 50 mM (150 ml, pH = 5,6) contenant 0,5 M de Na Cl, puis approximativement 1 l de tampon KH_2PO_4 10 mM, pH = 5,6.

  ce stade, la colonne d'affinité est prête à recevoir les applications suivantes jusqu'à concurrence de 12 kg de foie de boeuf, manipulation s'étalant sur une trentaine de jours.

L'activité enzymatique croît régulièrement au cours des trois étapes essentielles d'extraction précédant l'adsorption sur la colonne d'affinité. La fraction succédant à la préparation de l'extractif de foie présente déjà une activité une fois et demie supérieure à cette dernière, tandis que nous retrouvons quatre fois plus d'enzyme active au niveau de la précipitation au sulfate d'ammonium, proportion diminuée d'un facteur trois en présence d'EDTA, ce qui prouve bien "l'effet stimulant" des sels minéraux sur l'activité.

- Elution de la colonne d'affinité

L'élution de la colonne d'affinité a lieu après la dernière application et lavage par un volume de 150 ml de tampon phosphate de potassium (K_2HPO_4 , M).

Cette élution est initiée par l'addition de 2 ml de phosphate de potassium 0,5 M ($K_2 HPO_4$) contenant 4 μ moles de dihydrofolate, mise à incubation toute une nuit puis 300 ml de même tampon dix fois moins concentré (débit de 17 cc/heure) contenant seulement 1 μ mole de dihydrofolate.

Le relargage de l'enzyme adsorbée dépend en effet de la présence de son substrat naturel.

On collecte alors des fractions de 3 ml et on suit l'opération par absorption UV à 280 nm et essai enzymatique.

- Filtration sur gel

La solution obtenue est ensuite soumise à une filtration sur gel Sephadex G 75 essentiellement pour dessaler le milieu concentré lors de l'ultrafiltration précédente et éventuellement pour éliminer certaines

protéines qui contre toute attente n'ont pas été séparées par chromatographie d'affinité.

50 g. de gel Sephadex G 75 ont été mis à gonfler dans 2 l. de tampon et ensuite dégazés sous vide pendant une heure environ. Le gel est ensuite coulé dans une colonne de 1 cm de diamètre sur une hauteur de 1 m et équilibré par du tampon phosphate de potassium PH = 6,8, 10 mM.

L'éluion est effectuée par ce même tampon, avec un débit de 1 ml/ml.

- Chromatographie sur hydroxylapatite

Les fractions actives sont transférées sur une colonne d'hydroxylapatite de 1 cm de diamètre et de 20 cm de hauteur dont la préparation a été réalisée à partir de 22,5 g de poudre de phosphate de calcium calibrée avec précision (Biogel HTP) hydratés par agitation dans du tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 6,8.

L'éluion de l'enzyme s'effectue grâce à un gradient linéaire de tampon phosphate de potassium pH = 6,8 de 10 mM à 0,2 M. Le débit utilisé était de 17 cc/heure, les fractions collectées étaient de 2 ml et l'éluion était suivie par absorption U.V. à $\lambda = 280$ nm. On observe sur le diagramme deux pics distincts de dihydrofolate reductase doués d'activité enzymatique. L'examen du spectre d'adsorption des fractions de chaque pic révèle que seul le second pic représente l'enzyme libre de substrat alors que le premier pic correspond à l'enzyme liée au substrat DHF.

En effet, la densité optique de l'enzyme pure doit être négligeable à 320 nm pour attester de l'absence de dihydrofolate

D'autre part le rapport des absorptions $\frac{A_{280}}{A_{260}}$ doit être supérieur à 1,7. Si ces conditions ne sont pas respectées, l'éluat de l'hydroxylapatite doit selon KAUFMAN subir un traitement sur DEAE Sephadex

dans un tampon 0,1 M pH = 6,8 de façon à rétablir l'ordre de grandeur de ce rapport d'absorption.

On concentre alors selon KAUFMAN, les fractions correspondant à la DHFR sans le ligand par ultrafiltration sur membrane Pellicon (Millipore) PSAC de 62 mm de diamètre ; le résultat de cette opération est dialysé pendant douze heures contre deux litres de tampon phosphate 0,1 M pH = 6,8.

Cette étape d'ultrafiltration est particulièrement délicate et nous avons appris à nos dépens qu'une ultrafiltration trop prolongée amène une dénaturation complète de l'enzyme qui précipite et ne possède plus aucune activité enzymatique.

Si le rapport de l'absorption à 280 nm et à 260 nm est inférieure à 1,7 pour la fraction B, on fait passer de l'enzyme sur une colonne D.E.A. 1. Sephadex pour enlever l'acide dihydrofolique du milieu. On utilise une colonne Whatman, conditionnée par le tampon d'élué de l'hydroxylapatite. La colonne est éluée avec le tampon phosphate de potassium 0,1 M à pH = 6,8.

La dialyse s'avère aussi être une phase "dangereuse" mais inévitable pour l'utilisation de l'enzyme en microcalorimétrie, pour éviter une chaleur de dilution trop importante

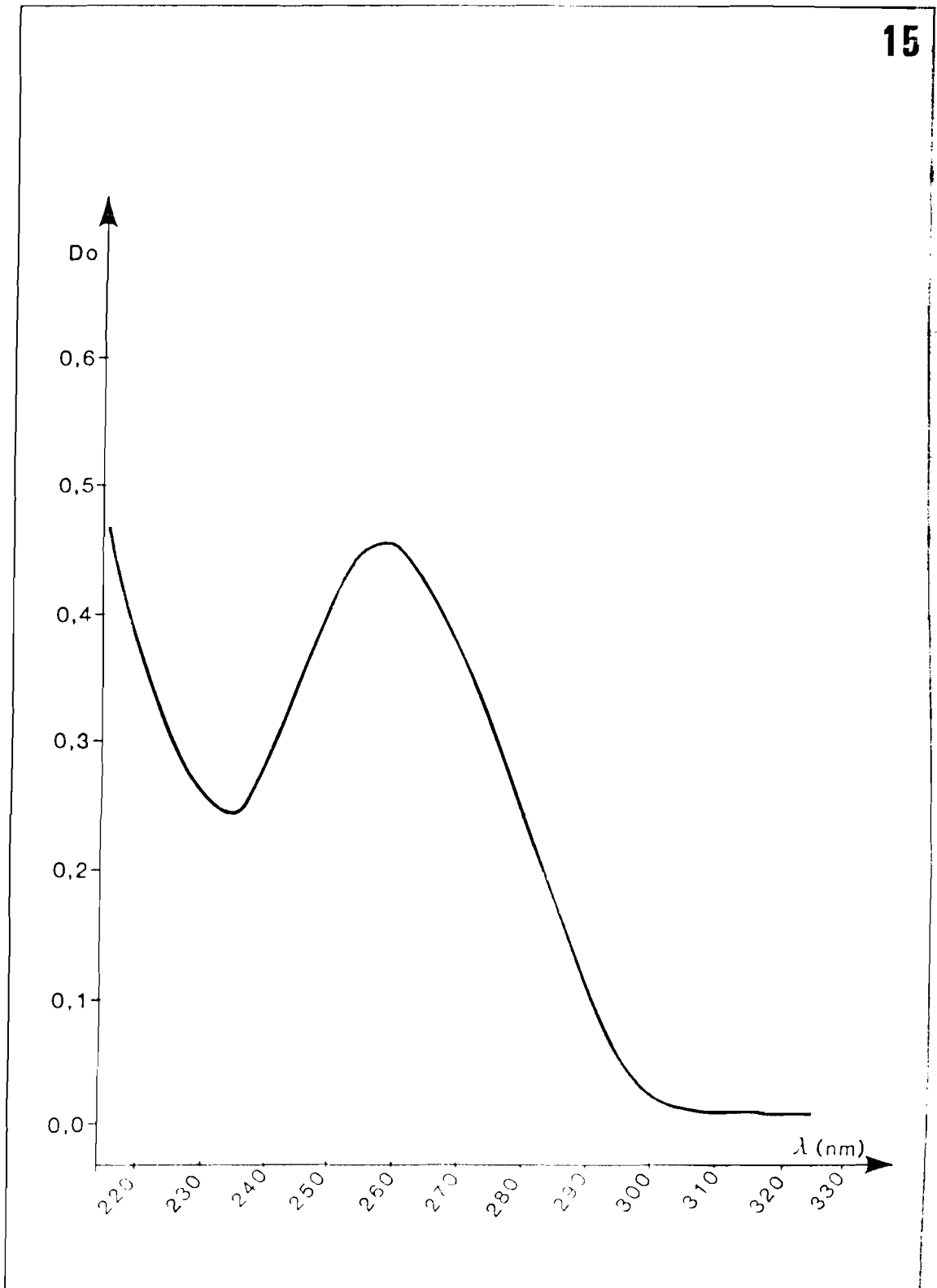
En effet, au niveau du calorimètre, un faible écart de force ionique entre le "circuit protéine" et le "circuit ligand" peut se traduire dans la cellule de mélange par une chaleur de dilution importante par rapport aux chaleurs expérimentales : il est donc indispensable que l'on solubilise les produits à étudier dans le même tampon que la DHFR, donc dans le tampon de dialyse.

La solution d'enzyme ainsi préparée peut se conserver plusieurs semaines à 4°C après filtration stérile sur Millex-G et constitue la solution mère utilisée pour des mesures de fluorescence et de microcalorimétrie.

La concentration en protéine a été déterminée spectrophotométriquement compte tenu d'un coefficient d'extinction moléculaire de $27280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à une longueur d'onde de 280 nm, et d'une masse moléculaire de 22500 daltons et nous avons vérifié que le résultat obtenu est en bon accord avec celui déterminé par la méthode classique d'Ellman.

La densité optique à 320 nm doit être inférieure à 0,01, prouvant l'absence d'acide dihydrofolique dans le milieu.

Le spectre d'absorption U.V. est représenté sur la figure n° 15.



SPECTRE D'ABSORPTION U.V. DE LA DIFR

MESURES DE MICROCALORIMETRIE

Méthodes

Compte tenu de la sensibilité du microcalorimètre, de la valeur des ΔH mesurées et de la concentration de DHFR utilisée (de l'ordre de $10^{-5} M$) il est pratiquement impossible de déterminer par microcalorimétrie des constantes d'équilibre de complexe binaire égales ou supérieures à $10^6 M^{-1}$.

Les mesures microcalorimétriques permettent par contre d'évaluer les ΔH , le nombre de sites de fixation par molécule de protéine (n) et lorsque deux molécules différentes de substrat se fixent de manière compétitive, le rapport de leurs constantes d'équilibre.

Evaluation de ΔH et de n

Les valeurs de ΔH et n sont obtenues à partir des quantités de chaleur mesurées pour des concentrations en substrat environ dix fois supérieures à celles de la protéine. Les chaleurs (Q_{mes}) exprimées en kJ/litre correspondront à la saturation de la protéine pour le substrat concerné.

En appelant P_t la concentration totale en protéine obtenue par la méthode d'Ellman, nous avons la relation $\Delta H = Q_{mes} / n P_t$. $\frac{Q_{sat}}{n}$

Pour calculer n nous mesurons la quantité de chaleur échangée lors de l'addition de substrat à une concentration en défaut de l'ordre de 0,2 par rapport à la concentration en protéine totale. Nous appellerons cette valeur $Q_{0,2}$.

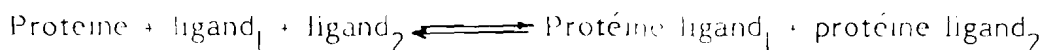
En considérant les valeurs de K (de l'ordre de $10^7 M^{-1}$) et la concentration en DHFR utilisée (de l'ordre de $10^{-5} M$), nous pouvons supposer que lorsque la DHFR est en excès par rapport au substrat la quantité de substrat libre sera toujours négligeable. Par conséquent

$$n = Q_{mes}/5 Q_{o,2}$$

La quantité de DHFR utilisée étant un facteur limitant nous n'avons pas pu mesurer, comme cela est préconisé, le flux thermique continu correspondant au mélange des médicaments et de la protéine. Nous avons donc injecté contre un flux continu de médicaments 1 cm³ de protéine. Cette méthode présente un inconvénient dès qu'il s'agit de mesurer une constante d'équilibre car bien que modéré, le phénomène de diffusion dans les tuyaux conduisant à la cellule de mélange modifie la concentration initiale de la solution de protéine. Dans le cas présent les valeurs de K sont tellement élevées par rapport à la concentration en protéine qu'il est logique d'admettre que les chaleurs mesurées ne seront pas affectées par ce phénomène de diffusion. Par conséquent, pour calculer Q_{mes} et Q_{o,2} exprimées en J litre⁻¹, il suffira de multiplier par 1000 les chaleurs expérimentalement mesurées qui sont dues à l'interaction de 1 ml de solution de DHFR.

Evaluation du rapport des constantes d'équilibre de deux substrats compétiteurs vis à vis d'une protéine

Soit l'équilibre de compétition conduisant à la formation de deux complexes binaires.



En appelant :

K₁ et K₂: les constantes d'équilibre relatives à la formation des deux complexes

L₁ et L₂: les concentrations totales en ligand₁ et 2

C₁ et C₂: les concentrations des complexes à l'équilibre

P_T et P: les concentrations en protéine totale et en protéine libre à l'équilibre

ΔH₁ et ΔH₂: les variations d'enthalpie relatives à la formation d'une mole de chaque complexe

Q (kJ. litre⁻¹): la chaleur échangée lors de la réaction correspondant à l'équilibre (1)

On peut écrire :

$$K_1 = \frac{C_1}{P_1 (L_1 - C_1)} \quad K_2 = \frac{C_2}{P_1 (L_2 - C_2)}$$

$$Q - C_1 \Delta H_1 = C_2 + \Delta H_2 \quad (1)$$

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{C_1 (L_2 - C_2)}{C_2 (L_1 - C_1)} \quad (2)$$

$$P_T = C_1 + C_2 + P_1 \quad (3)$$

Lorsque les ligands 1 et 2 sont en excès par rapport à la protéine et si K_1 et K_2 sont relativement élevés par rapport à $1/P_T$; P_1 est négligeable, et l'équation (3) devient :

$$P_T = C_1 + C_2 \quad (4)$$

A partir des relations (1), (2) et (4), on obtient :

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{(P_T - a) L_2 - a (P_T - a)}{a L_1 - a (P_T - a)}$$

avec $a = \frac{Q}{\Delta H_2 - \Delta H_1} \frac{P_T \Delta H_1}{\Delta H_2 - \Delta H_1}$

MESURES DE FLUORESCENCE

Principe

La fixation selon une réaction équilibrée obéissant à la loi d'action de masse de la Pyriméthamine sur la DHFR est caractérisée classiquement par une constante d'affinité K_a et un nombre de sites de liaison n de la protéine.

L'addition d'un ligand supplémentaire peut modifier cette constante d'association et ce nombre de sites.

Au cours de cette fixation la fluorescence de la protéine varie.

L'étude de cette variation permet de déterminer les paramètres de liaison aussi bien dans le cas de la formation de complexes binaires que lors de la formation de complexes ternaires.

Protocole expérimental

Toutes les mesures ont été effectuées à 10°C.

- Etude des complexes binaires

20 à 40 μ l de la solution mère de DHFR préparé par nos soins sont dilués dans 2 ml de solution tampon phosphate 0,1 M, pH = 6,8, μ = 0,154, ce qui constitue la solution de protéine. Ce pH correspond à celui choisi par KAUFMAN pour des essais de fluorescence effectués sur la DHFR de foie de poulet. D'autre part, il est proche du pH utilisé pour notre essai enzymatique.

En outre, on peut considérer dans ces conditions comme négligeables les variations de force ionique apportées par la solution enzymatique. De plus, les essais sont effectués rigoureusement dans les mêmes conditions, de façon à ne pas modifier la fluorescence mesurée par d'autres facteurs.

Nous avons procédé au contrôle préalable de la stabilité de l'enzyme pendant la durée d'une expérience dans nos conditions opératoires, tant du point de vue fluorimétrique que du point de vue activité enzymatique : nous n'avons jamais décelé de variation de ces deux paramètres.

Nous avons, dans un premier temps, tracé le spectre d'excitation non corrigé de l'enzyme (fig. 17) et déterminé le maximum d'excitation à 280 nm, valeur tout à fait classique pour les protéines comportant des résidus tryptophanes et tyrosine.

Nous avons d'autre part enregistré le spectre non corrigé d'émission de la DHFR (fig. 18) en l'absence et en présence du premier ligand. Ce spectre n'est pas modifié dans son allure générale et présente toujours un maximum à 320 nm. Les largeurs des fentes étaient de 10 nm à l'excitation et de 10 nm à l'émission. Cependant, la concentration de l'enzyme étant rigoureusement la même, nous avons noté une diminution de l'intensité de fluorescence en présence de ligand. Nous avons donc par la suite uniquement déterminé la hauteur du maximum à 330 nm plutôt qu'à 320 nm. En effet, à 320 nm l'effet Raman de diffusion avec changement de longueur d'onde aurait pu perturber nos mesures de fluorescence compte tenu de nos largeurs de fente (10 nm) puisqu'il apparaît sous forme d'un pic à 317 nm pour une excitation à 280 nm en milieu aqueux.

Enfin, il convient de s'assurer de l'absence de phénomène de self quenching pour la concentration de DHFR des essais. Dans une expérience annexe, nous avons donc vérifié que l'intensité de fluorescence à 330 nm est une fonction linéaire de la concentration en enzyme pour une gamme de dilution de notre solution de départ.

Les expériences permettent donc de déterminer :

- la fluorescence normalisée F_x de la solution de l'enzyme en présence d'une concentration $[Lx]$ variable de ligand,
- la fluorescence normalisée F_b correspondant à l'enzyme saturée en ligand,
- la fluorescence initiale normalisée $F_0 = F_b$ de l'enzyme en l'absence de ligand.

La quantité de DHFR dans le milieu est constante ; la seule variable est la concentration de ligand.

Les mesures toujours relatives comme l'impose la technique de fluorescence, et corrigées du bruit de fond mesuré en présence du tampon, ont été ensuite normalisées par rapport à la hauteur du maximum en l'absence du médicament et nous avons donc tracé la courbe de variation de l'intensité de fluorescence normalisée à 330 nm en fonction de la concentration molaire de ligand présent dans la cuve.

La solution de ligand est préparée dans du tampon phosphate 0,1 M ; pH = 6,8 et dosé spectrophotométriquement en tenant compte de l' ϵ 272 nm de la Pyriméthamine, déterminé au laboratoire et qui est de $5200 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Le spectre de la Pyriméthamine est représenté par la figure 16.

La solution stock de Pyriméthamine a une concentration moyenne $C = 5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$.

Des aliquotes de 1 à 60 μl sont additionnées séquentiellement dans la cuve et les mesures de fluorescence réalisées six minutes après chaque ajout pour atteindre une bonne stabilisation de la température du milieu.

Afin d'éviter le problème de dilution de l'enzyme au cours de la manipulation nous avons travaillé avec des solutions suffisamment concentrées de façon à ne pas avoir à en ajouter des quantités supérieures à 60 μl pour 2 cm^3 de milieu réactionnel. L'erreur de dilution est alors tout à fait négligeable.

La dernière addition effectuée correspond toujours à une concentration en ligand, dans la cuve, en large excès qui provoque pratiquement la saturation de l'enzyme et permet de déterminer la fluorescence résiduelle F_b correspondante.

Nous avons vérifié que toute addition ultérieure de PYR ne produisait plus de variation de fluorescence.

Nous avons d'autre part contrôlé que l'absorption du ligand aux concentrations finales atteintes est toujours négligeable. Ainsi, aucun effet de filtre interne ne pouvait entacher d'erreur nos mesures de fluorescence.

- Etude des complexes ternaires

Nous avons mis à profit l'inhibition de fluorescence de la protéine consécutive à l'addition de la Pyriméthamine au complexe protéine-cofacteur préalablement formé.

Ces essais antérieurs concernant la fixation de la DHFR sur le NADPH, molécule elle-même fluorescente, ne nous avaient pas conduit à des résultats exploitables.

Après avoir tracé le spectre d'émission non corrigé du NADPH qui présente un maximum à 430 nm pour une longueur d'onde d'excitation de 340 nm, nous avons enregistré les spectres correspondant à l'addition séquentielle de protéine en excitant à 230 nm de façon à mesurer éventuellement la fluorescence du NADPH.

Nous avons bien mis en évidence une exaltation de fluorescence résultant de cette fixation à 430 nm mais beaucoup trop faible pour être exploitée.

De plus, l'addition de PYR ne provoquait aucun effet supplémentaire.

Nous avons donc adopté le protocole expérimental suivant en ce qui concerne les complexes ternaires.

20-40 μ l de solution protéique sont dilués dans 2 cm³ de tampon.

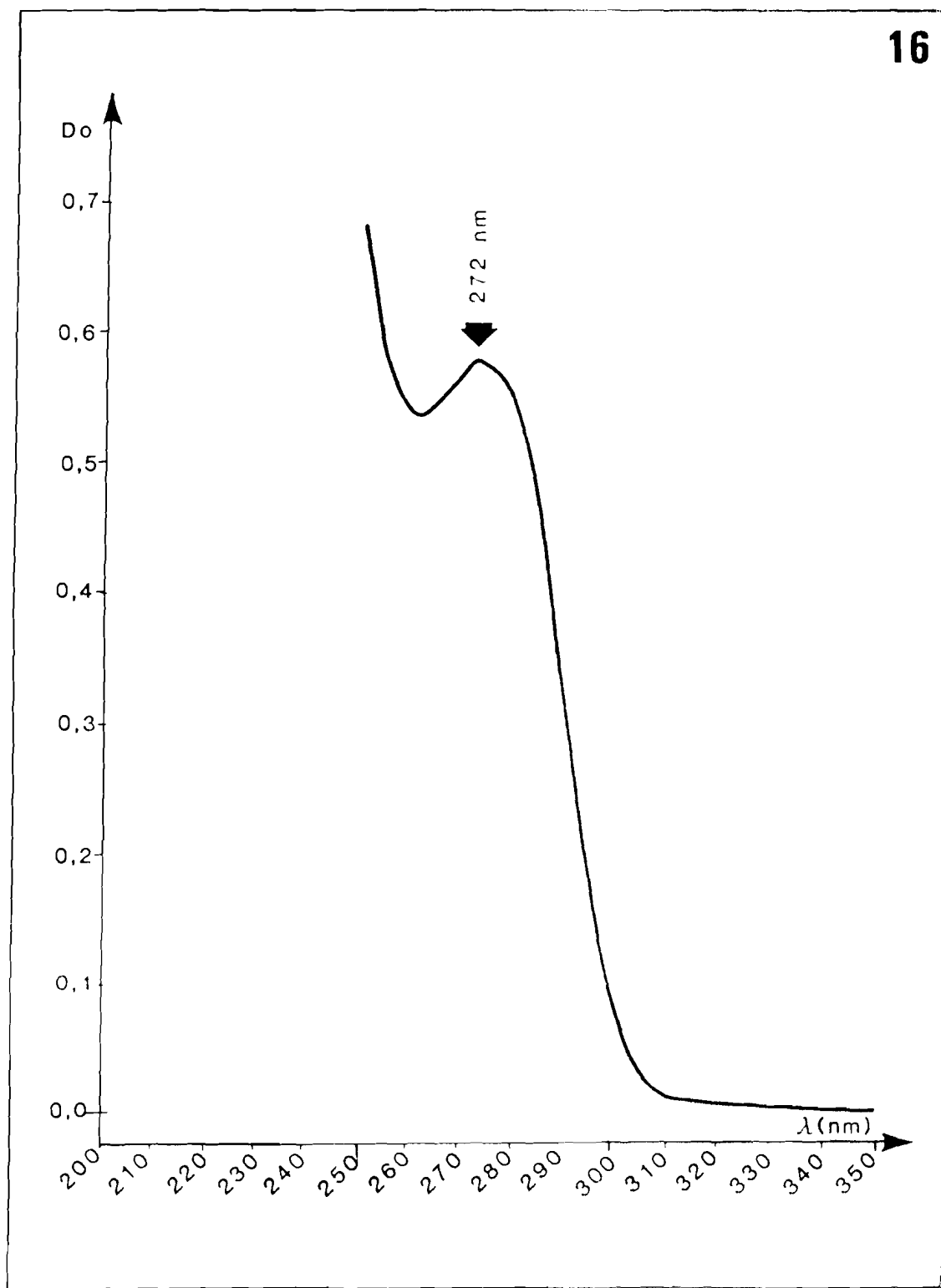
Le spectre d'émission de fluorescence non corrigé de

la protéine est alors enregistré pour une longueur d'onde d'excitation de 280 nm.

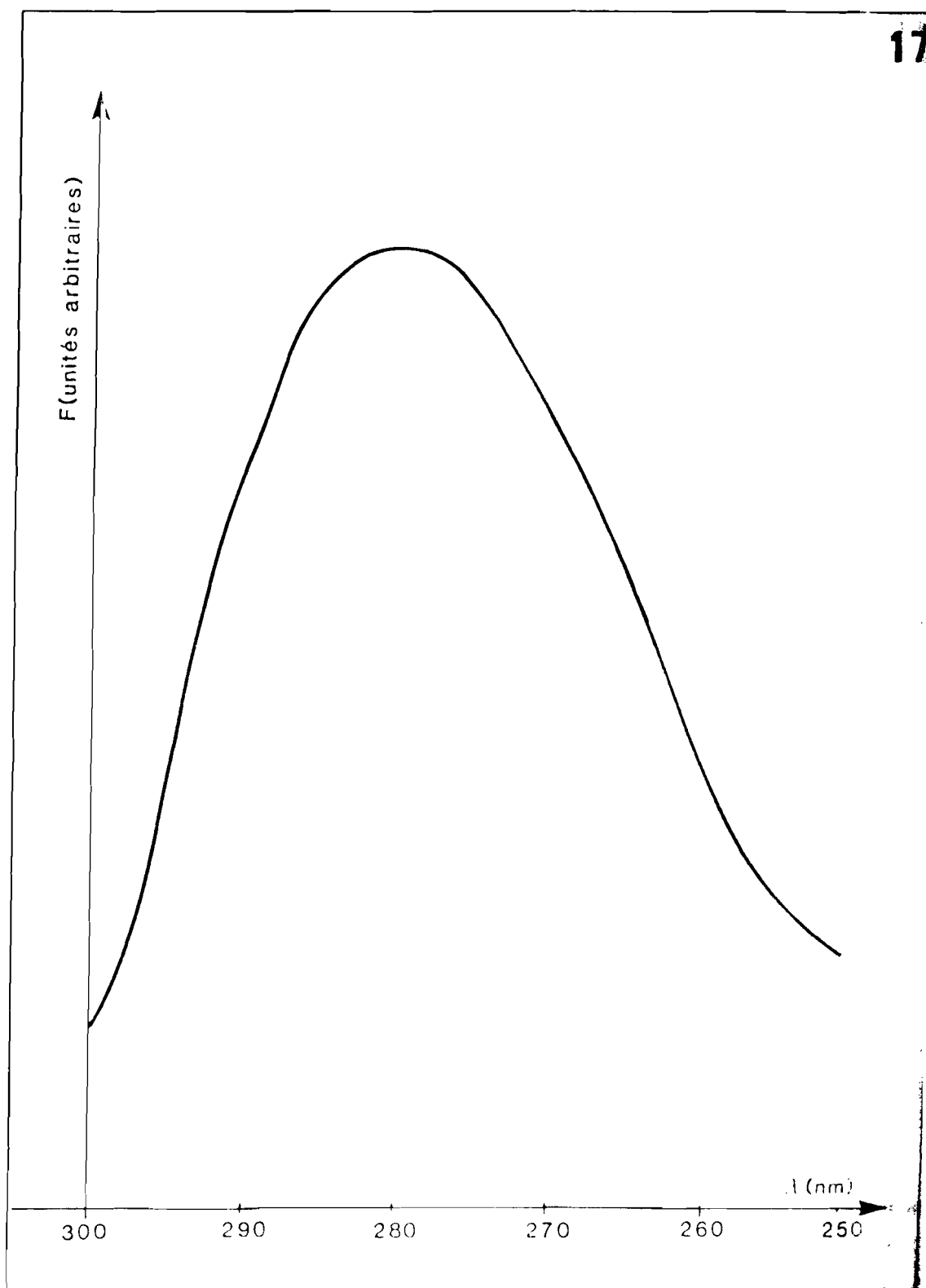
60 μ l d'une solution de NADPH de concentration à 10^{-4} M correspondant à un large excès du cofacteur par rapport à la concentration en protéine, sont alors introduits dans la cuve de mesure, entraînant une diminution de la fluorescence à 330 nm et la mesure ainsi obtenue représente la valeur par rapport à laquelle toutes les autres mesures seront normalisées.

Des aliquotes de 1 à 60 μ l de solution stock de PYR ($5 \cdot 10^{-7}$ M) sont additionnées séquentiellement dans la cuve et les mesures de fluorescence réalisées six minutes après chaque ajout.

16

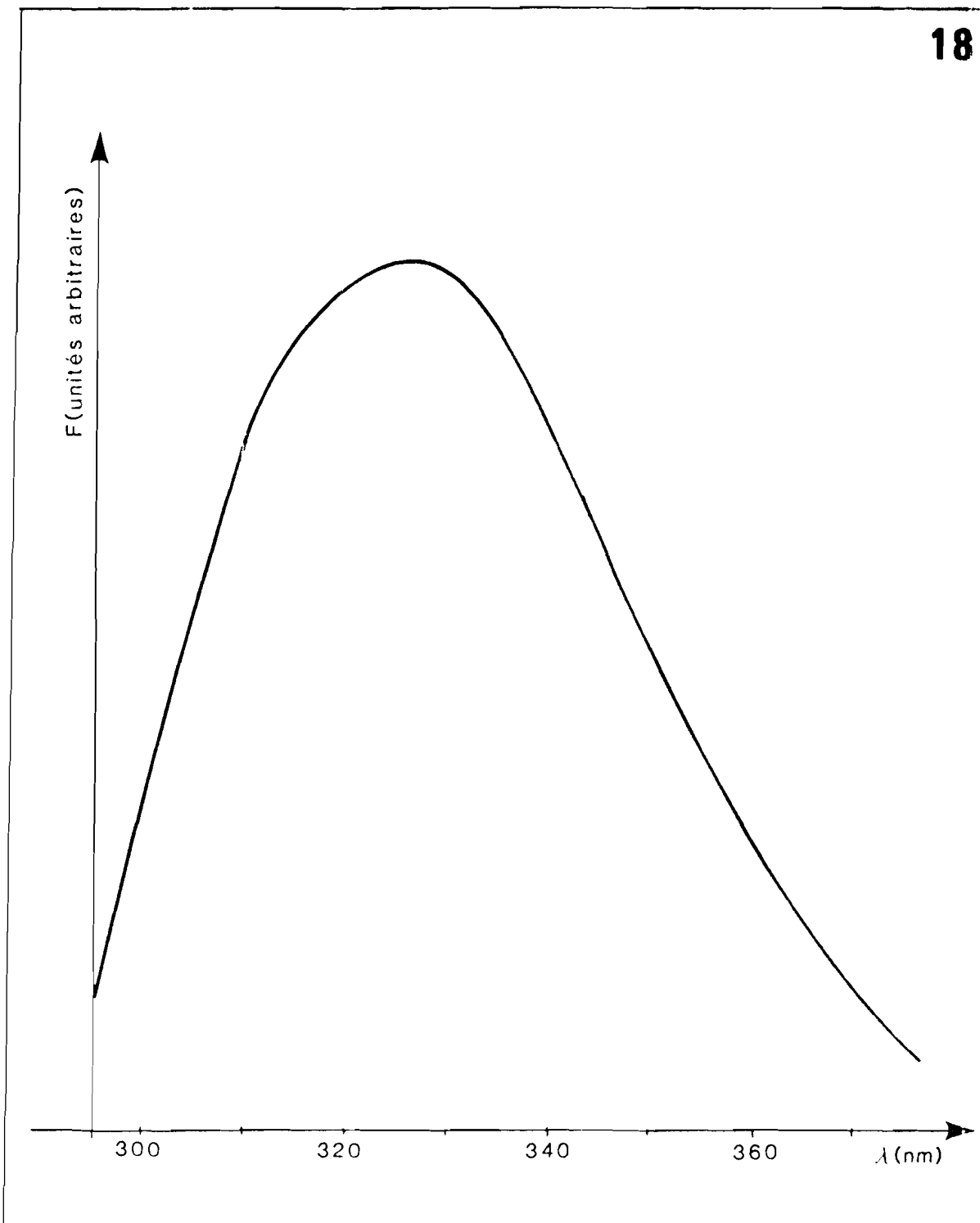


SPECTRE U.V. DE LA PYRIMETHAMINE



SPECTRE D'EXCITATION DE FLUORESCENCE
NON CORRIGÉ DE LA DHR

18



SPECTRE D'EMISSION DE FLUORESCENCE
NON CORRIGE DE LA DHFR

METHODES D'EXPLOITATION DES DONNEES EXPERIMENTALES

Dans le cas où la protéine présente une classe de sites à n sites de fixation équivalents par mole, la concentration molaire totale en sites $[S_T]$ du milieu s'exprime :

$$[S_T] = n [P_T] \text{ où } [P_T] \text{ représente la concentration en DHFR.}$$

L'inhibition de fluorescence mesurée quand tous les sites sont occupés est égale à $F_o - F_b$.

On peut alors définir un pouvoir moyen d'inhibition de fluorescence mesuré pour une concentration molaire unité de site occupées par le ligand :

$$Y = \frac{F_o - F_b}{N [P_T]}$$

Pour une concentration totale $[L_X]$ de ligand, l'inhibition de fluorescence mesurée ($F_o - F_x$) correspond à une concentration molaire $[SL]$ de sites occupés s'exprime :

$$F_o - F_x = Y [SL] = \frac{(F_o - F_b) [SL]}{N [P_T]}$$

On peut donc calculer à partir de mesures d'intensité de fluorescence la concentration molaire x de sites occupés par rapport à celle de sites totaux :

$$x = \frac{[SL]}{N [P_T]} = \frac{F_o - F_x}{F_o - F_b} \quad (1)$$

Or chacun de ces n sites supposés équivalents est caractérisé par une constante d'association K_a correspondant à l'équilibre :



avec $K_a = \frac{[SL]}{[S] \cdot [L]}$

où $[S]$ et $[L]$ représentent respectivement les concentrations en sites libres sur l'enzyme et en ligand libre dans le milieu.

$$\begin{aligned} \text{D'après la relation (1) } [SL] &= Xn [P_T] \text{ ou } [S] = [S_T] - [SL] \\ &= n [P_T] - Xn [P_T] \end{aligned}$$

$$\text{D'autre part : } [L] = [Lx] - [SL] = [Lx] - Xn [P_T]$$

Remplaçons [S] et [L] par leurs valeurs dans la relation(2)

$$K_a = \frac{Xn [P_T]}{n [P_T] (1 - x) [Lx] - Xn [P_T]}$$

soit en simplifiant par $n [P_T]$:

$$\frac{K_a}{X} = \frac{1}{(1 - x) ([Lx] - Xn [P_T])}$$

ou encore :

$$\frac{1}{1 - X} = \frac{K_a ([Lx] - Xn [P_T])}{X}$$

$$\frac{1}{1 - X} = K_a \frac{[Lx]}{X} - K_a n [P_T] \quad (3)$$

Ainsi dans le cas d'une classe à n sites équivalents, le graphe de la fraction $\frac{1}{1 - X} = f\left(\frac{[Lx]}{X}\right)$ est une droite de pente K_a dont l'ordonnée à l'origine permet de calculer $n [P_T]$, la concentration molaire en sites dans le milieu et par suite le nombre de sites n , connaissant la concentration $[P_T]$ de DHFR.

Dans un premier temps, nous avons tracé le graphe de la variation de la fluorescence normalisée en fonction de la concentration en ligand.

Sur la même figure, nous avons reporté le graphe théorique : résultat du traitement des données par une méthode itérative mise au point au laboratoire* qui nous permet de nous assurer de la validité de nos résultats.

(*) Nous remercions M. Marcel SARRAZIN pour la mise au point de cette méthode itérative

Cette méthode empruntée à ROSMOKY et KELLAN (63) a été adaptée à nos besoins.

Soit une grandeur mesurable directement proportionnelle à la concentration en sites complexés [SL]. Il s'agit dans notre cas du quenching de fluorescence normalisée $(F_0 - F_x) = Q$ pour la concentration Lx de Pyriméthamine additionné au milieu réactionnel. Nous avons vu que $Q_x = \frac{(F_0 - F_b) [SL]}{n [P_T]}$ appelons $Q_0 = F_0 - F_b$ le quenching maximum obtenu à saturation de la protéine, n représente toujours le nombre de site et $[P_T]$ la concentration totale invariable d'enzyme dans le milieu.

$$\text{Nous pouvons écrire : } Q_x = \frac{Q_0 [SL]}{n [P_T]} \quad (1)$$

$$\text{Posons d'autre part } A = [Lx] + n [P_T] + K(2)$$

$$K = \frac{1}{K_a} = \text{constante de dissociation des sites et}$$

$$B = \sqrt{A^2 - 4n [P_T] [Lx]} \quad (3)$$

$$\text{On en déduit finalement } [SL] = 1/2 (A - B) \quad (4)$$

Notre problème est de déterminer un jeu de paramètres Q , K et n pour lesquels les valeurs de Q_c calculées à partir de équations (1) (4) pour l'ensemble des points correspondants aux différentes concentrations $[Lx]$ se rapprochent le plus possible des valeurs Q_x expérimentales mesurées pour ces mêmes concentrations.

Ce qui s'exprime mathématiquement :

$$\frac{\partial}{\partial Q} \sum (q_x - q_c)^2 = 0 \quad (5) \text{ soit } \sum (q_x - q_c) \frac{\partial q_c}{\partial Q} = 0$$

$$\frac{\partial}{\partial K} \sum (q_x - q_c)^2 = 0 \quad \sum (q_x - q_c) \frac{\partial q_c}{\partial K} = 0$$

$$\frac{\partial}{\partial n} \sum (q_x - q_c)^2 = 0 \quad \sum (q_x - q_c) \frac{\partial q_c}{\partial n} = 0$$

Les expressions des trois dérivées partielles de q_c respectivement par rapport à Q , K et n se calculent aisément à partir des relations 1 - 4.

$$\left(\frac{\partial q_c}{\partial Q}\right)_{K, n} = \frac{[SL]}{n [P_T]}$$

$$\left(\frac{\partial q_c}{\partial K}\right)_{Q, n} = \frac{[SL] Q}{Bn [P_T]}$$

$$\left(\frac{\partial q_c}{\partial n}\right)_{Q, K} = \frac{Q}{n^2 B} \left[n [Lx] - [SL] (n + B) \right]$$

Cependant, il est possible, à partir d'un premier jeu de valeurs Q_1, K_1, n_1 choisi arbitrairement et donc différent du jeu optimal Q, K, n de calculer q_{c1} . Les valeurs q_c peuvent s'écrire sous la forme de développement en série de Taylor limités au premier ordre qui font intervenir les corrections $\Delta Q_1, \Delta K_1$ et Δn_1 à effectuer sur Q_1, K_1 et n_1 pour approcher des valeurs Q, K et n optimales, selon l'équation (7).

$$q_c = q_{c1} + \Delta Q_1 \left(\frac{\partial q_c}{\partial Q}\right) + \Delta K_1 \left(\frac{\partial q_c}{\partial K}\right) + \Delta n_1 \left(\frac{\partial q_c}{\partial n}\right)$$

en reportant cette expression dans les égalités (5) il vient

$$\sum (q_x - q_c) \frac{\partial q_c}{\partial Q} = \sum \left(q_x - q_c - \Delta Q_1 \left(\frac{\partial q_c}{\partial Q}\right) - \Delta K_1 \left(\frac{\partial q_c}{\partial K}\right) - \left(\Delta n \frac{\partial q_c}{\partial n}\right) \right) \left(\frac{\partial q_c}{\partial Q}\right) = 0$$

d'où de même (8)

$$\begin{cases} \sum (q_x - q_{c1}) \left(\frac{\partial q_c}{\partial Q}\right) = \Delta Q_1 \left(\frac{\partial q_c}{\partial Q}\right)^2 + \Delta K_1 \left(\frac{\partial q_c}{\partial K}\right) \left(\frac{\partial q_c}{\partial Q}\right) + \Delta n \left(\frac{\partial q_c}{\partial n}\right) \left(\frac{\partial q_c}{\partial Q}\right) \\ \sum (q_x - q_{c1}) \left(\frac{\partial q_c}{\partial K}\right) = \Delta Q_1 \left(\frac{\partial q_c}{\partial K}\right) \left(\frac{\partial q_c}{\partial Q}\right) + \Delta K_1 \left(\frac{\partial q_c}{\partial K}\right)^2 + \Delta n_1 \left(\frac{\partial q_c}{\partial K}\right) \left(\frac{\partial q_c}{\partial n}\right) \\ \sum (q_x - q_{c1}) \left(\frac{\partial q_c}{\partial n}\right) = \Delta Q_1 \left(\frac{\partial q_c}{\partial n}\right) \left(\frac{\partial q_c}{\partial Q}\right) + \Delta K_1 \left(\frac{\partial q_c}{\partial K}\right) \left(\frac{\partial q_c}{\partial Q}\right) + \Delta n_1 \left(\frac{\partial q_c}{\partial n}\right)^2 \end{cases}$$

La solution des équations (8) conduit aux valeurs $\Delta Q_1, \Delta K_1$ et Δn_1 , à partir desquelles on détermine le nouveau jeu de paramètres:

$$Q_2 = Q_1 + \Delta Q_1$$

$$K_2 = K_1 + \Delta K_1$$

$$n_2 = n_1 + \Delta n_1$$

Le calcul est réitéré pour ce nouveau jeu de paramètres et se poursuit jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de variation respectivement entre les valeurs Q_{i-1} , K_{i-1} , n_{i-1} et Q_i , K_i , n_i .

Sur le plan pratique nous imposerons comme condition limite:

$$\frac{\Delta Q_i}{Q_i} < 10^{-6}, \quad \frac{\Delta K_i}{K_i} < 10^{-6}, \quad \text{et} \quad \frac{\Delta n_i}{n_i} < 10^{-6}$$

Alors $Q = Q_i$, $K = K_i$ et $n = n_i$.

Les calculs ont été effectués sur un microordinateur Apple II.

L'organigramme est représenté sur la figure de la page suivante.

Sur nos courbes, les points théoriques se distribuent pratiquement de la même façon que les points expérimentaux.

Nous avons d'autre part tracé le graphe des fonctions

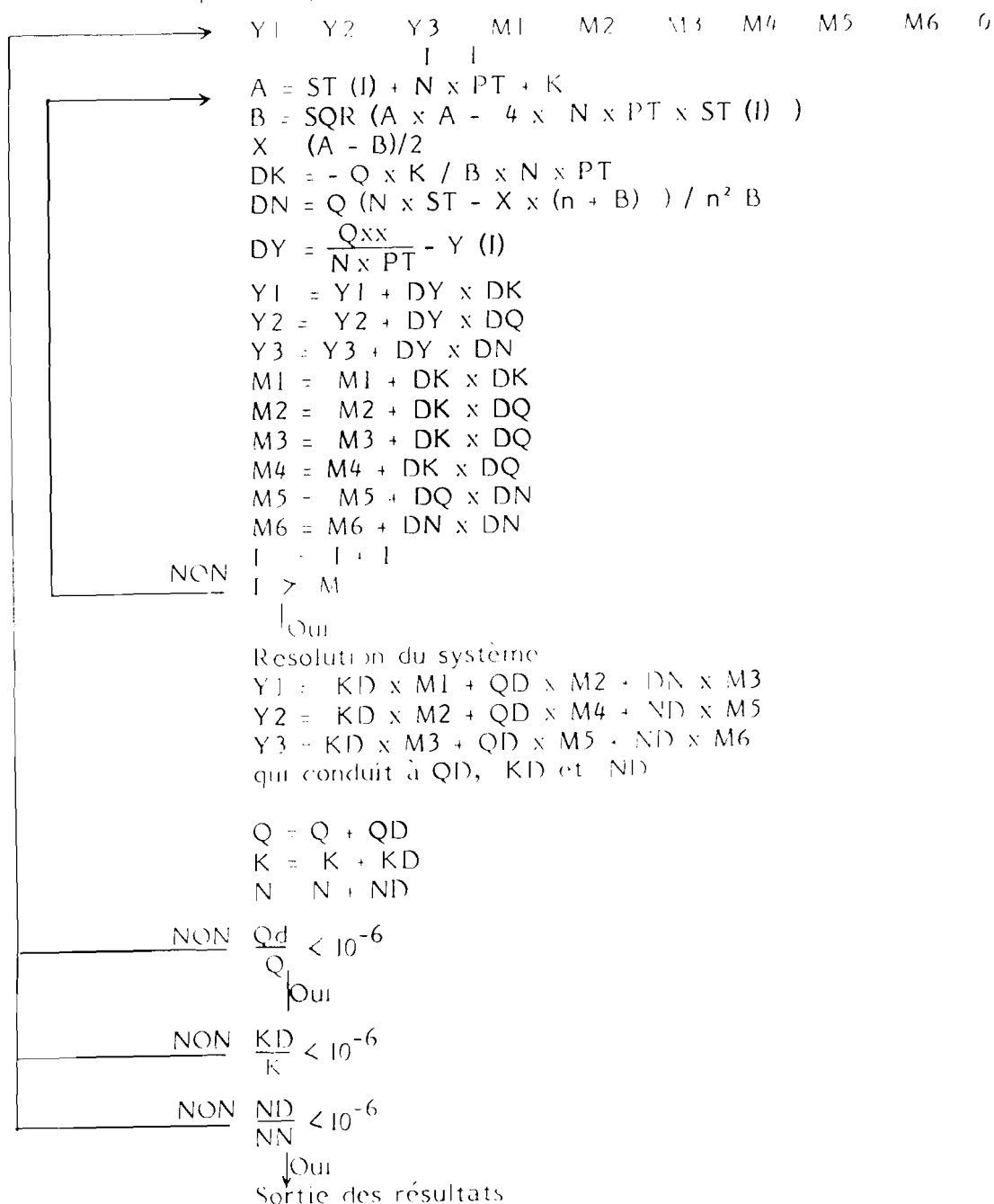
$$\frac{1}{1-X} = f\left(\frac{LX}{X}\right)$$

Une régression linéaire nous a permis d'en déduire K et n .

ORGANIGRAMME DU PROGRAMME DE CALCUL

Entrées de $N =$ nombre de points
 $PT = [P_T]$
 $Y(I) = (q_x) I$
 $ST(I) = [L_x] I$

Entrée du premier jeu de paramètres Q, K, N



3° RESULTATS

RESULTATS DE QUELQUES PREPARATIONS D'ENZYMES

Les résultats sont représentés dans les tableaux 14, 15, 16, 17.

Les figures n° 19, 20, 21, 22 représentent les profils d'éluion des préparations enzymatiques.

TABLEAU n° 14 - Préparation n° 1

Etapes de purification	Volume (ml)	Activité enzymatique U/ml	Activité totale (U de DHFR)	Activité spécifique U/mg
Colonne d'affinité	98	10,40	1019	-
G 75	75	12,45	934	-
Hydroxylapatite (fraction B)	29	10,7	310	16,4

TABLEAU n° 15 - Préparation n° 2

Etapes de purification	Volume (ml)	Activité enzymatique U/ml	Activité totale (U de DHFR)	Activité spécifique U/mg
Colonne d'affinité	-	-	-	-
G 75	59	14,5	850	-
Hydroxylapatite (fraction B)	30	18,4	552	19
Après DLM et concentrations	-	-	-	12

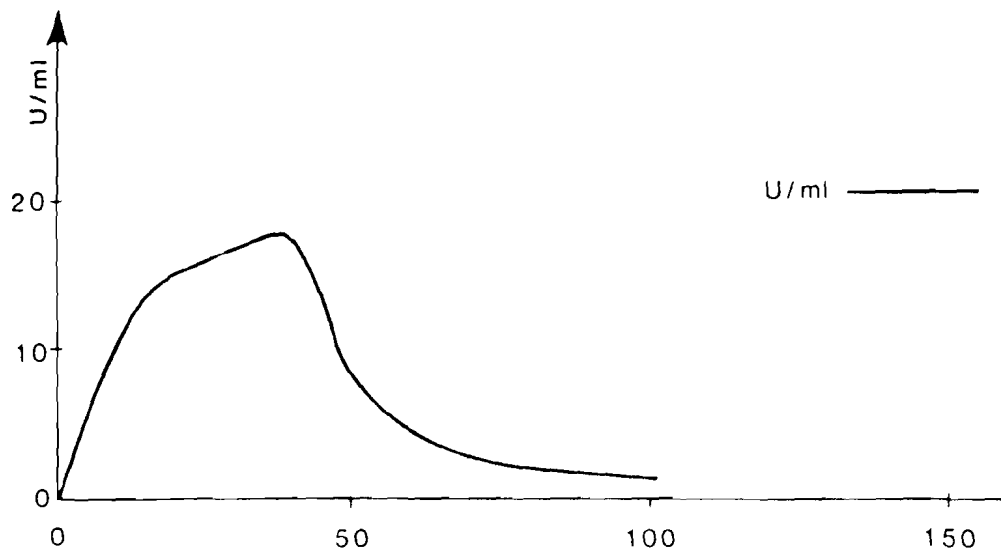
TABLEAU n° 16 - Préparation n° 3

Etapes de purification	Volume ml	Activité enzymatique U/ml	Activité totale U de DHFR	Activité spécifique U/mg
Colonne d'affinité	64	7	448	
G 75	80	5	400	
Hydroxylapatite	40	6,1	244	16,9
Après concentration et D.E.A.E.	-	9,9	-	13

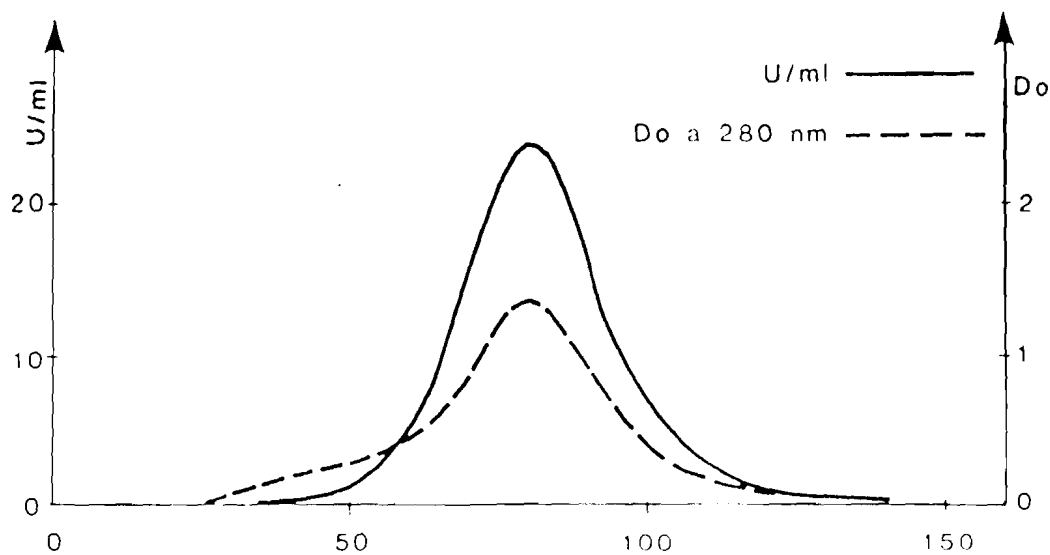
TABLEAU n° 17 - Préparation n° 4

Etapes de purification	Volume ml	Activité enzymatique U/ml	Activité totale U de DHFR	Activité spécifique U/mg
Colonne d'affinité	90	9	810	
G 75	-	-	-	
Hydroxylapatite	38	12	460	
Après D.E.A.E.	35	9	315	15,2

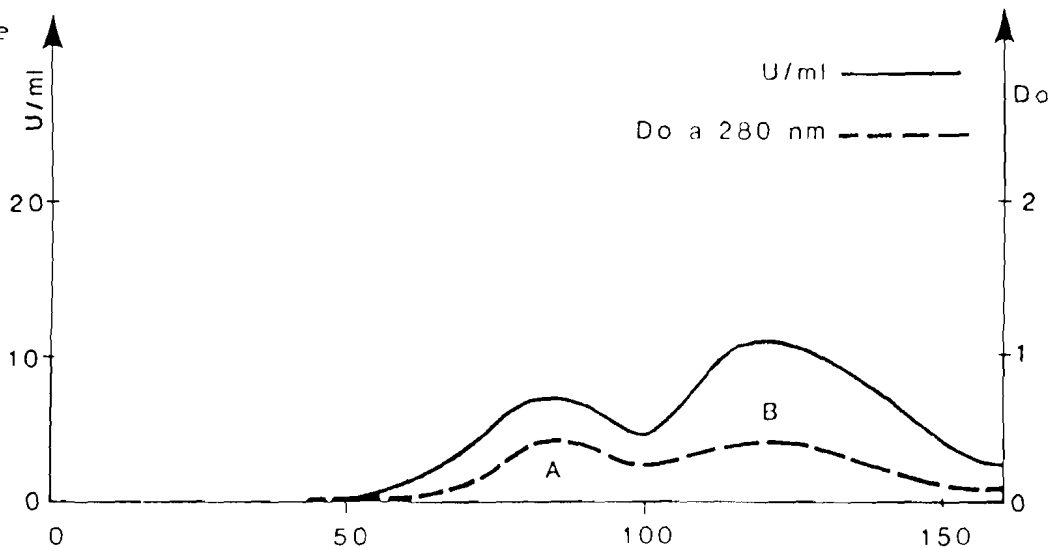
Colonne d'affinité



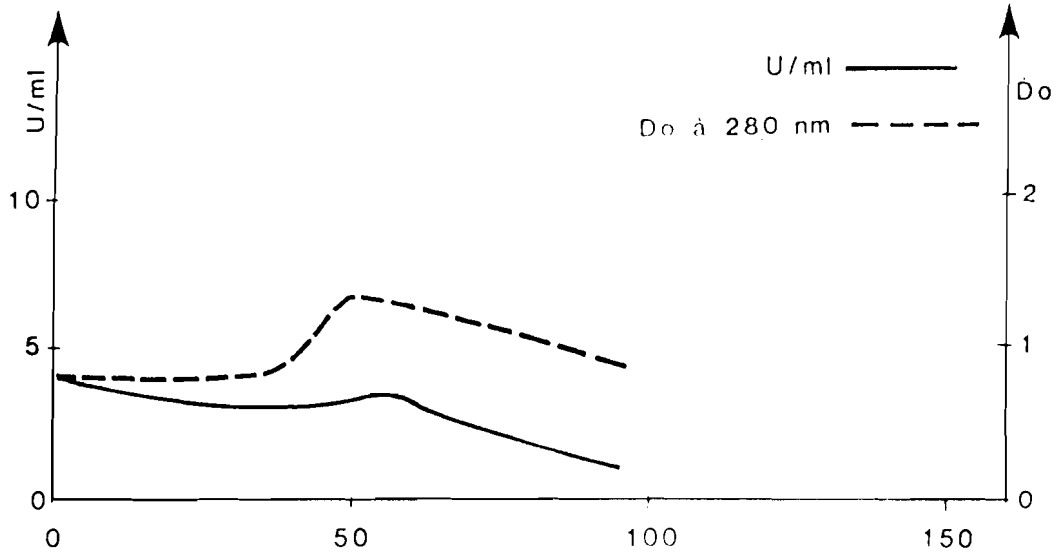
G 75



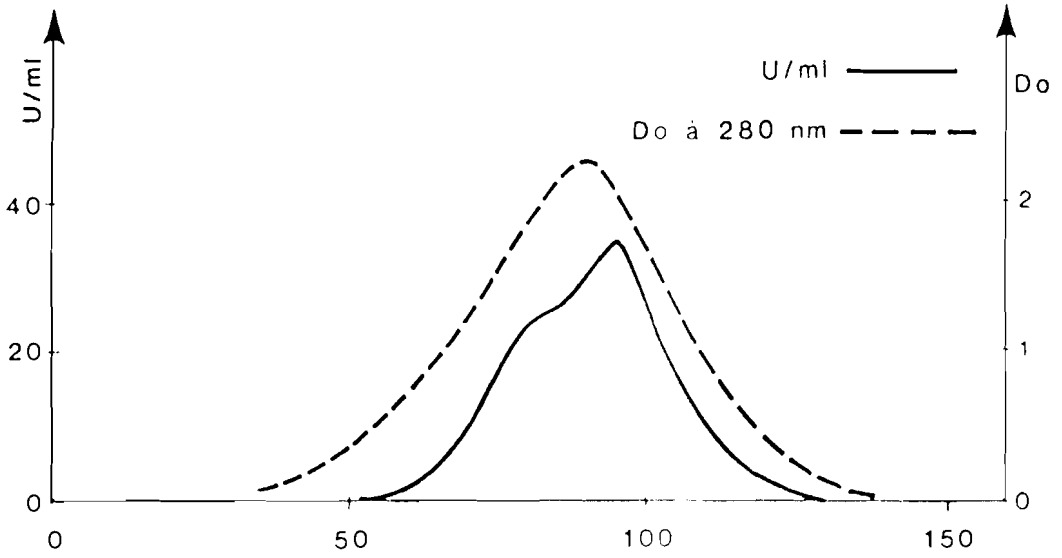
OH Apatite



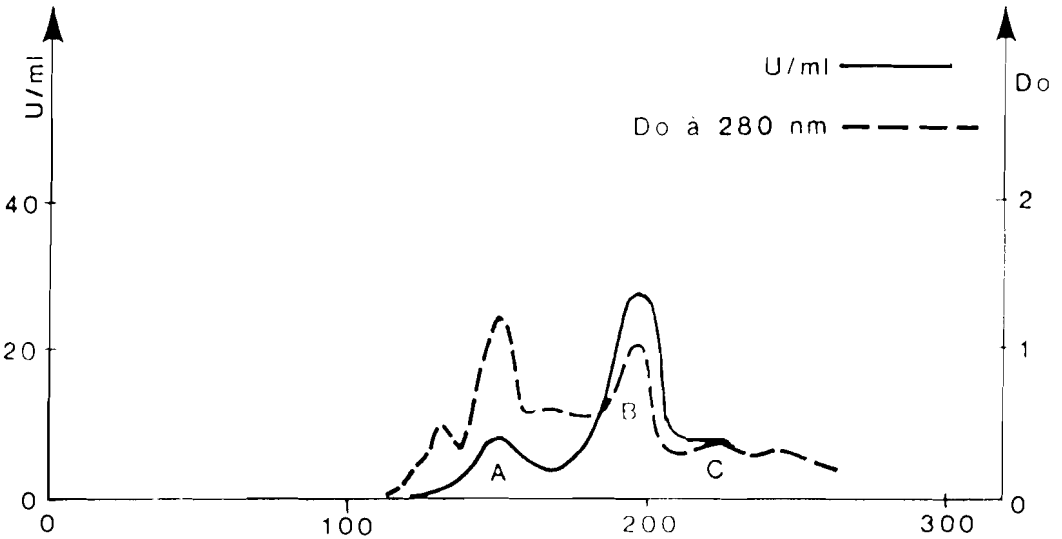
PROFILS D'ELUTION DE LA PREPARATION N° 1



G 75

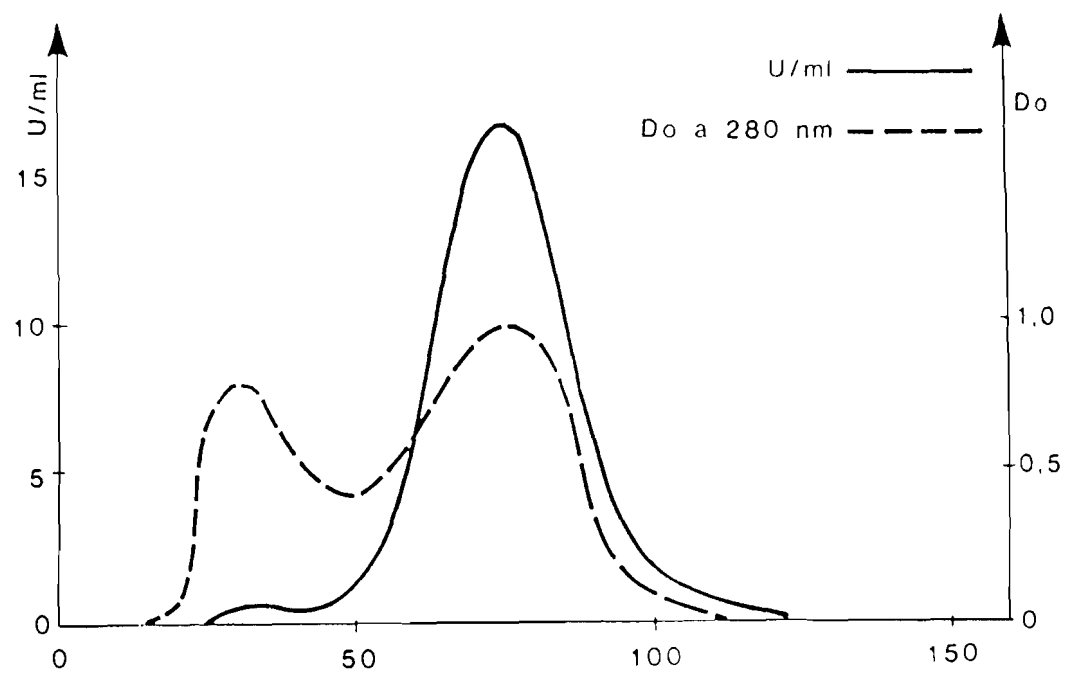


OH Apatite

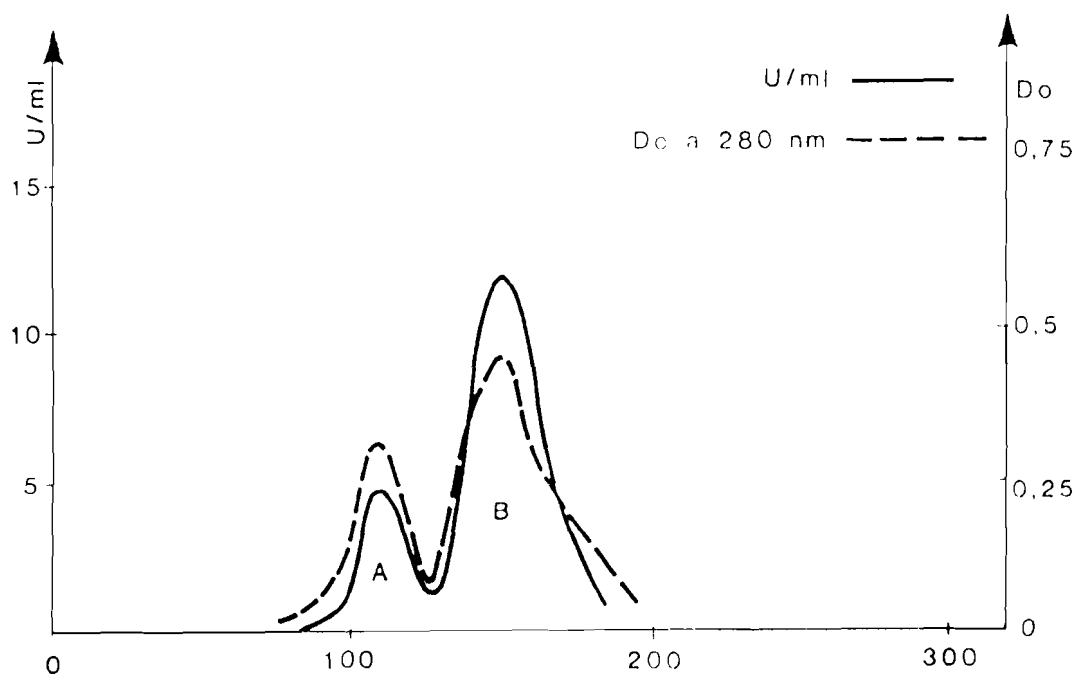


PROFILS D'ELUTION DE LA PREPARATION N° 2

G 75

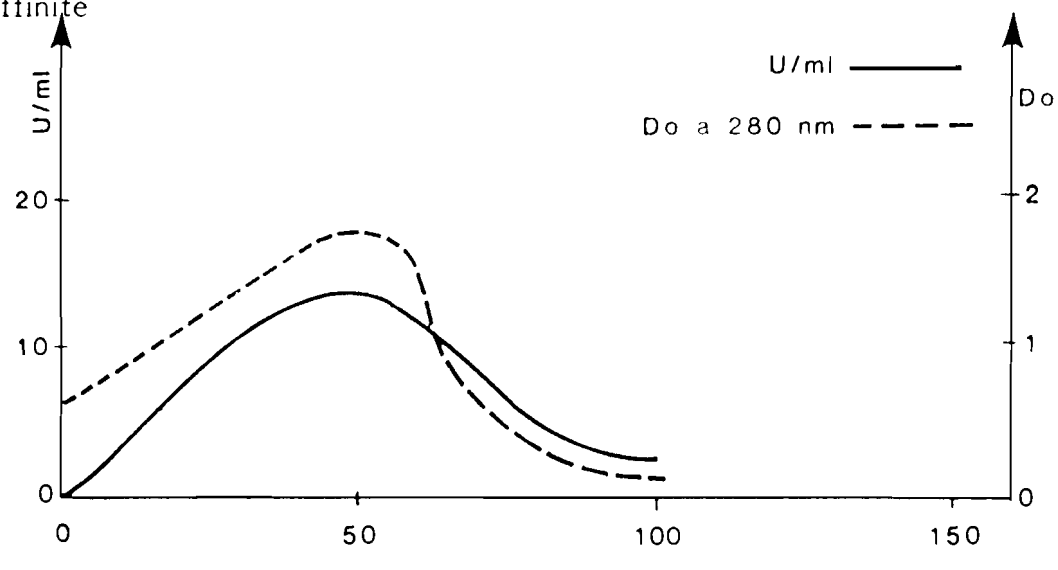


OH Apatite

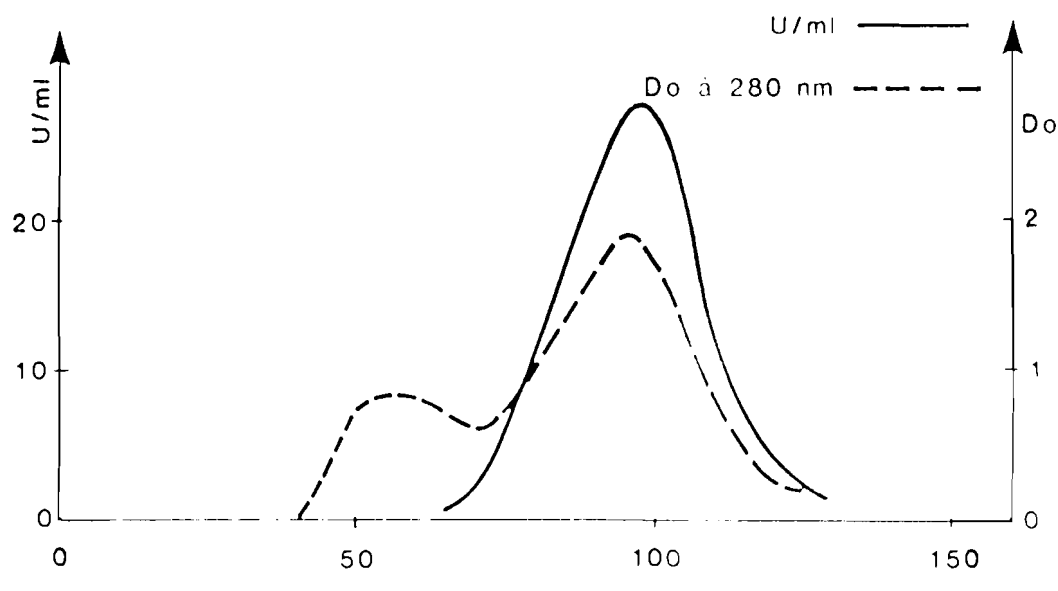


PROFILS D'ELUTION DE LA PREPARATION N° 3

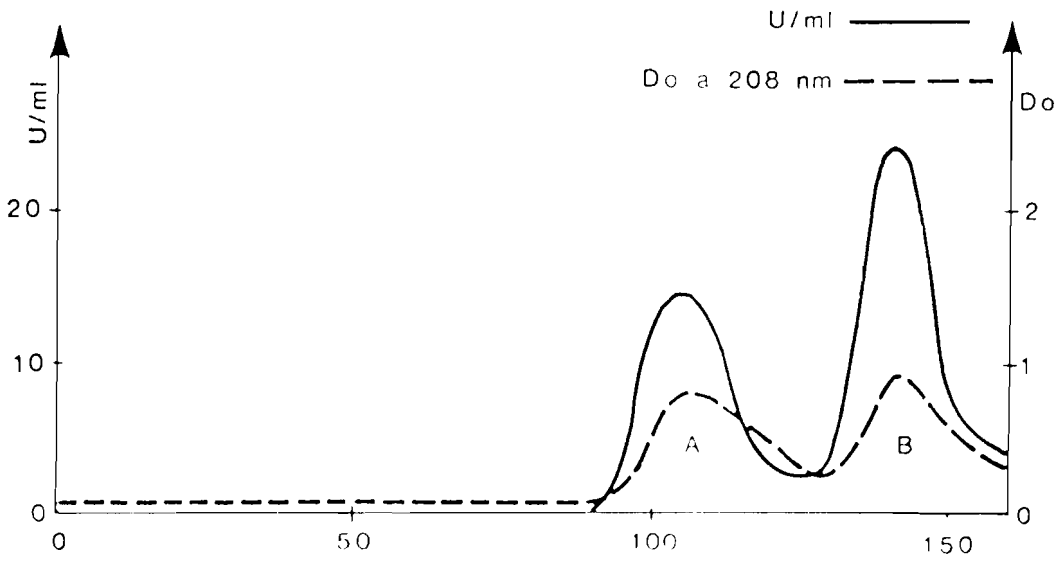
Colonne d'affinité



G 75



OH Apatite



PROFILS D'ELUTION DE LA PREPARATION N° 4

RESULTATS OBTENUS EN MICROCALORIMETRIE

Toutes les expériences ont été réalisées à une température de 10°C. Les différentes chaleurs de dilution ont été prises en considération pour les calculs des Q_{sat} et ΔH .

Systèmes binaires

a. Interaction PYR-DHFR

L'activité spécifique varie suivant les préparations. La concentration de DHFR est de l'ordre de 10^{-5} M. Les résultats sont rassemblés dans le tableau n° 18.

On peut constater que la valeur de ΔH est constante ($- 35,2 \pm 3$ kJ. site⁻¹) alors que le nombre de sites de fixation varie en fonction de la préparation et en fonction de la période déparant la préparation et l'utilisation de l'enzyme.

TABLEAU n° 18 - Interaction PYR - DHFR

N° de préparations	Concentration DHFR (M)	Activité spécifique (U/mg)	Qsat (kJM ⁻¹) calculé pour l'excès de PYR	n	H kJ site ⁻¹
1	2,75 10 ⁻⁵ M	16,6	- 10,6	0,31	-34,2
2	3,16 10 ⁻⁵ M	12	- 10,6	0,29	- 36,2
3	3,45 10 ⁻⁵ M	13	- 9	0,29	- 31
4	2,65 10 ⁻⁵ M	15,2	- 17,7	0,47	-37,7
5	1,92 10 ⁻⁵ M	16,7	-12,3	0,31	- 39

b. Interaction MTX - DHFR

L'enzyme a une concentration moyenne de 10⁻⁵M.

Le MTX est en large excès par rapport a la protéine (excès de 3,5).

La chaleur de saturation que nous avons mesurée est de - 32,83 kJ M⁻¹.

c. Compétition MTX -PYR

La concentration de la DHFR est de 2,65 10⁻⁵ M ; pour une activité spécifique de 15 U/mg. La concentration de PYR est en excès de 6,2 par rapport à la protéine (soit 1,1 10⁻⁴M). Le MTX est en excès de 3,2 par rapport à la protéine.

- Dans un premier temps, nous avons étudié l'interaction DHFR/PYR excès. La chaleur de saturation mesurée est de - 17,75 kJ M⁻¹.

- Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'interaction de la PYR (en excès) sur le complexe binaire DHFR + MTX (excès). Nous avons une réaction endothermique. La chaleur de saturation mesurée est de + 3,67 kJ M⁻¹. Cette chaleur correspond d'une part a la chaleur de déplacement d'une partie du MTX lié à l'enzyme par la PYR (donc endothermique) et d'autre part à la chaleur de fixation de la PYR (exothermique). Il y a donc effectivement compétition entre le MTX et la PYR pour leur liaison à la DHFR : en effet, s'il n'y avait pas compétition, nous aurions dû retrouver dans cette dernière expérience la chaleur exothermique de la PYR en système binaire.

d. Compétition DHF - PYR

La concentration de la DHFR est de $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ pour une activité spécifique de 12 U/mg. Pour étudier cette compétition nous avons opéré de la manière suivante :

- Nous avons mesuré l'interaction DHFR/PYR en excès de 13. La chaleur de saturation mesurée est de $- 26,5 \text{ kJ M}^{-1}$.

- Nous avons mesuré l'interaction DHFR + PYR défaut de 0,39/DHF excès de 4,4. Ce défaut de 0,39 correspond en fait à un léger excès de DHFR car $n = 0,29$.
La chaleur mesurée est de $- 16 \text{ kJ M}^{-1}$.

- Enfin, nous avons mesuré l'interaction DHFR + DHF excès de 1,4/PYR défaut de 0,259. Cette réaction est légèrement endothermique : nous pouvons donc dire qu'il y a compétition entre la PYR et le DHF pour leur liaison à la DHFR.

Systemes ternaires

a. Interaction NADPH - DHFR

L'activité spécifique de la DHFR est de 13,2 U/mg et sa concentration de $2,65 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

- Le NADPH est en excès de 5,2 par rapport à la protéine. La chaleur de saturation mesurée est de $- 3,48 \text{ kJ M}^{-1}$.

- Le NADPH est en défaut de 0,26 par rapport à la protéine. La chaleur mesurée est de $- 2,19 \text{ kJ M}^{-1}$.

b. Interaction PYR/DHFR+ NADPH

Nous avons manipulé dans les mêmes conditions que précédemment. Dans tous les cas le NADPH est en excès de 5 par rapport à la DHFR. La PYR est respectivement en excès de 6,2 et en défaut de 0,253

par rapport à la DHFR. La chaleur de saturation mesurée est de $-22,83 \text{ kJM}^{-1}$ dans le premier cas, et de $9,8 \text{ kJM}^{-1}$ dans le deuxième cas. Le nombre de sites de la PYR est donc dans ce cas égal à 0,59.

c. Interaction NADPH/DHFR + PYR

La PYR est en excès de 6,2 par rapport à la DHFR. Le NADPH est en excès de 7,8 par rapport à la DHFR. La chaleur de saturation mesurée est de $10,67 \text{ JM}^{-1}$. Le nombre de site ne peut être mesuré pour des raisons que nous évoquerons ultérieurement.

Ces études d'interactions ont été faites avec la même préparation d'enzyme.

Le complexe ternaire peut être obtenu par deux voies différentes. En appelant P la protéine, on peut écrire :

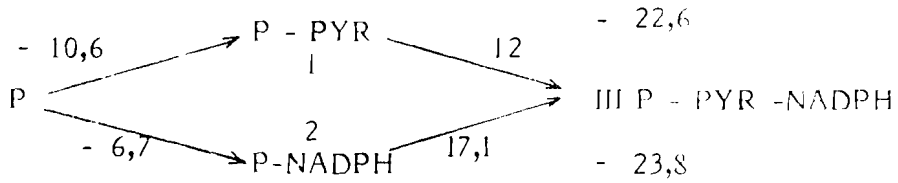
- voie 1 : $P + \text{PYR} \rightarrow P\text{-PYR} + \text{NADPH} \rightarrow P\text{-PYR} - \text{NADPH}$
- voie 2 : $P + \text{NADPH} \rightarrow P\text{-NADPH} + \text{PYR} \rightarrow P\text{-PYR} - \text{NADPH}$

Il est intéressant de comparer la somme des Q_{sat} obtenue pour chacune des voies pour deux préparations différentes (figure 23).

Enfin, nous pouvons résumer nos résultats dans le tableau n° 19.

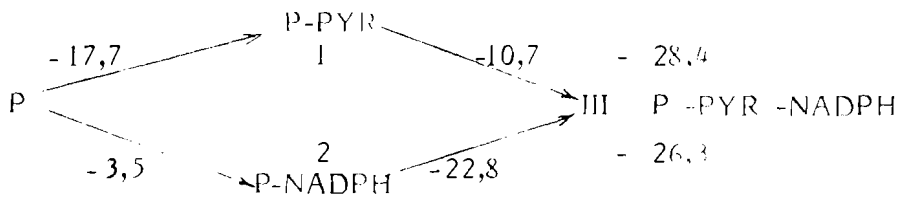
PREPARATIONS	II	III	IV
Activité spécifique (UI/mg)	12	13	15
[DHFR] x 10 ⁵ M	3,16	3,45	2,65
n binaire	0,29	0,29	0,47
$\Delta H = Q_{\text{sat}}/n \text{ binaire kJ.site}^{-1}$	-36,6	-31	- 37,7
n ternaire	0,36	0,36	0,59
$Q_{\text{sat ternaire kJM}^{-1}}$	- 17,1	-15	- 22,8
$\Delta H = Q_{\text{sat}}/n \text{ ternaire kJ.site}^{-1}$	- 47,5	42,7	- 38,6

Tableau n° 19 - Résumé des résultats de microcalorimétrie

Préparation n° 2

$$1. -10,6 - 12 = -22,6 \text{ kJM}^{-1}$$

$$2. -6,7 - 17,1 = -23,8 \text{ kJM}^{-1}$$

Préparation n° 4

$$1. -17,7 - 10,7 = -28,4 \text{ kJM}^{-1}$$

$$2. -3,5 - 22,8 = -26,3 \text{ kJM}^{-1}$$

Figure 23 - OBTENTION DU COMPLEXE TERNAIRE

RESULTATS OBTENUS EN FLUORESCENCE

Systèmes binaires

a. Interactions PYR-DHFR

Nous avons manipulé sur l'enzyme dialysée et non dialysée:

- Enzyme non dialysée

Pour chaque manipulation nous avons calculé K_a et le nombre de sites n conformément aux deux méthodes d'exploitation des données précitées. Nous avons porté les points expérimentaux représentant la fluorescence normalisée du milieu en fonction de la concentration molaire du ligand ajouté (figures 24, 25, 27, 28, 30, 31).

Nous avons tracé le graphe des variations de $\frac{1}{1-x}$ en fonction de $\frac{[Lx]}{x}$ (figures 26, 29).

Sur les figures n° 24, 25, 27, 28, 30, 31, sont tracés les graphes théoriques en fonction des concentrations $[Lx]$ choisies arbitrairement de la fluorescence normalisée calculée avec des paramètres K_a , n , l'b du tableau pour la même concentration d'enzyme.

Les points expérimentaux se disposent de façon tout à fait satisfaisante par rapport à ces valeurs théoriques.

Les valeurs numériques déduites du traitement des données expérimentales sont rapportées sur le tableau n° 20.

- Enzyme dialysée

Les figures n° 32, 33, 35, 36, 37, 38 représentent la fluorescence normalisée du milieu en fonction de la concentration molaire du ligand ajouté ; tandis que la figure n° 34 représente le graphe des variations de $\frac{1}{1-X}$ en fonction de $\frac{[LX]}{X}$. Les valeurs numériques du traitement des données sont représentées dans le tableau n° 21.

Si on compare les paramètres déterminés sur DHFR dialysée ou non dialysée les résultats correspondant à la DHFR non dialysée semblent plus reproductibles. Cependant, les mesures en microcalorimétrie étant obligatoirement effectuées sur l'enzyme dialysée, nous avons effectué les expériences en complexe ternaire sur les deux catégories d'enzyme. D'autre part, les paramètres de fixation évoluent en fonction du temps qui s'écoule à partir de l'étape finale de purification. Nous nous sommes donc intéressés à cette évolution en fonction du temps.

Evolution dans le temps

On peut suivre l'évolution dans le temps des paramètres de fixation dans le complexe binaire PYR-DHFR sur le tableau n° 21 où sont également indiquées les activités spécifiques de nos préparations enzymatiques.

Apparemment, alors que l'activité spécifique de l'enzyme ne varie pas ou peu, le nombre de sites par contre diminue. Pour la valeur de K_a , en raison de l'incertitude sur ce paramètre, on ne peut affirmer qu'elle varie de façon significative.

DATES DE MANIPULATIONS		7.11.1983	29.11.1983	26.03.1984
[DHFR] (M)		$1,06 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$6,6 \cdot 10^{-7}$
[PYR] (M)		$5,2 \cdot 10^{-6}$	$4,67 \cdot 10^{-5}$	$1,92 \cdot 10^{-4}$
As (UI/mg)		11,6	18	20,6
Ka (M^{-1})	1	$1,0 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$
	2	$1,0 \cdot 10^7$	$1,08 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$
n	1	0,31	0,21	0,31
	2	0,37	0,24	0,31
Fb	1	0,42	0,43	0,47
	2	0,42	0,40	0,47

Tableau n° 20 - Paramètres de fixation déterminés par fluorescence.

Complexe binaire PYR-FHFR

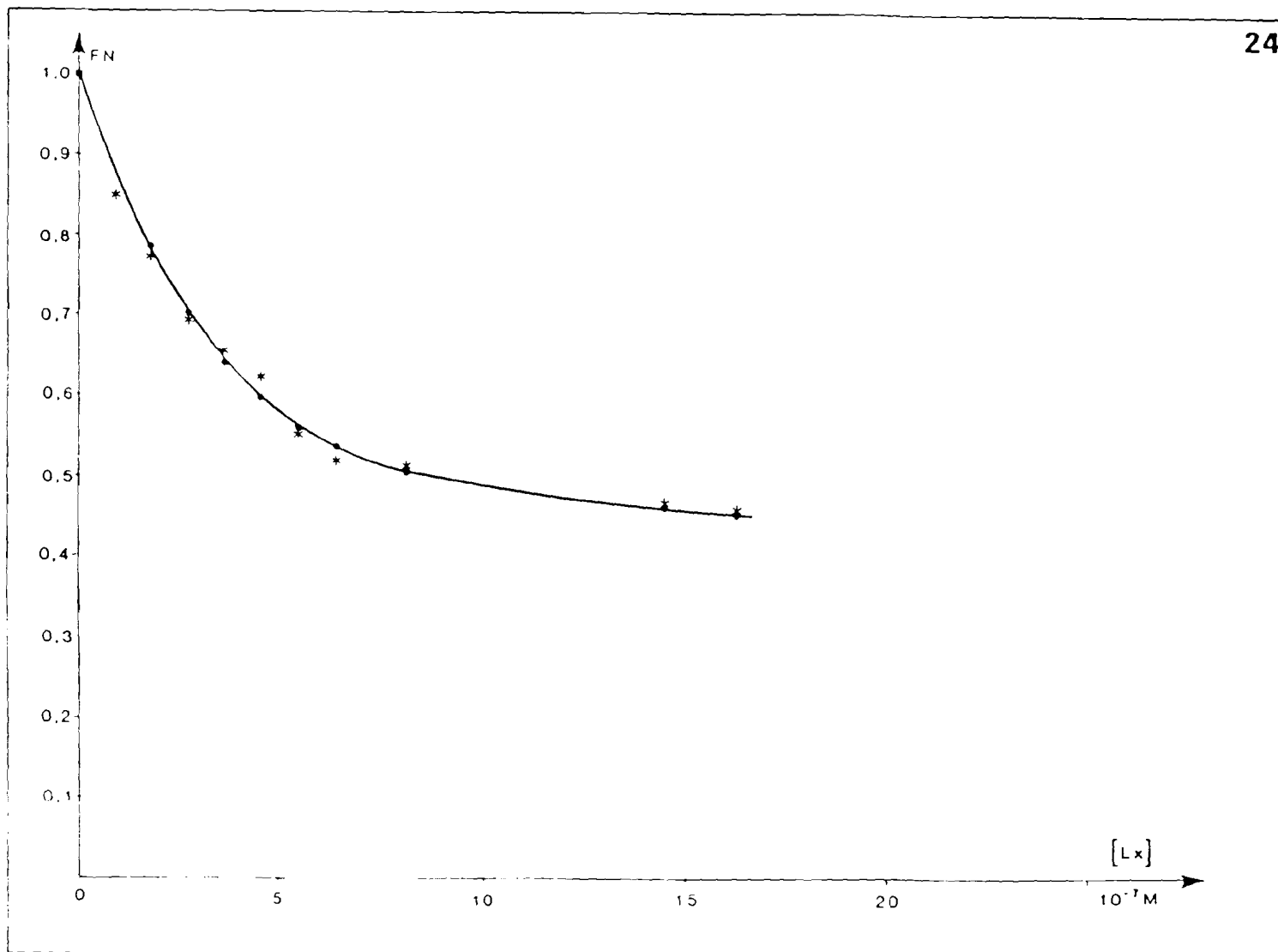
Enzyme non dialysée

1. Déterminé par régression linéaire

2. Déterminé par itération

DATES DE PREPARATION		6.12.83	20.3.1984	
DATES DE MANIPULATIONS		13.12.83	27.3.1984	29.3.1984
[DHFR] (M)		$9,89 \cdot 10^{-7}$	$8,8 \cdot 10^{-7}$	$7,3 \cdot 10^{-7}$
[PYR] (M)		$4,5 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$
As (UI/mg)		13	16	15
Ka (M ⁻¹)	1	$1,2 \cdot 10^{+7}$	$5 \cdot 10^{+7}$	non déterminable
	2	$0,97 \cdot 10^{+7}$	$5 \cdot 10^{+7}$	-
n	1	0,25	0,26	-
	2	0,24	0,26	-
Fb	1	0,77	0,51	-
	2	0,76	0,51	-

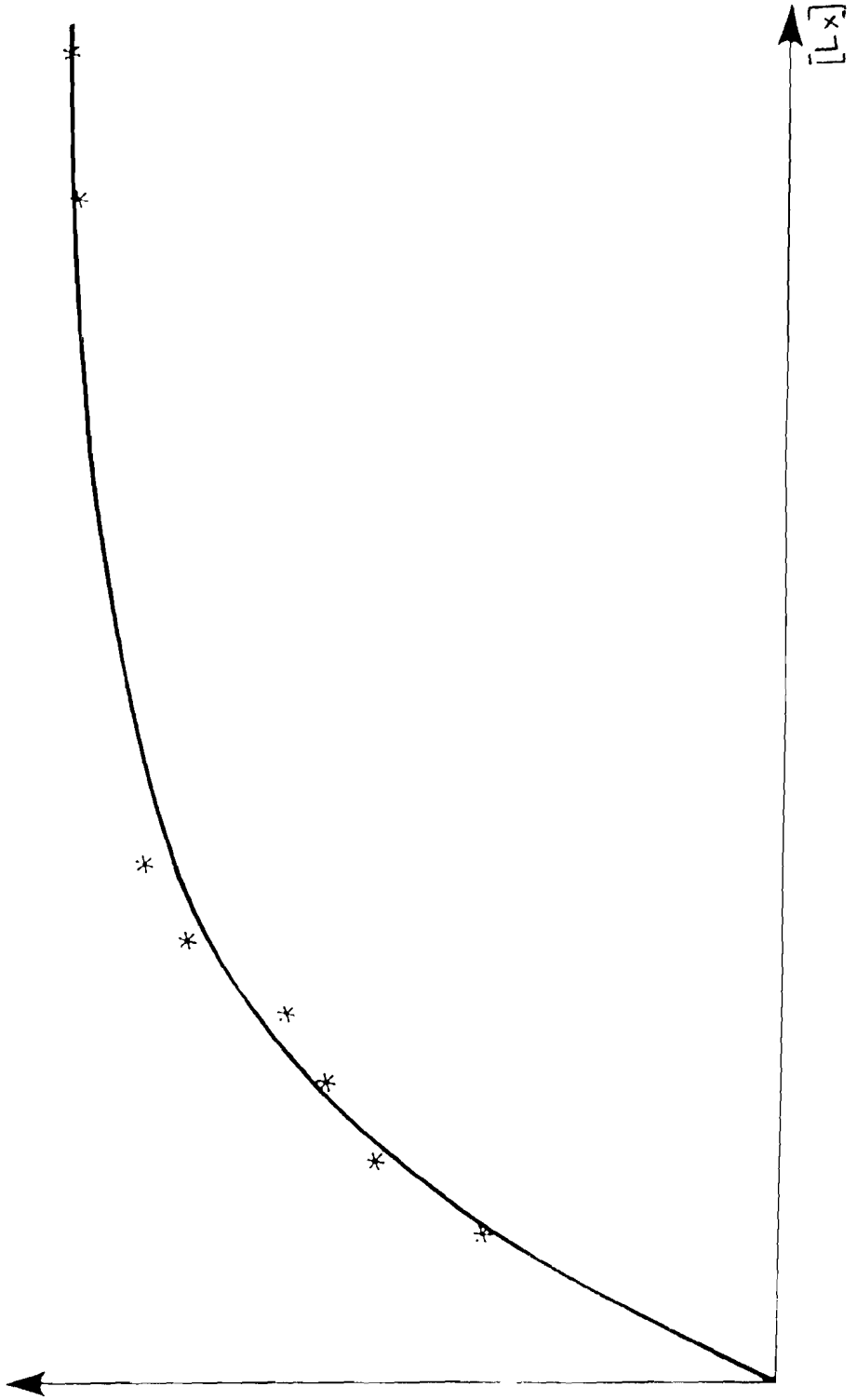
TABLEAU n° 21 - PARAMETRES DE FIXATION DETERMINEE PAR FLUORESCENC . COMPLEXE BINAIRE. ENZYME DIALYSEE



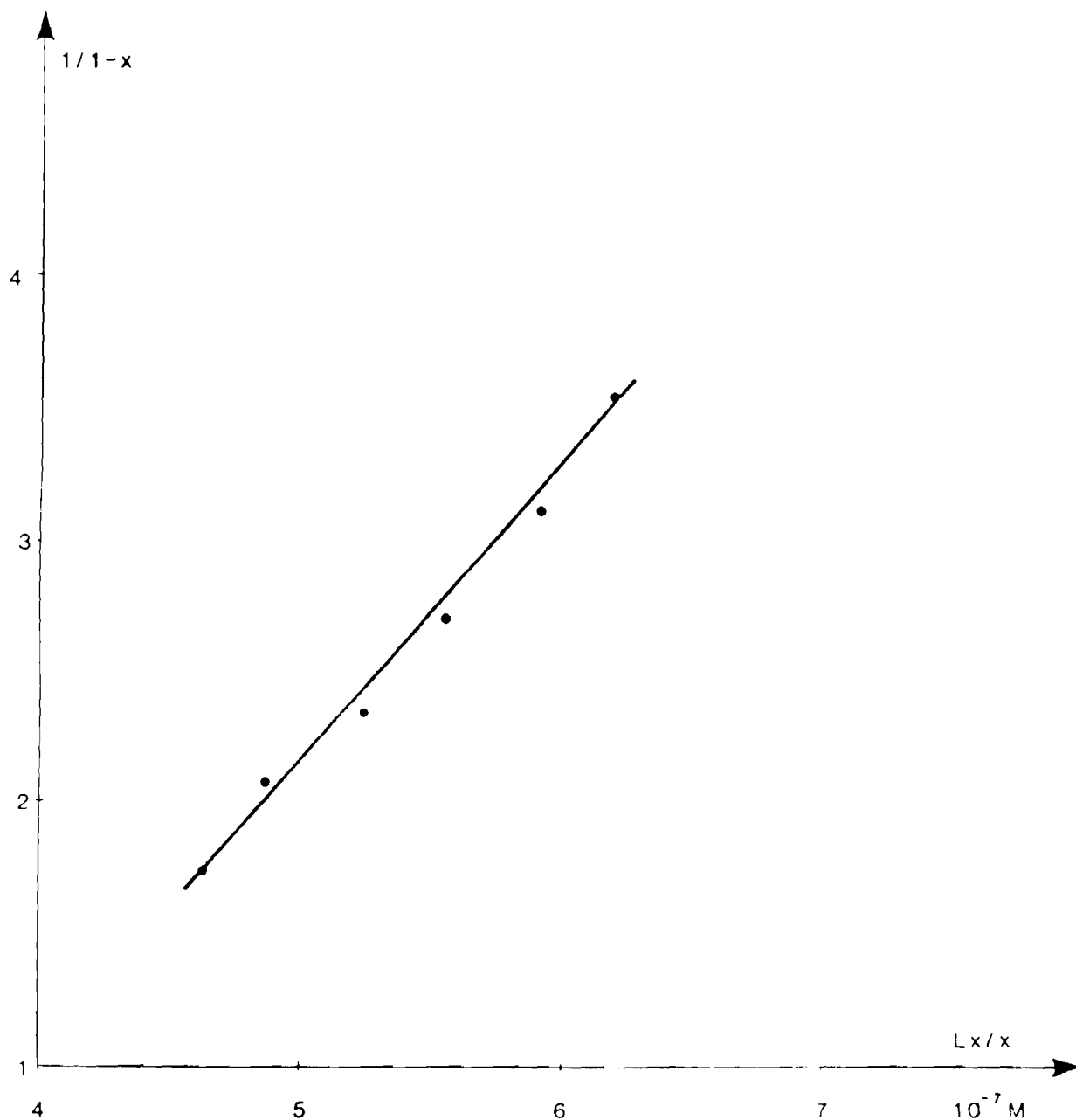
- * Points expérimentaux
- Points théoriques

FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE PYR

25

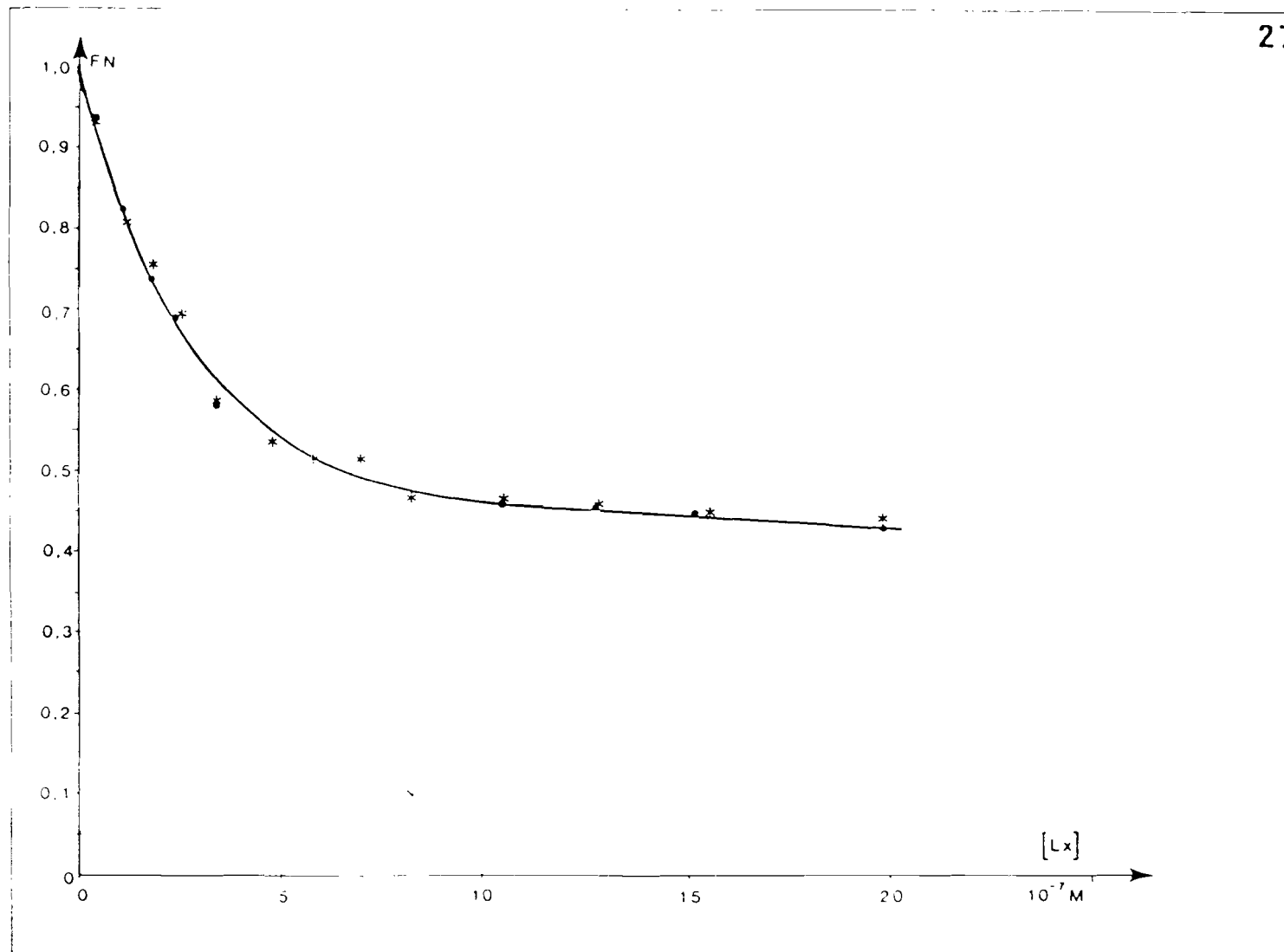


FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE LA PYR (Aplle II)



GRAPHE DE LA FONCTION $\frac{1}{1-x} = f\left(\frac{Lx}{x}\right)$

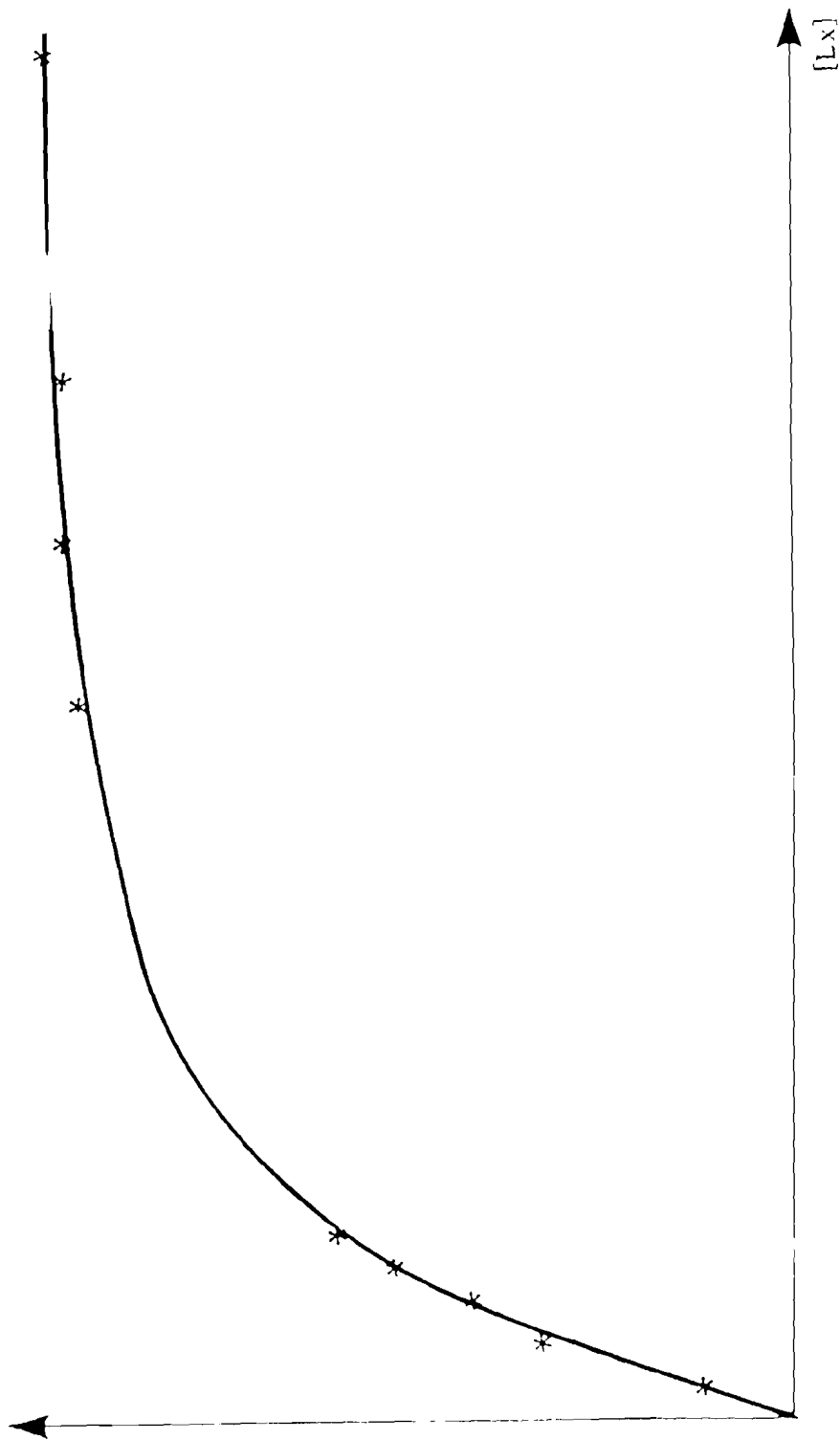
$r = 0,999$



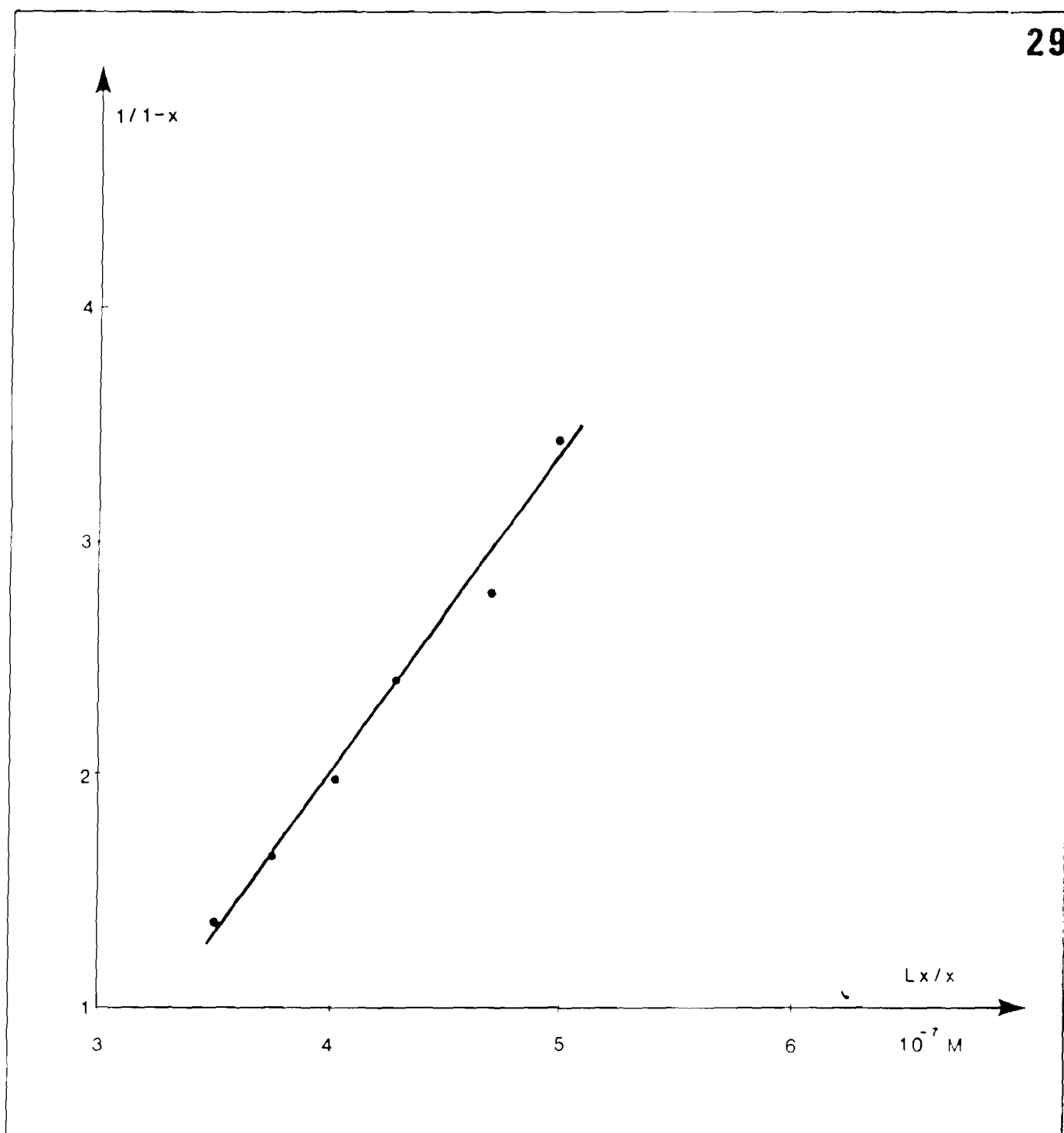
- * Points expérimentaux
- Points théoriques

FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION MOLAIRE DE PYR

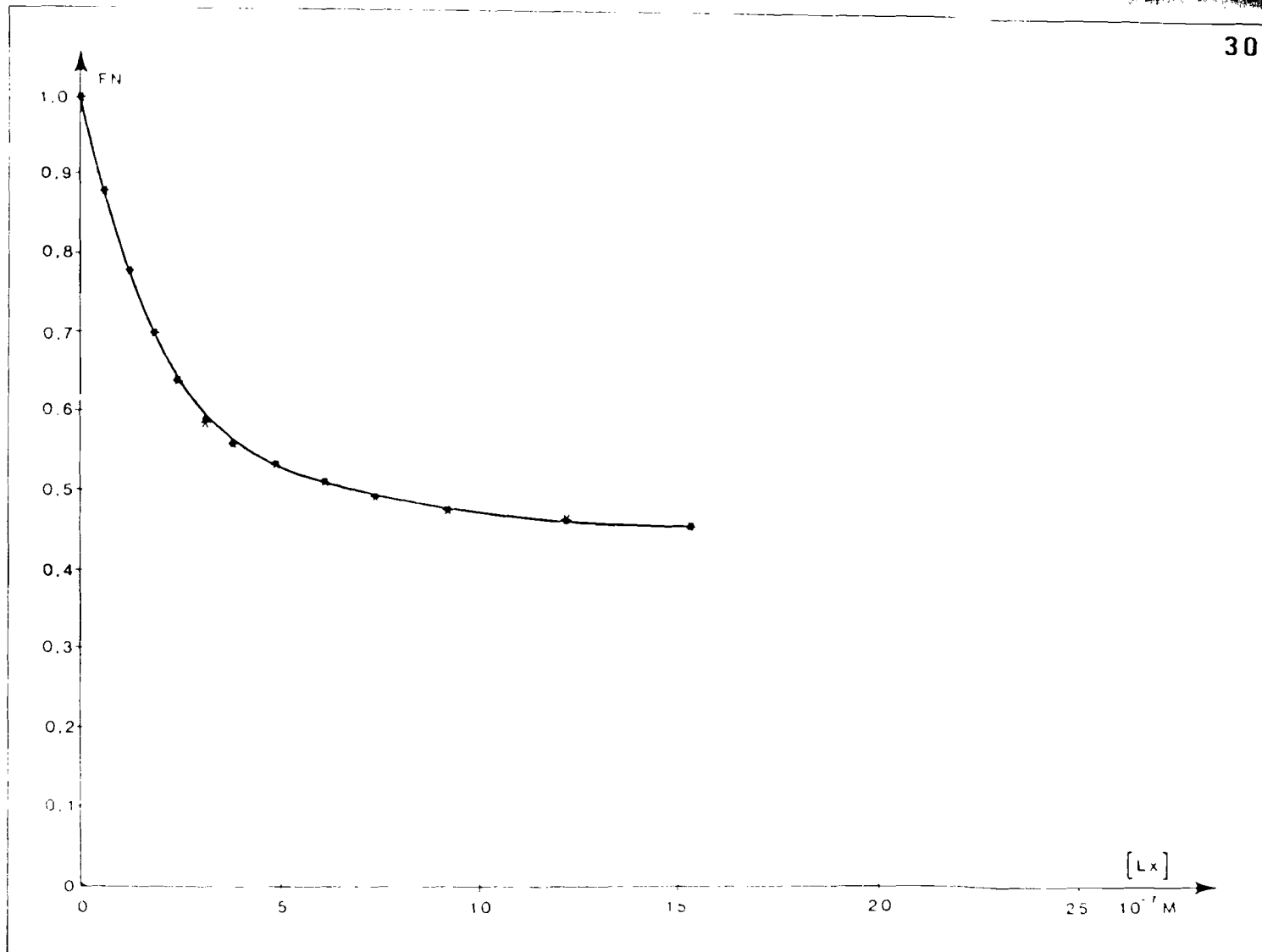
28



FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION MOLLAIRE DE PYR (Apple II)

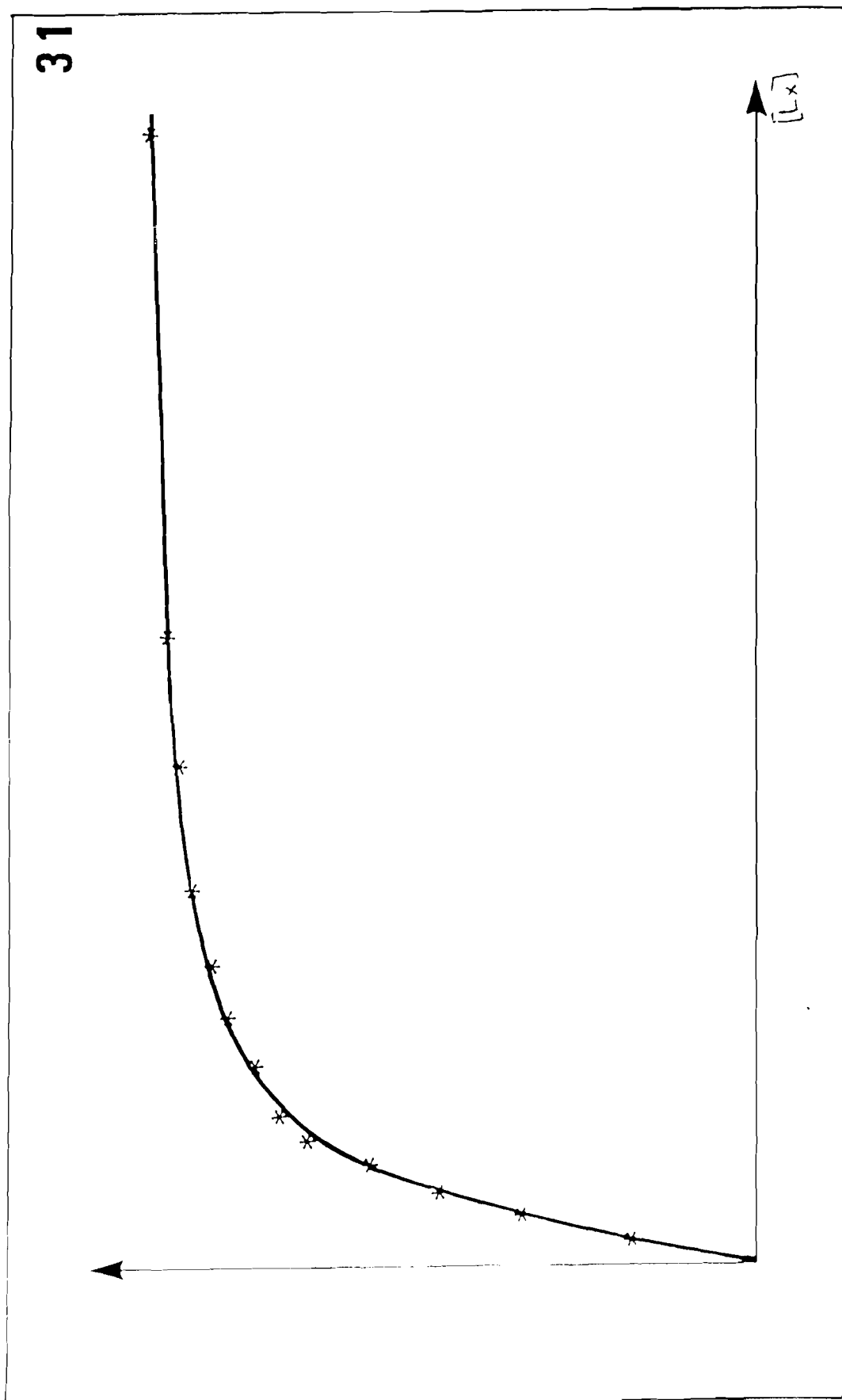


GRAPHE DE LA FONCTION $\frac{1}{1-x} = f\left(\frac{[Lx]}{X}\right)$
 $r = 0,99$

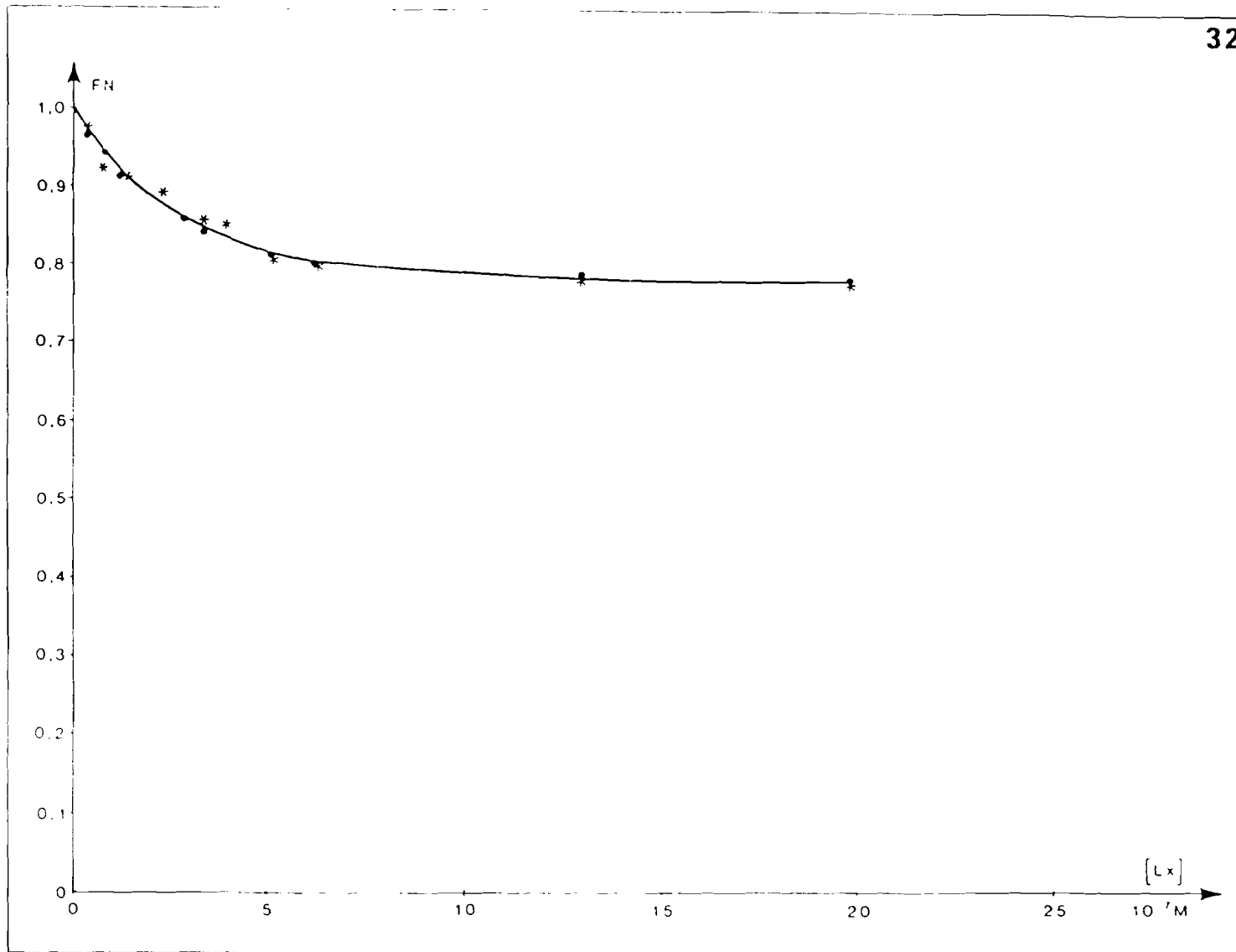


- * Points expérimentaux
- Points théoriques

FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION MOLLAIRE DE PYR

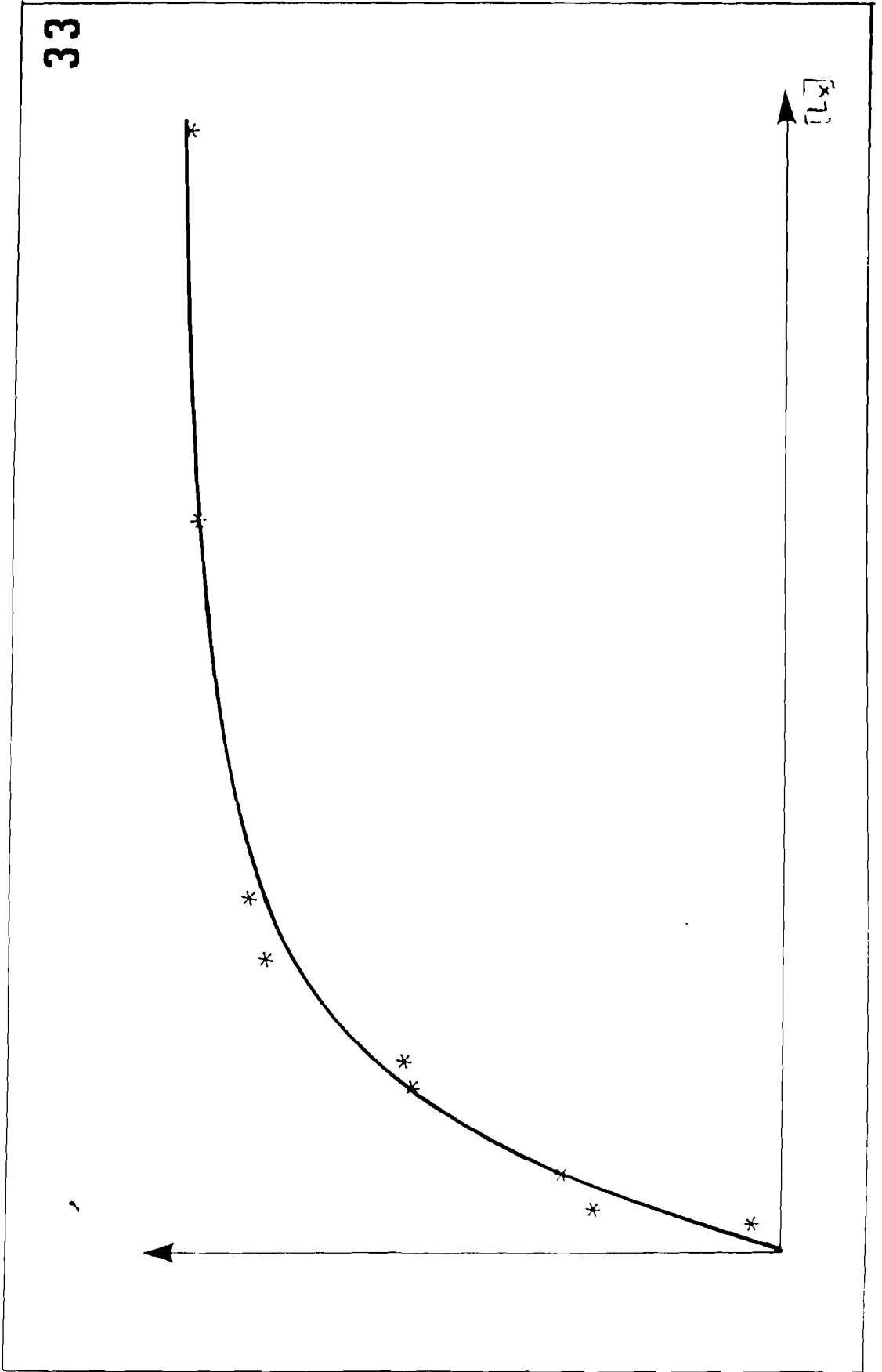


FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PYR



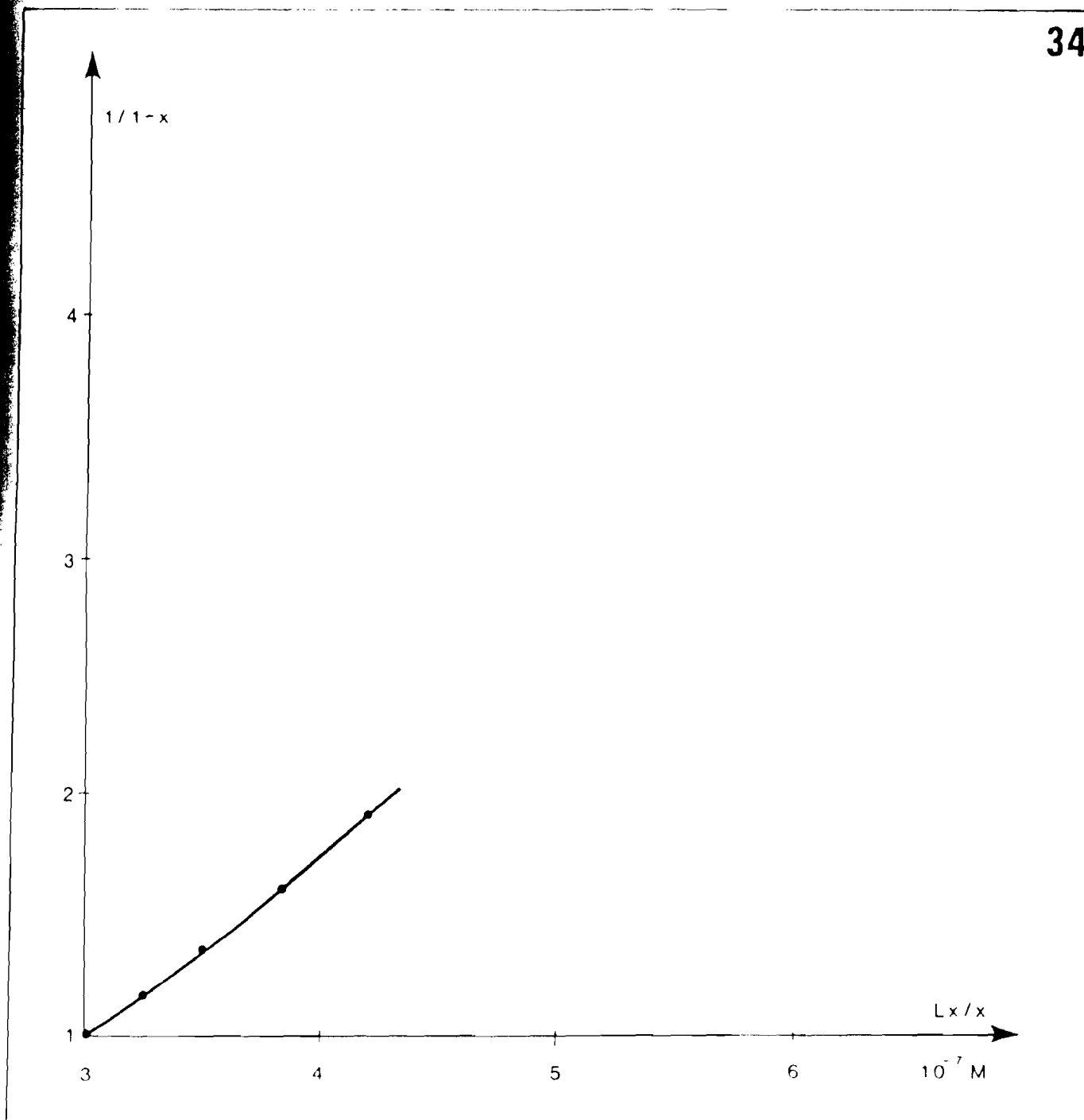
- * Points expérimentaux
- Points théoriques

FLUORESCENCES NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE PYR



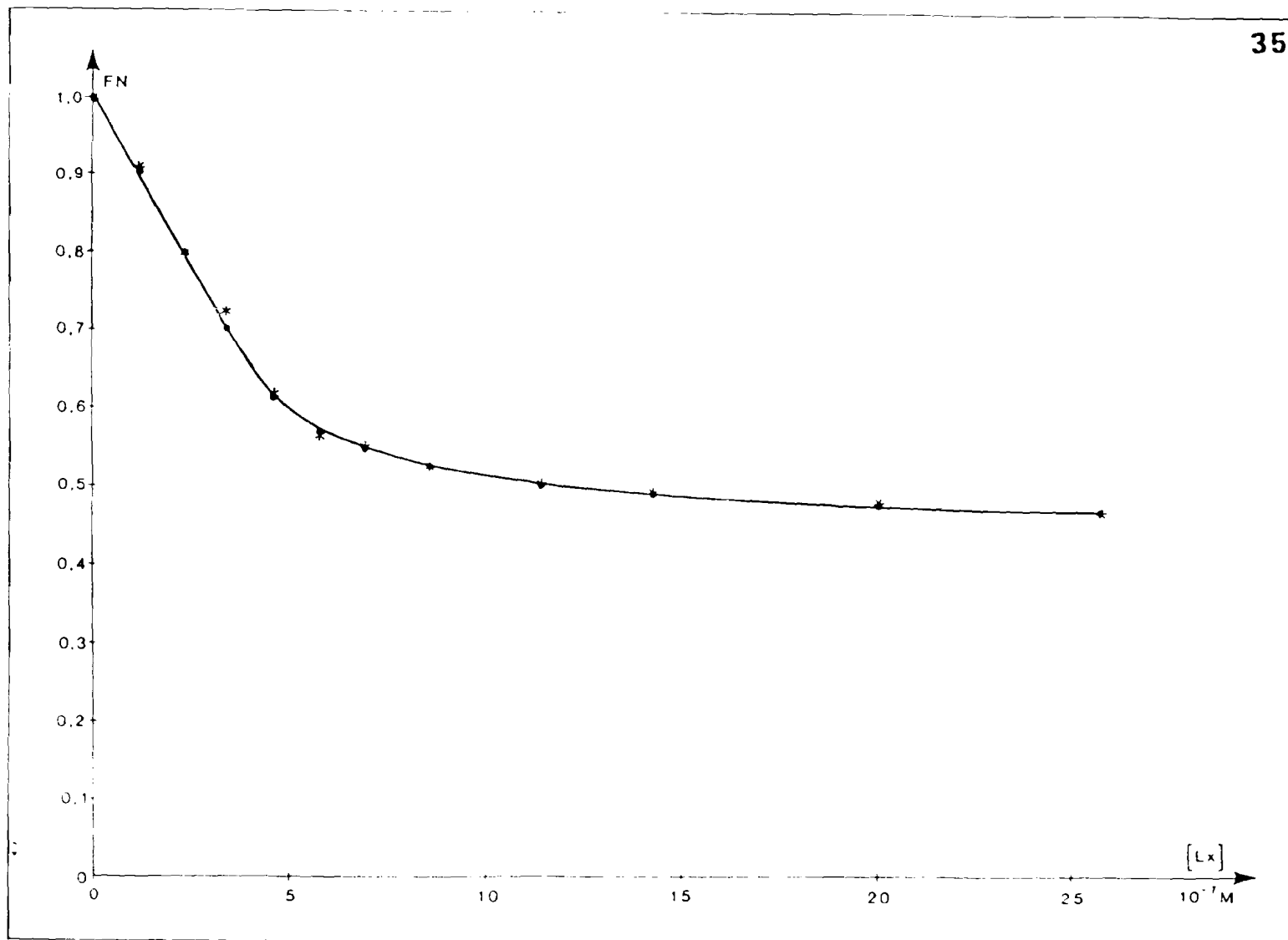
FLUORESCENCE NORMÉE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION MOLLAIRE DE PYR (Apple II)

34



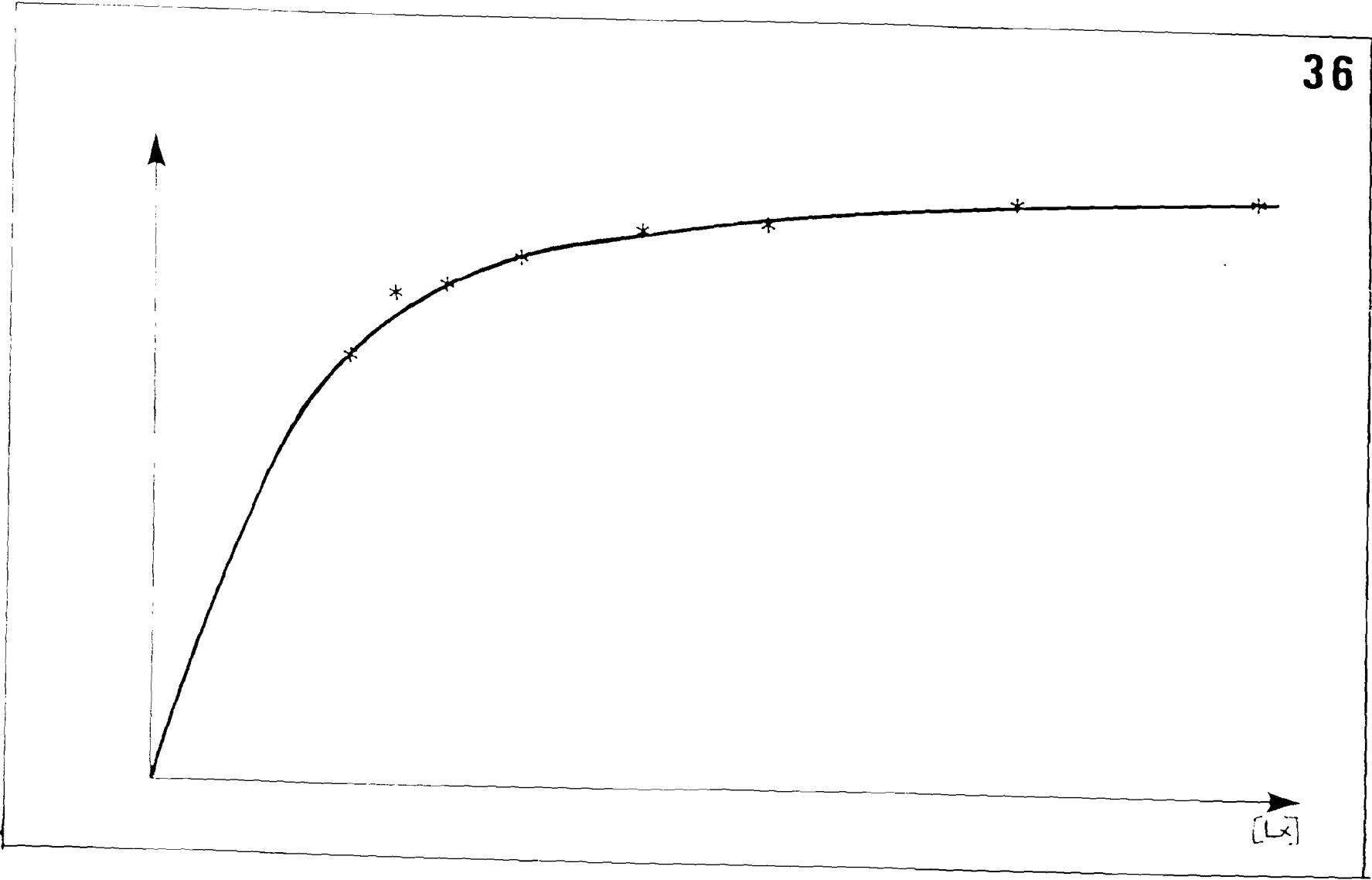
GRAPHE DE LA FONCTION $\frac{1}{1-x}$ $\left(\frac{Lx}{x}\right)$

$r = 0,99$

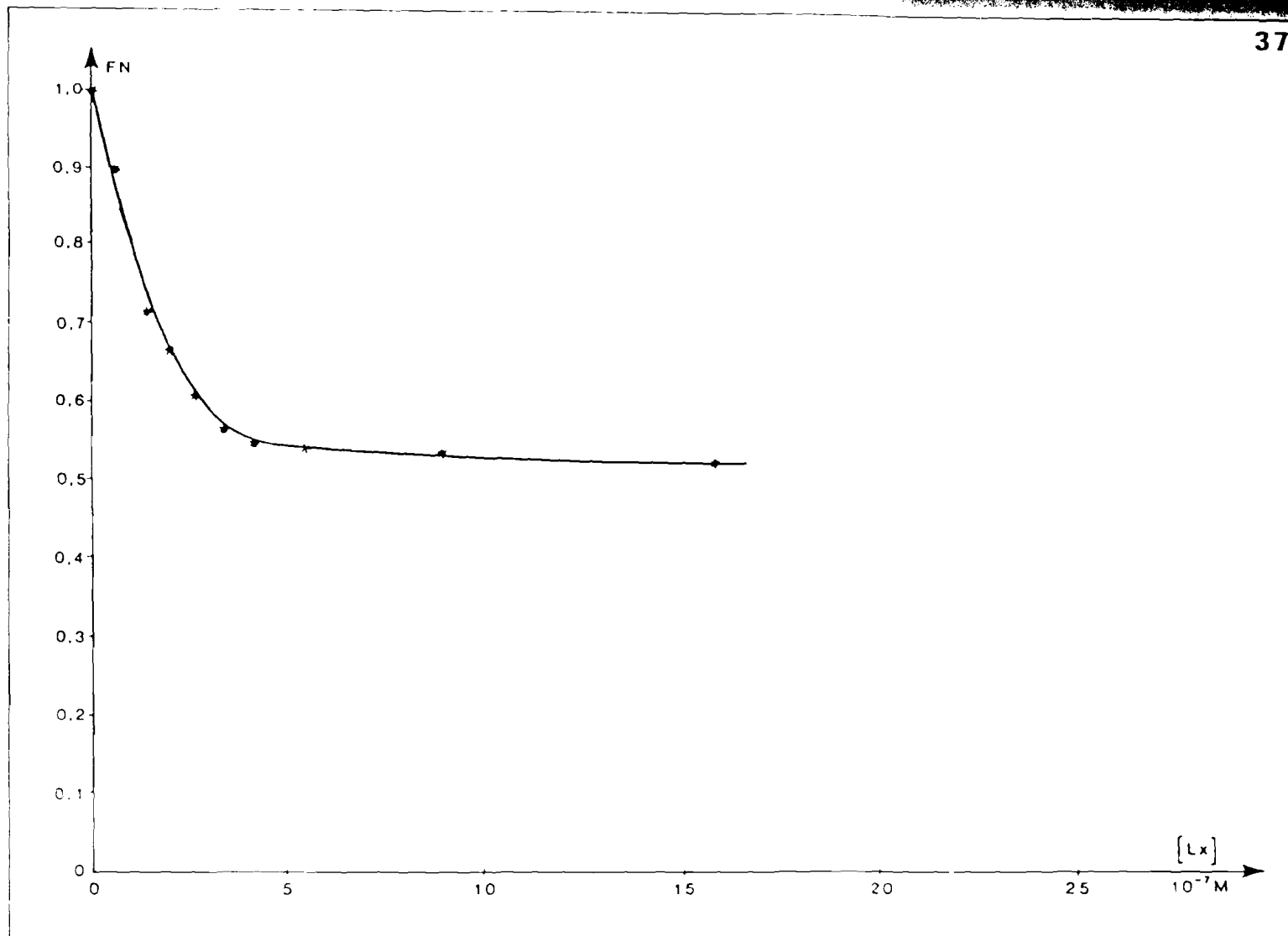


* Points expérimentaux
• Points théoriques

FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION MOLAIRE DE PYR

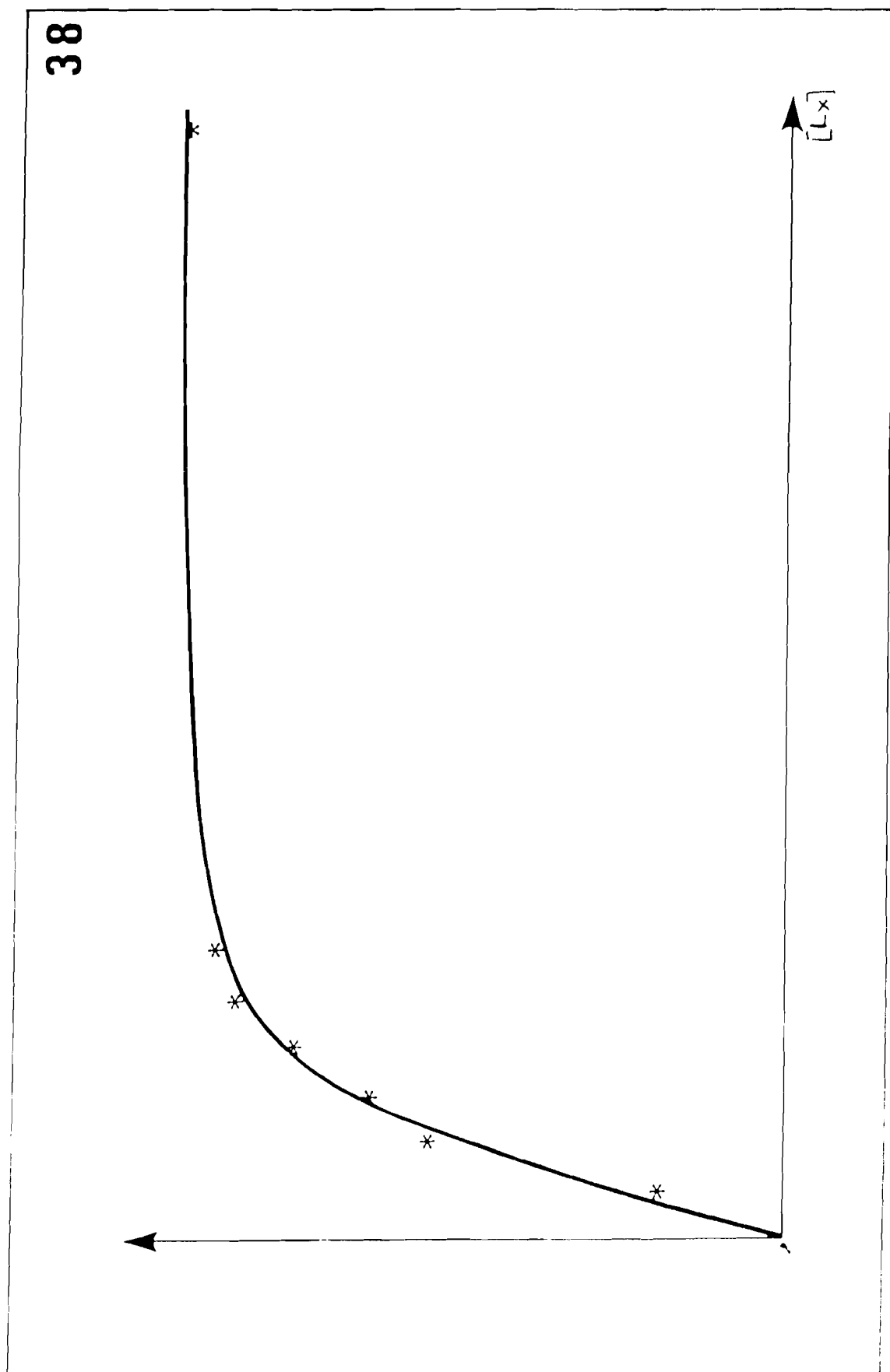


FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION MOLAIRE DE PYR (Apple II)



- * Points expérimentaux
- Points théoriques

FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION MOLAIRE DE PYR



Fluorescence normalisée en fonction de la concentration molaire de PYR (Appie II)

b. Interaction MTX-DHFR

Nous avons d'autres part étudié la fixation du MTX pour la comparer à la PYR, ces deux médicaments ont en effet le même mode d'action d'antifolique.

Les paramètres de fixation déterminé par fluorescence sont respectivement :

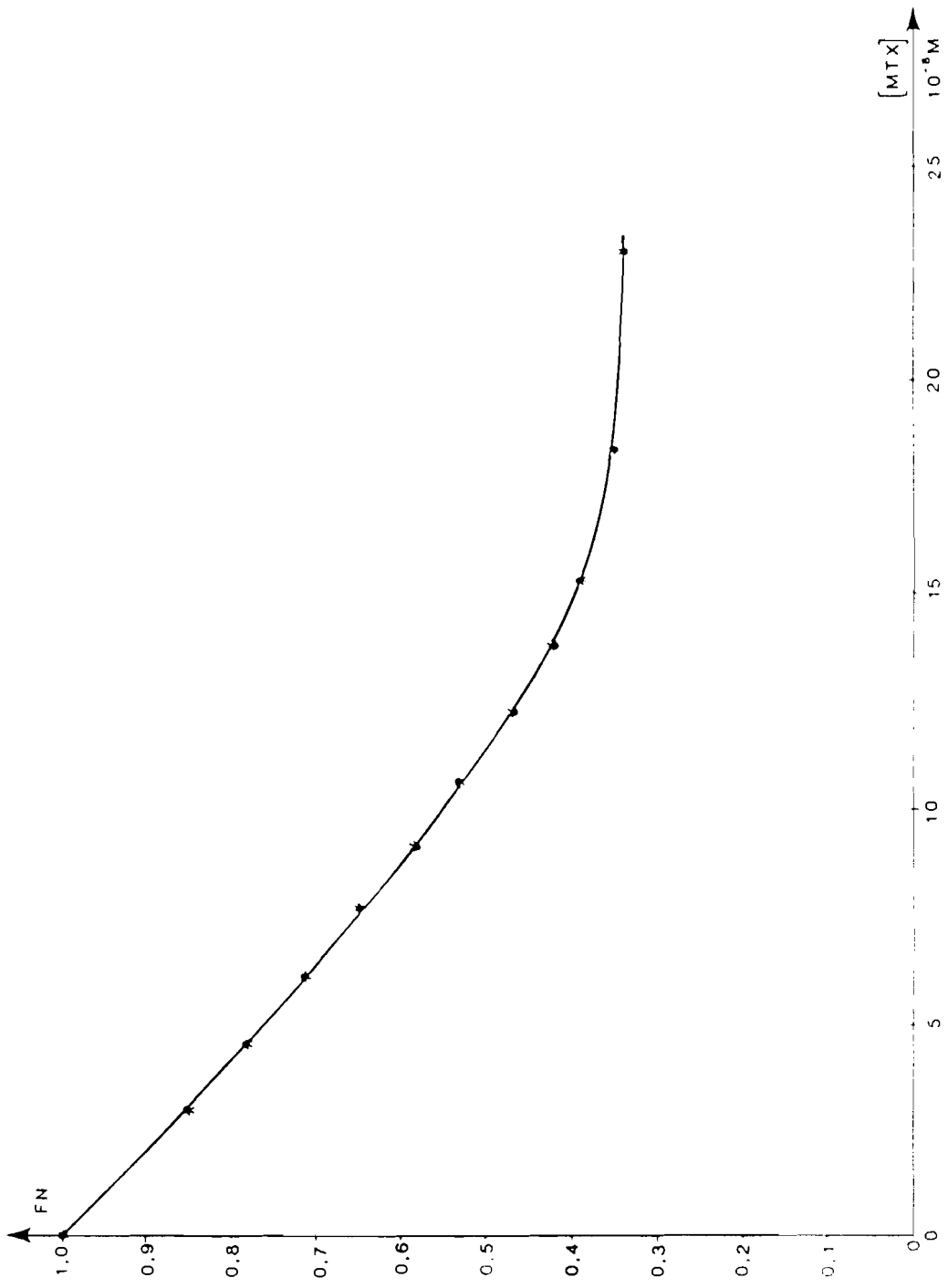
$$\begin{aligned} K_a &= 2.10^8 \text{ M}^{-1} \\ n &= 0,20 \\ F_b &= 0,30 \end{aligned}$$

Les résultats du traitement des données expérimentales sur Apple II sont :

$$\begin{aligned} K_a &= 1,9.10^8 \text{ M}^{-1} \\ n &= 0,20 \\ F_b &= 0,31 \\ r &= 0,99 \end{aligned}$$

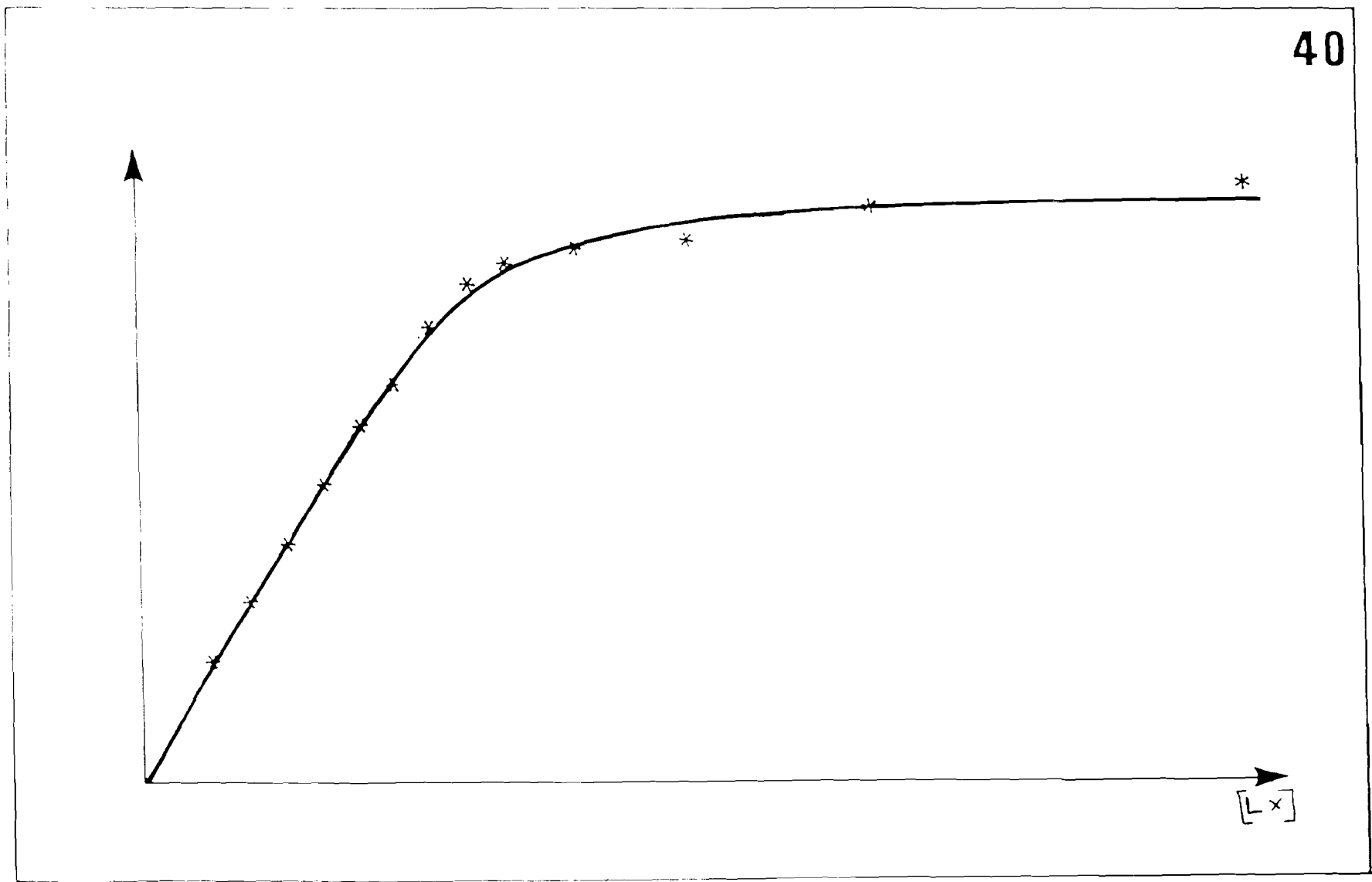
Les figures n° 39 et 40 représentent la fluorescence normalisée du milieu en fonction de la concentration molaire du ligand ajouté.

Ainsi, le MTX présente un nombre de sites moindres que la PYR par contre sa constante d'affinité est nettement plus élevée : $2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$. Il convient donc de comparer la "capacité de liaison" de la DHFR vis à vis des deux antifoliques représentée par le produit nK_a . Pour le MTX $nK_a = 4.10^7 \text{ M}^{-1}$ et pour la PYR en prenant l'expérience du 24/03 réalisée le même jour, $nK_a = 6.10^7 \text{ M}^{-1}$.



* Points expérimentaux
• Points théoriques

FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION MOLAIRE EN MTX



FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN MTX (Apple II)

Systèmes ternaires (NADPH -DHFER) + PYR

- Enzyme non dialysée

Les figures n° 41, 42, 44, 45, 47, 48 représentent la fluorescence normalisée du milieu en fonction de la concentration molaire du ligand ajouté ; tandis que les figures n° 43, 46 représentent les graphes des variations de $1/1 - x$ en fonction de $\frac{[Lx]}{x}$. Les valeurs numériques du traitement des données sont représentées sur les tableaux n° 22.

- Enzyme dialysée

Les résultats sont représentés sur les figures 49, 50, 51, 52, 53, 54 et le tableau 23.

Les manipulations des 24, 28, 29 mars 1984 ont été faites avec la même préparation d'enzyme.

Apparemment l'introduction de NADPH dans le milieu entraîne une légère diminution de la constante d'affinité. Par contre, le nombre de sites protéiques de fixation augmente. On pourrait évoquer l'existence d'une coopérative négative pour le cofacteur.

- Evolution dans le temps

On peut suivre dans le temps l'évolution des paramètres de fixation de la PYR sur le complexe DHFER-NADPH sur le tableau n° 23.

Le temps de contact du NADPH avec la protéine pourrait éventuellement modifier la fixation subéquente du médicament.

Ces travaux se poursuivront donc pour élucider ce problème.

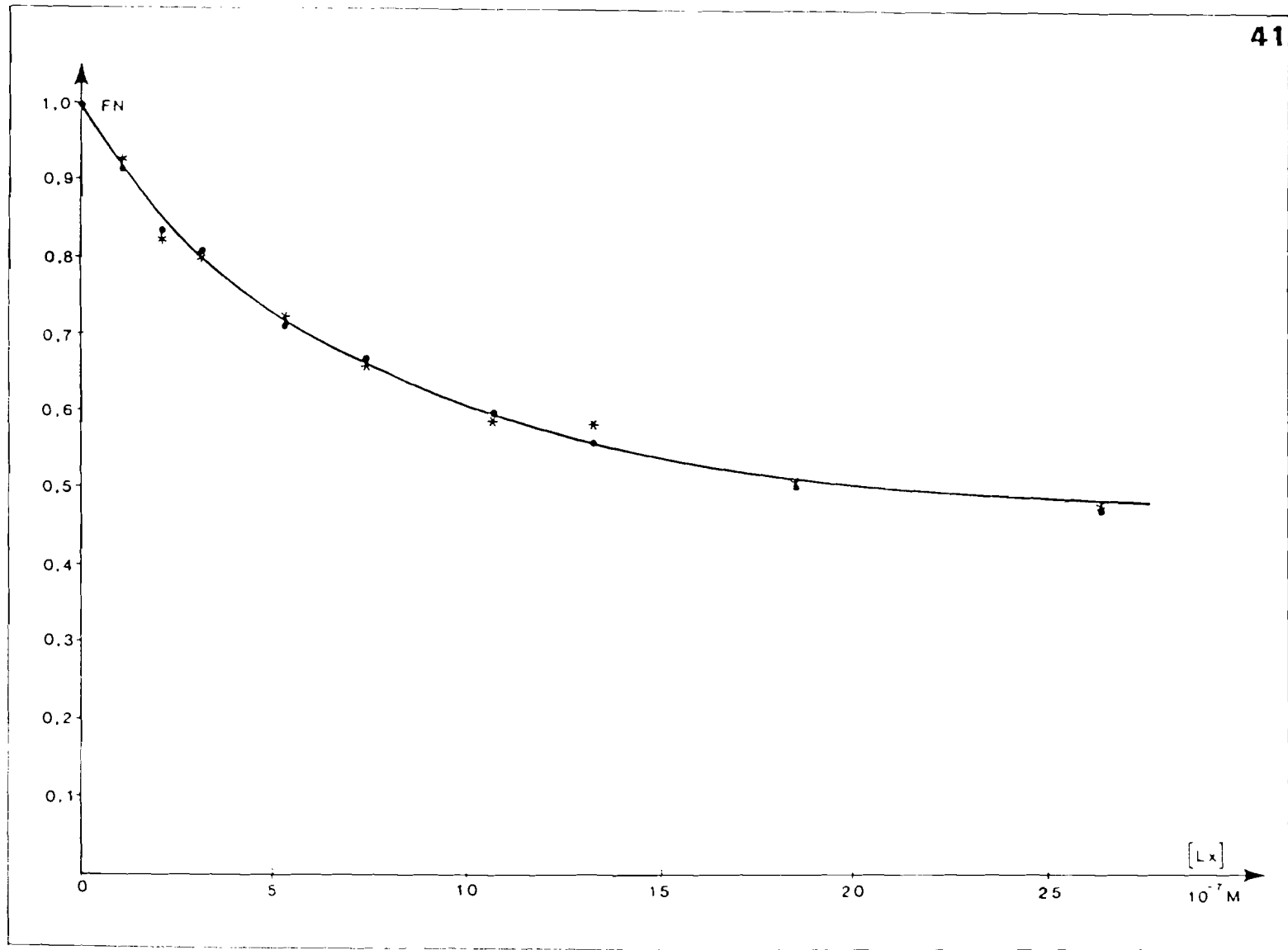
DATES DE MANIPULATIONS		19.12.1983	20.12.1983	27.3.1984
[DHFR] (M)		10^{-6}	$8,3 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-7}$
[PYR] (M)		$1,05 \cdot 10^{-4}$	$1,16 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
As (UI/mg)		12	12	20
Ka (M^{-1})	1	$2,4 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$
	2	$1,5 \cdot 10^6$	$5,2 \cdot 10^6$	$5,2 \cdot 10^6$
n	1	0,26	0,44	0,50
	2	0,19	0,60	0,49
Fb	1	0,42	0,52	0,43
	2	0,32	0,56	0,43

Tableau n° 22 - Paramètres de fixation déterminés par fluorescence.
Complexes ternaires. Enzyme non dialysée

DATES DE MANIPULATIONS		24.3.1984	28.3.1984	29.3.1984
[DHFR] (M)		$4,76 \cdot 10^{-7}$	$6,6 \cdot 10^{-7}$	$8,43 \cdot 10^{-7}$
[PYR] (M)		$1,55 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$1,27 \cdot 10^{-4}$
As (UI/mg)		16	14	14
Ka (M ⁻¹)	1	$3,6 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	10^7
	2	$3 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6$	-
n	1	0,49	0,63	0,53
	2	0,49	0,49	-
Fb	1	0,40	0,39	0,49
	2	0,40	0,40	-

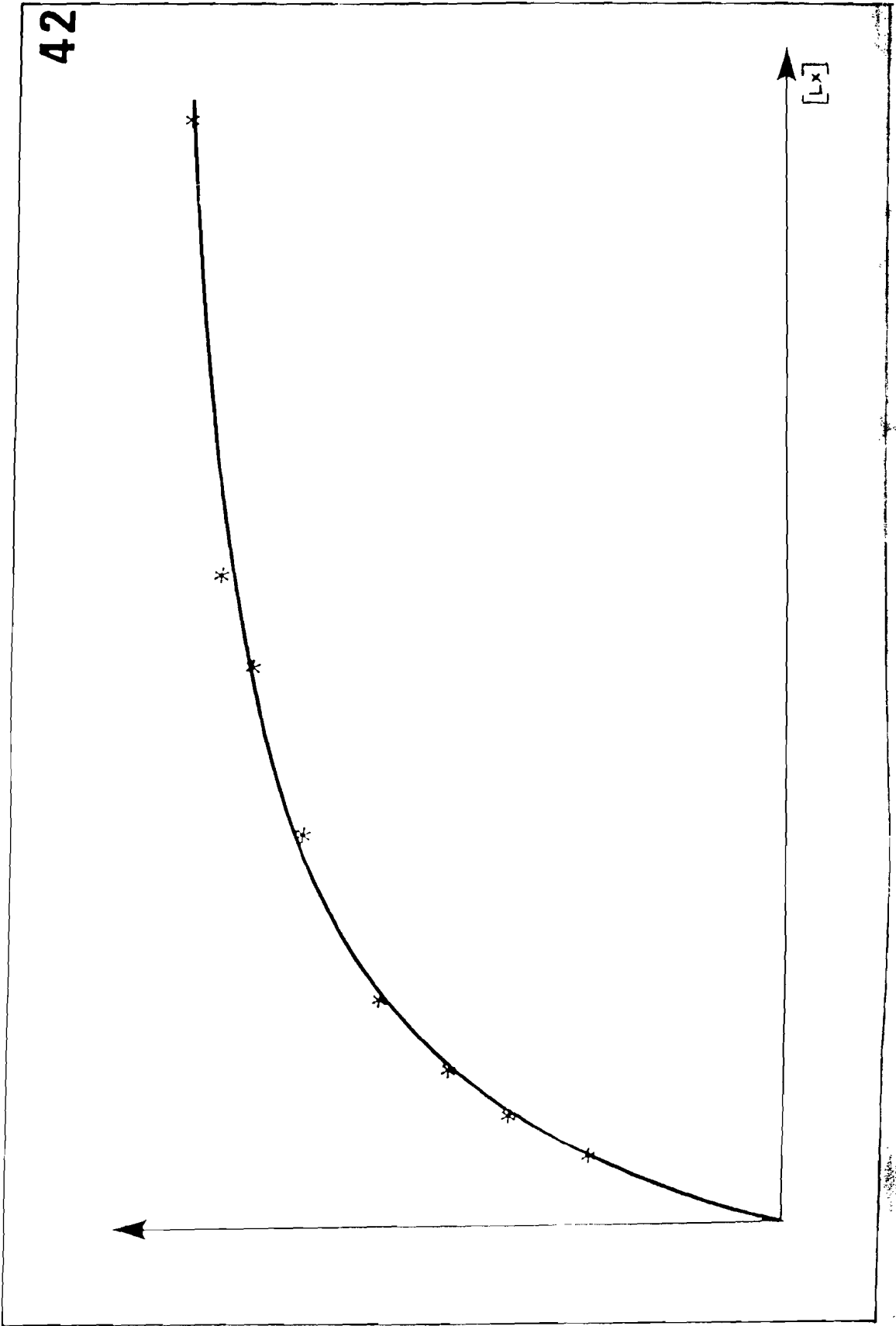
Tableau n° 23 - Paramètres de fixation déterminés par fluorescence

Enzyme dialysée. Complexes ternaires



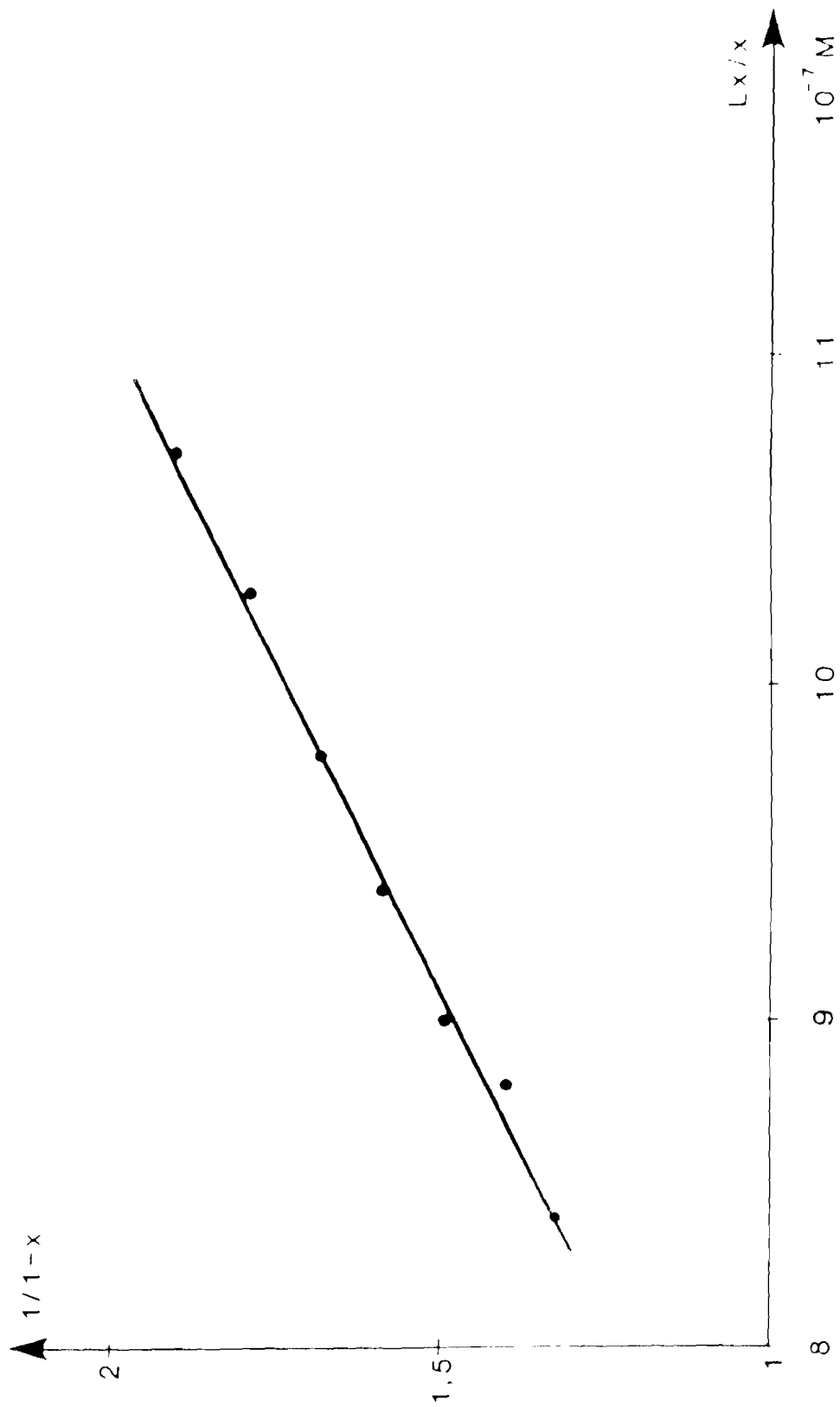
* Points expérimentaux
• Points théoriques

FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PYR

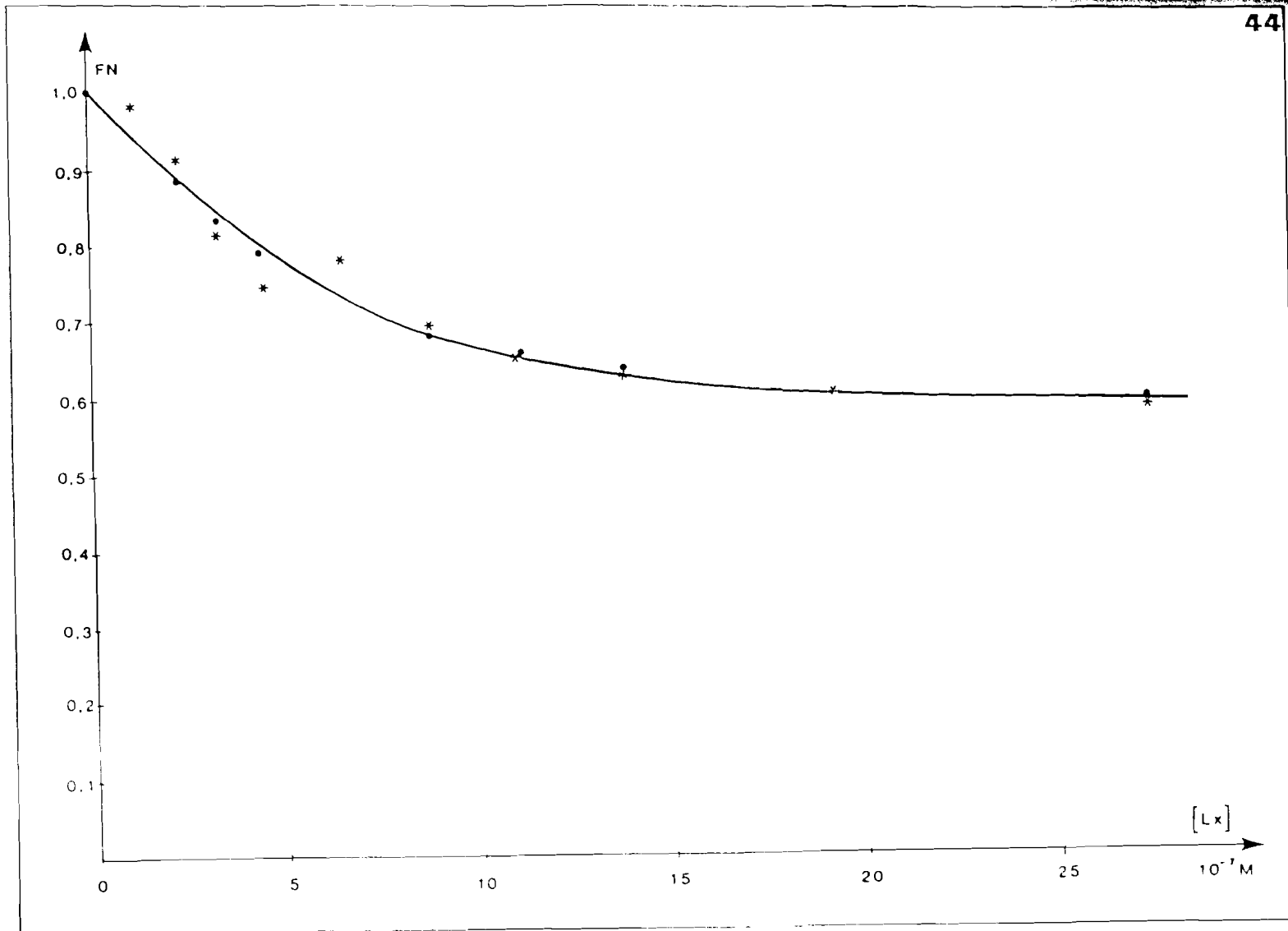


FLUORESCENCE NORMAISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PYRENE

43



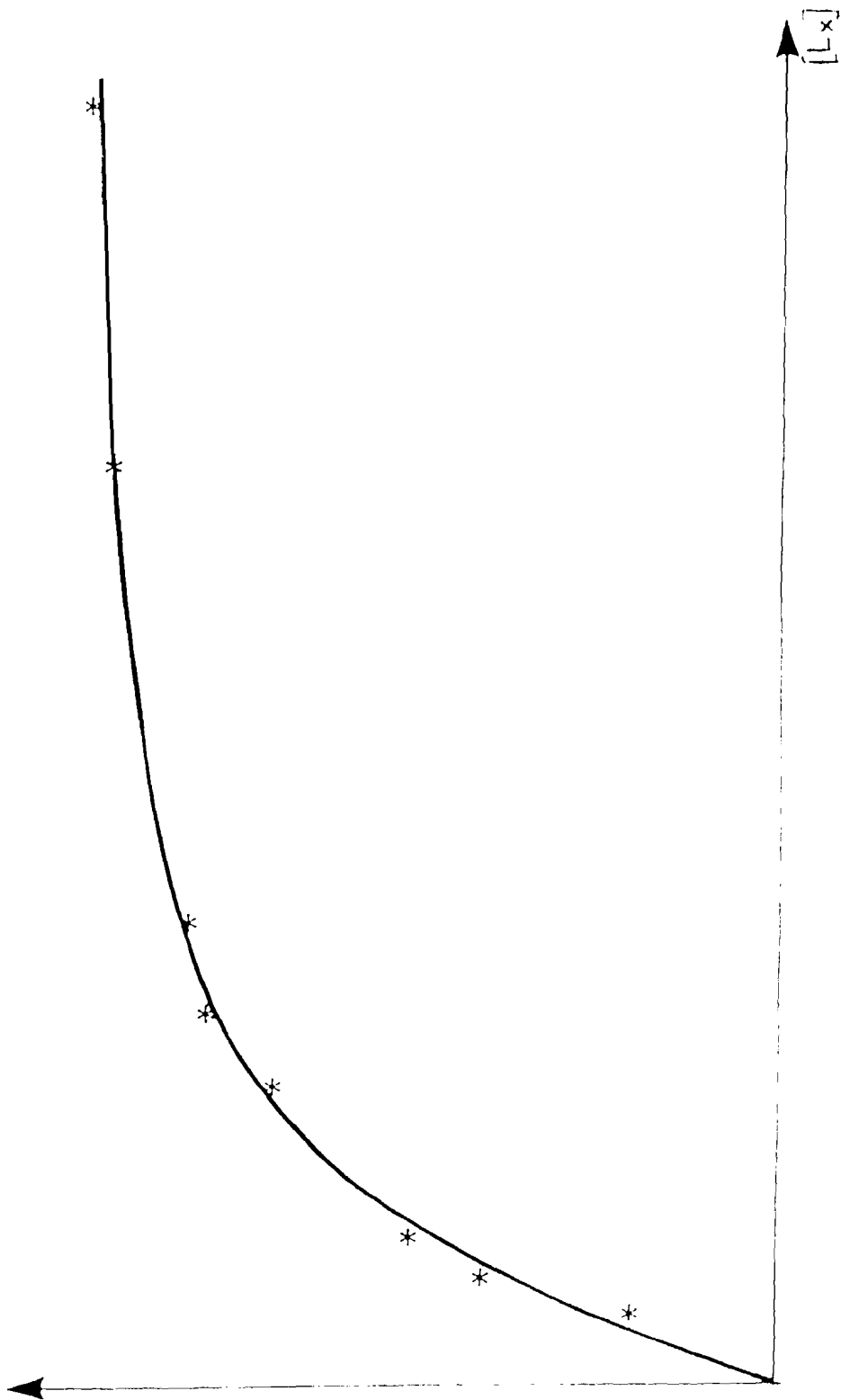
GRAPHE DE LA FONCTION $\frac{1}{1-x} = f\left(\frac{Lx}{x}\right)$ $r = 0,991$



- * Points expérimentaux
- Points théoriques

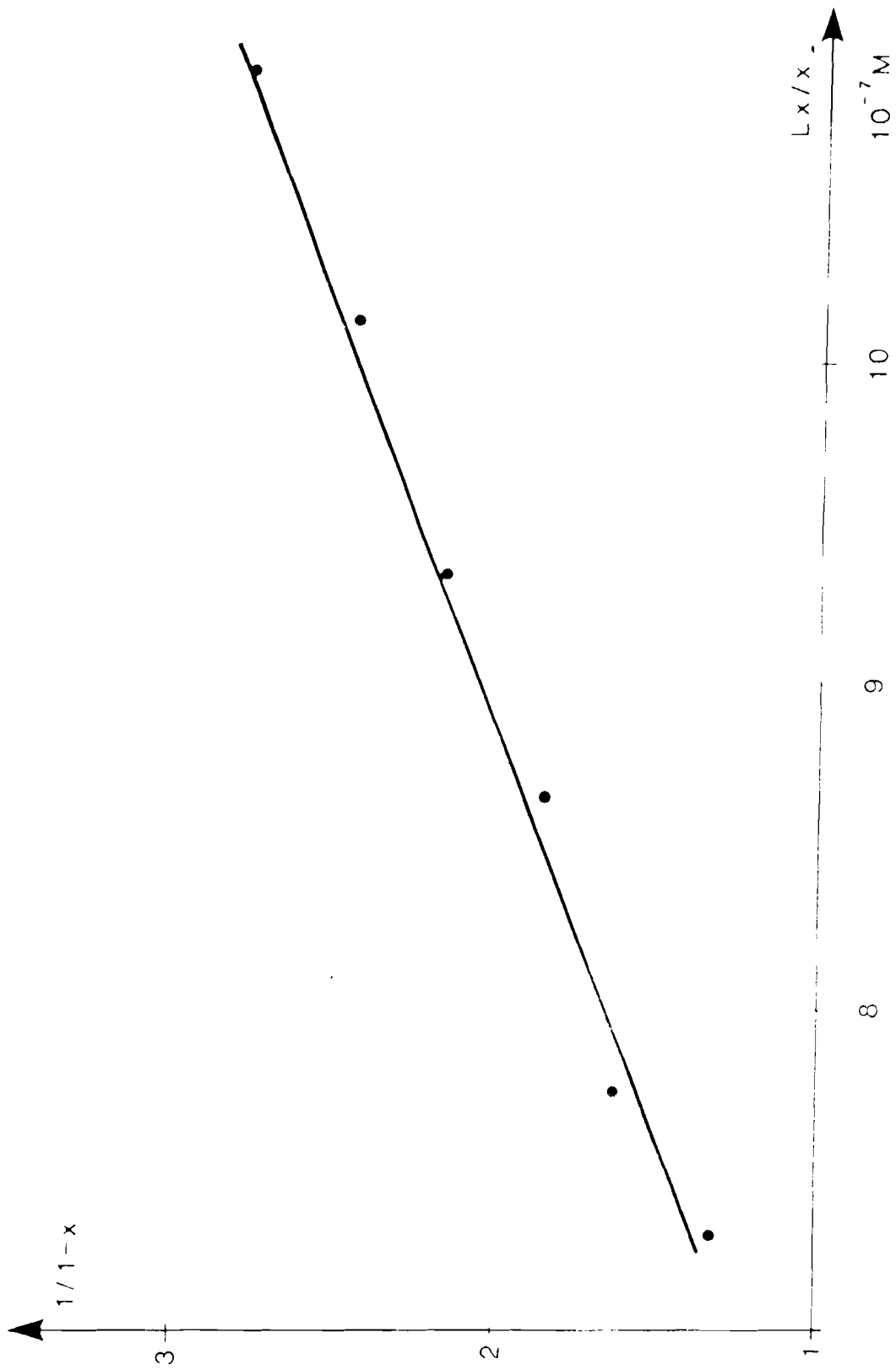
FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PYR

45

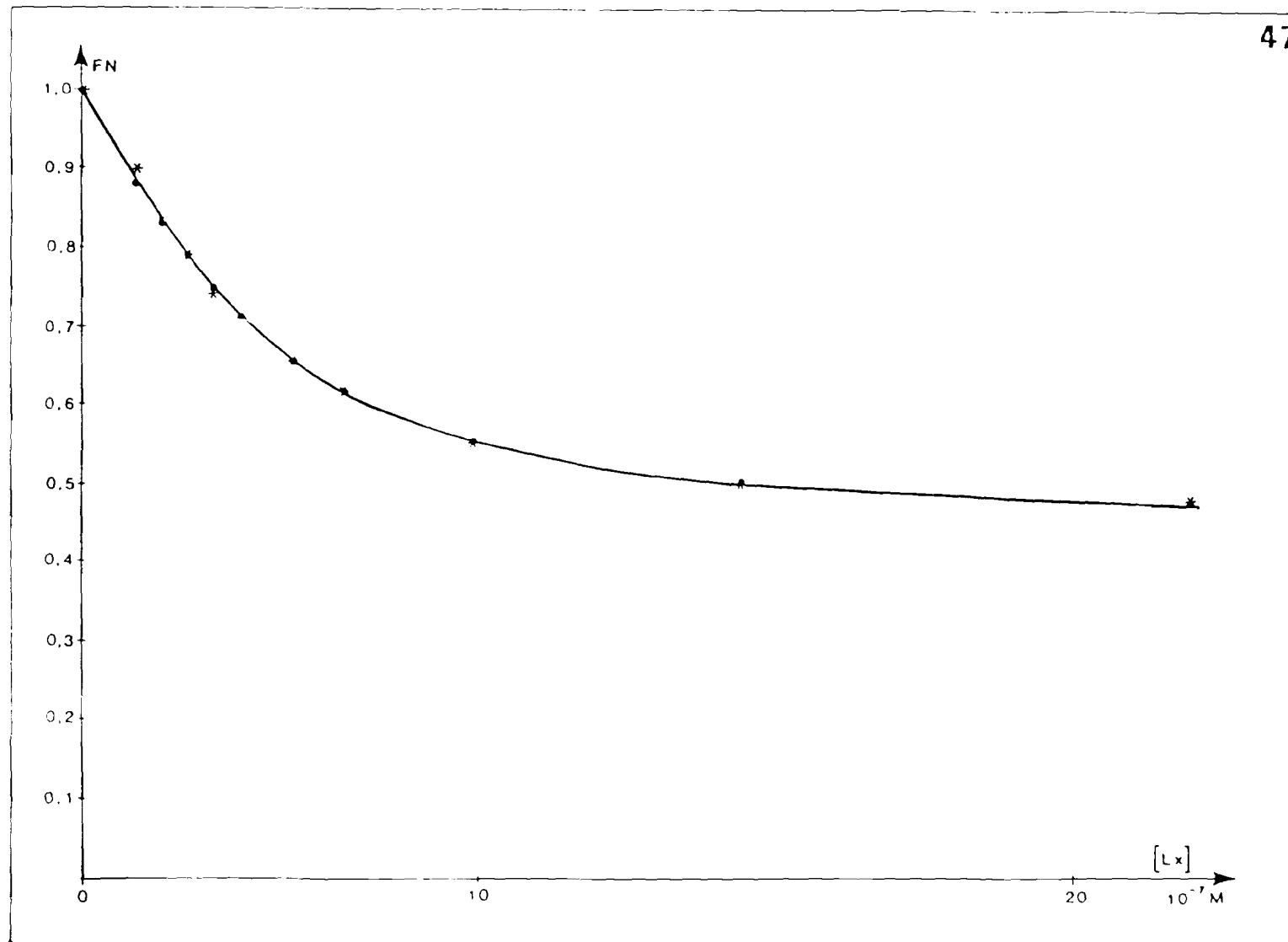


FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION E. J. VAN DER PARRIEN

46



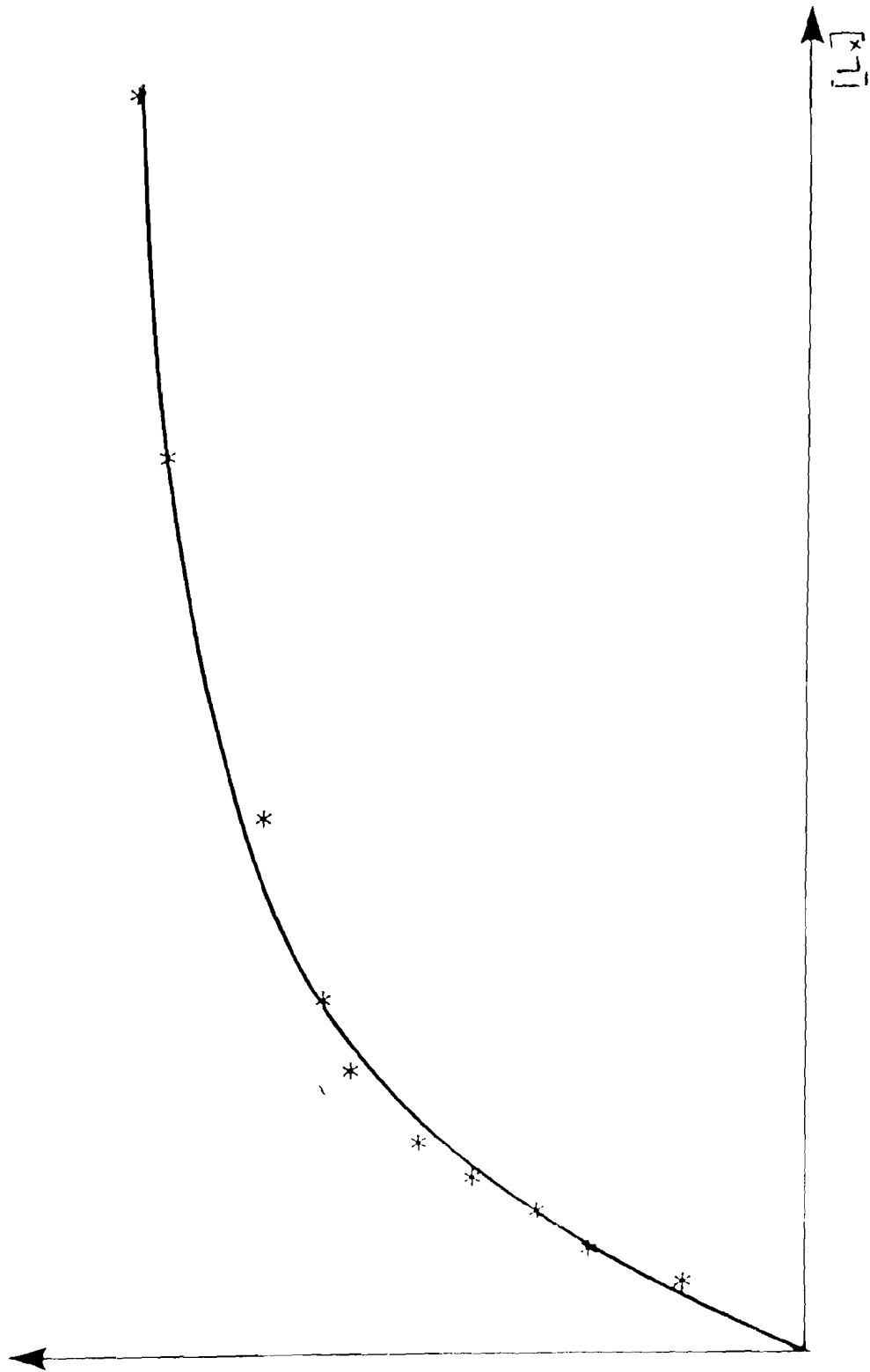
GRAPHE DE LA FONCTION $\frac{1}{1-x} = 1 + \left(\frac{Lx}{x}\right)$ $r = 0,99$



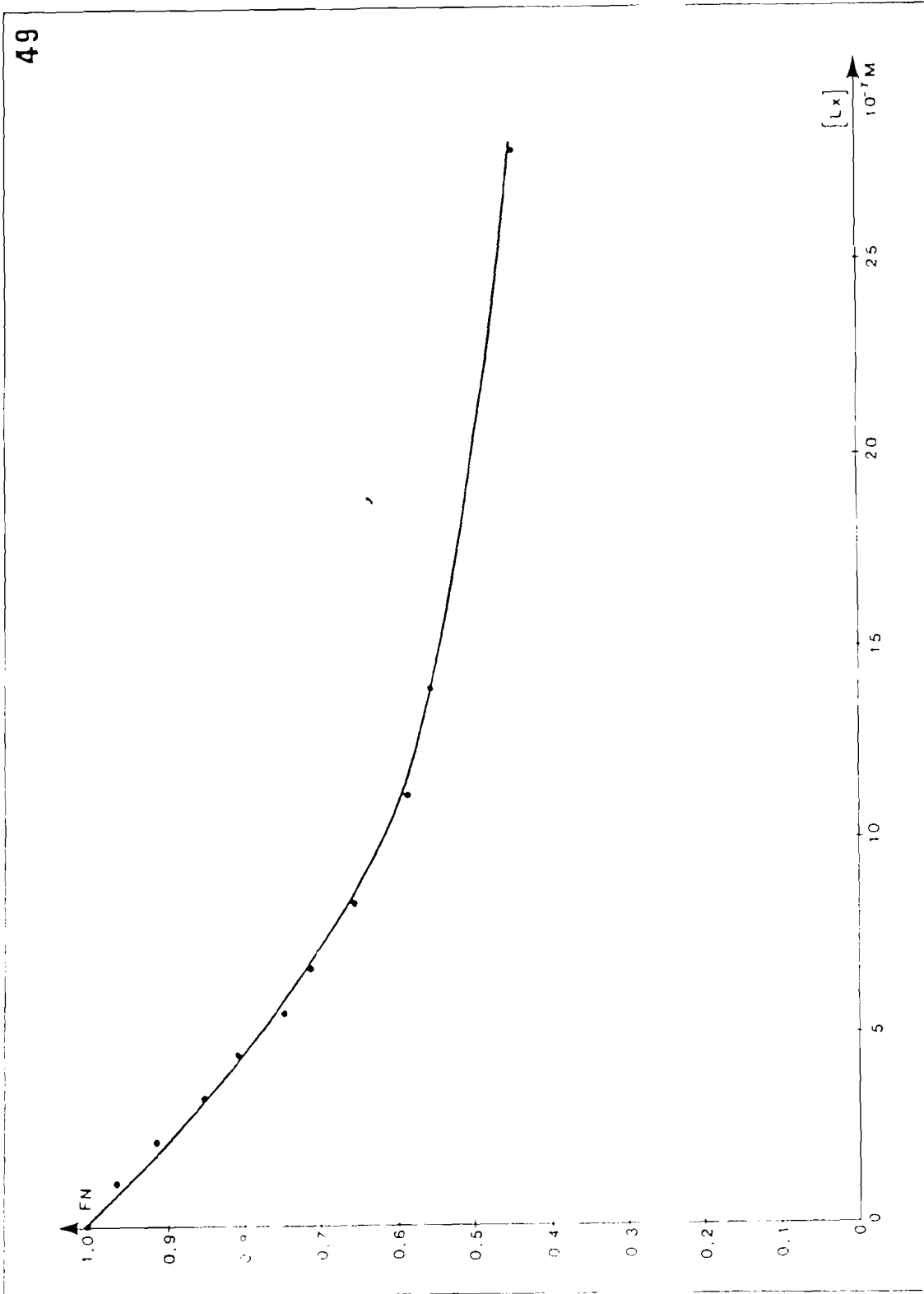
- * Points expérimentaux
- Points théoriques

FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PYR

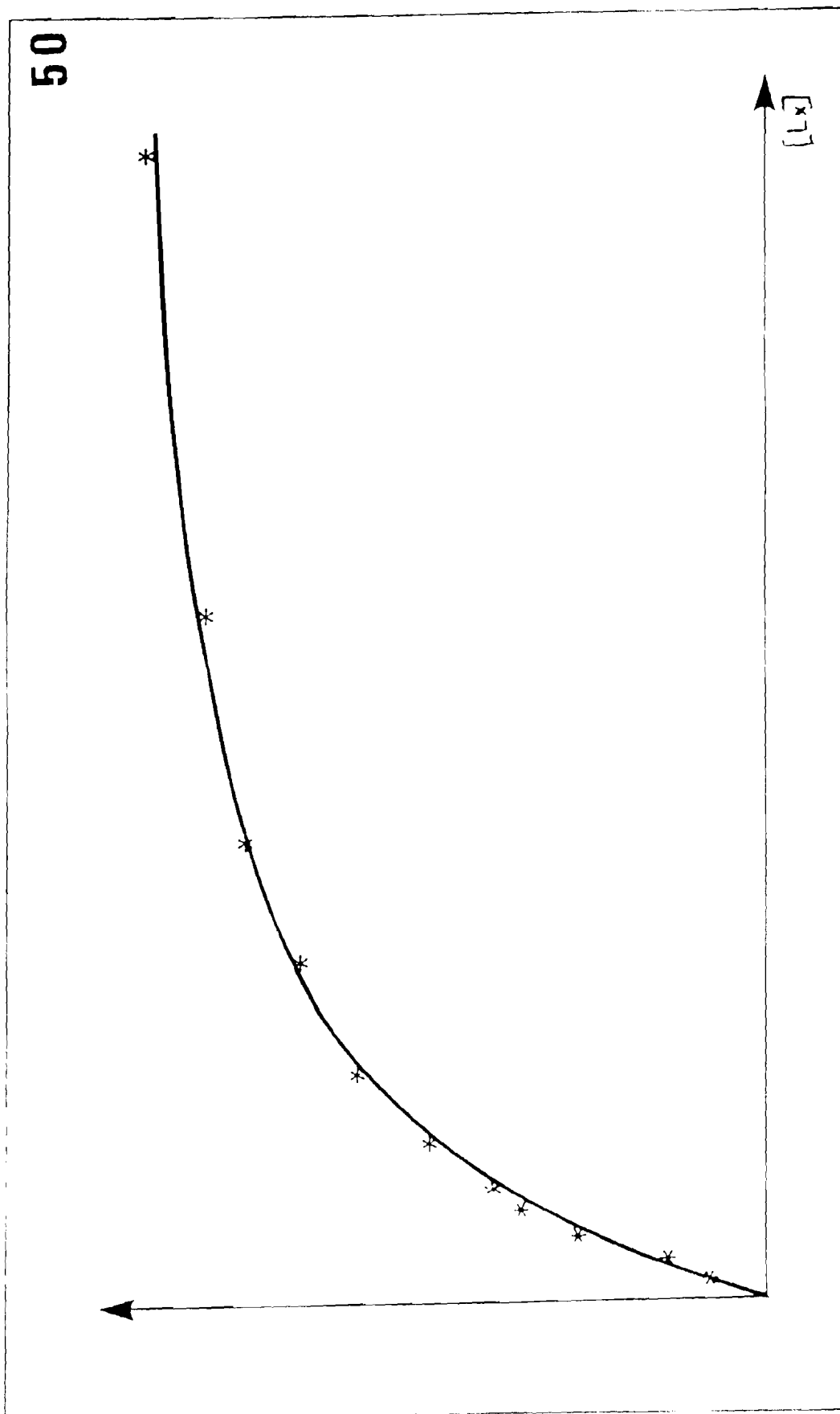
48



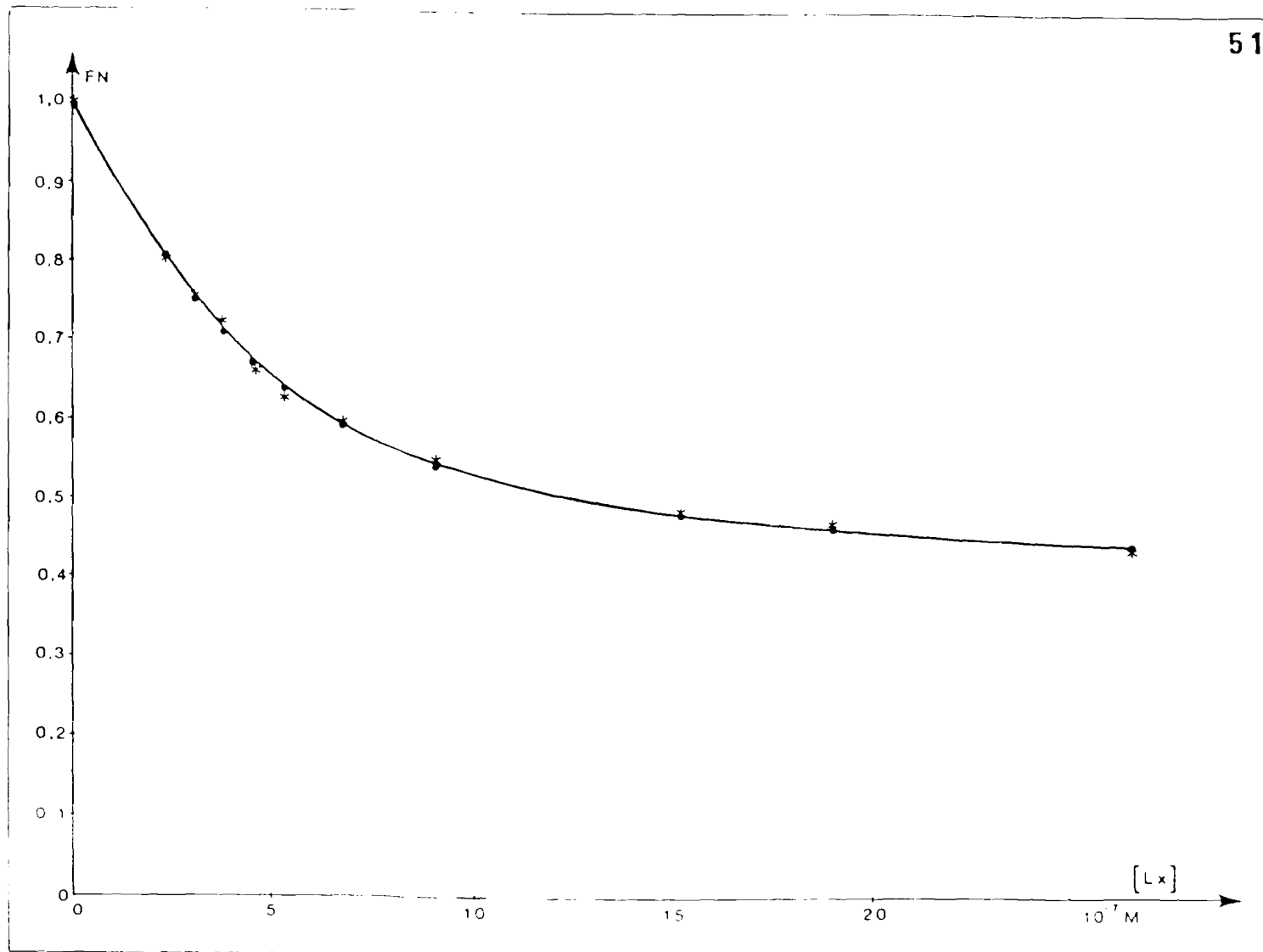
FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PYR (Apple II)



FLUORESCENCE MESURABLE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PYR



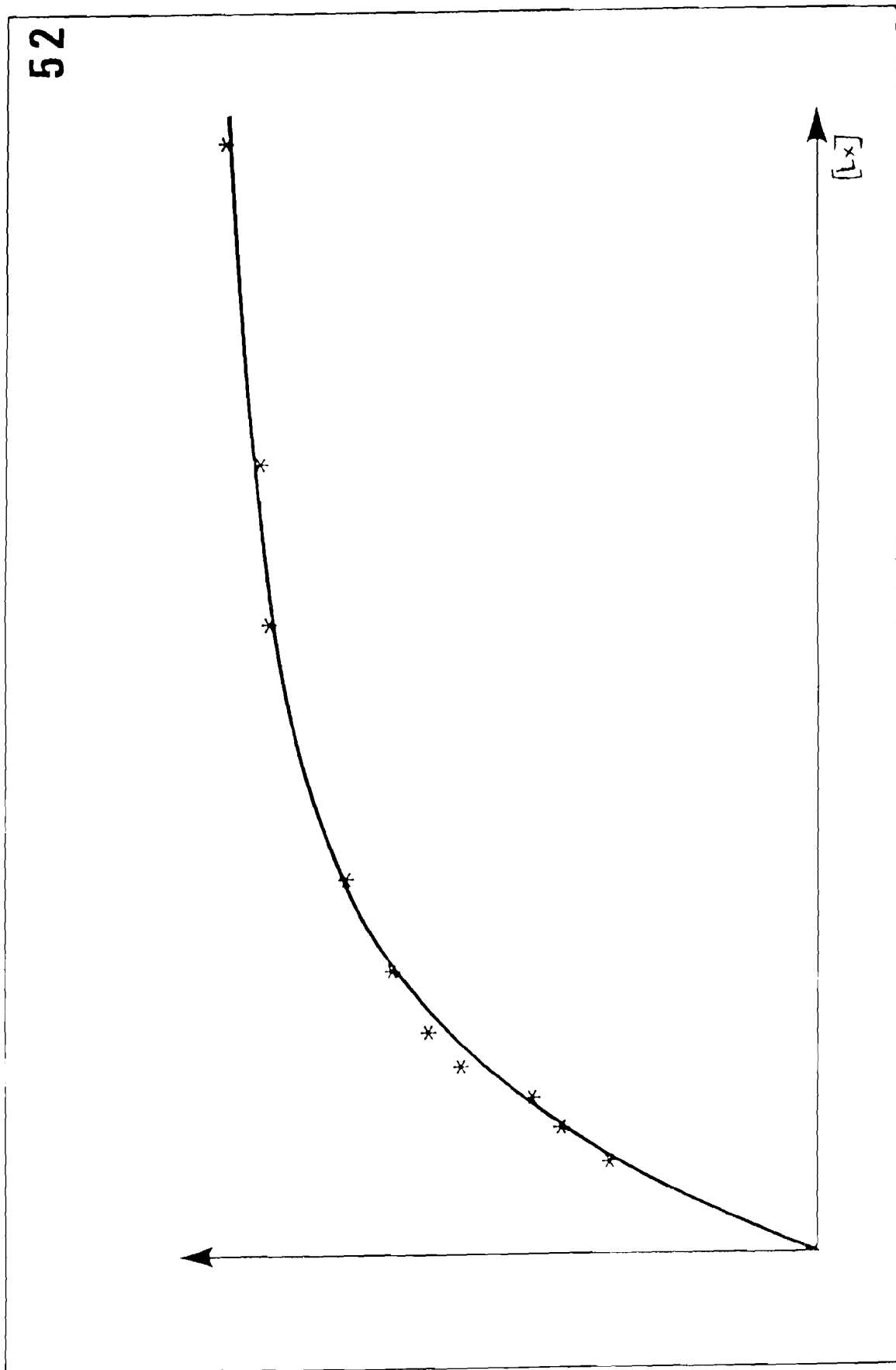
FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PYR (Apple II)



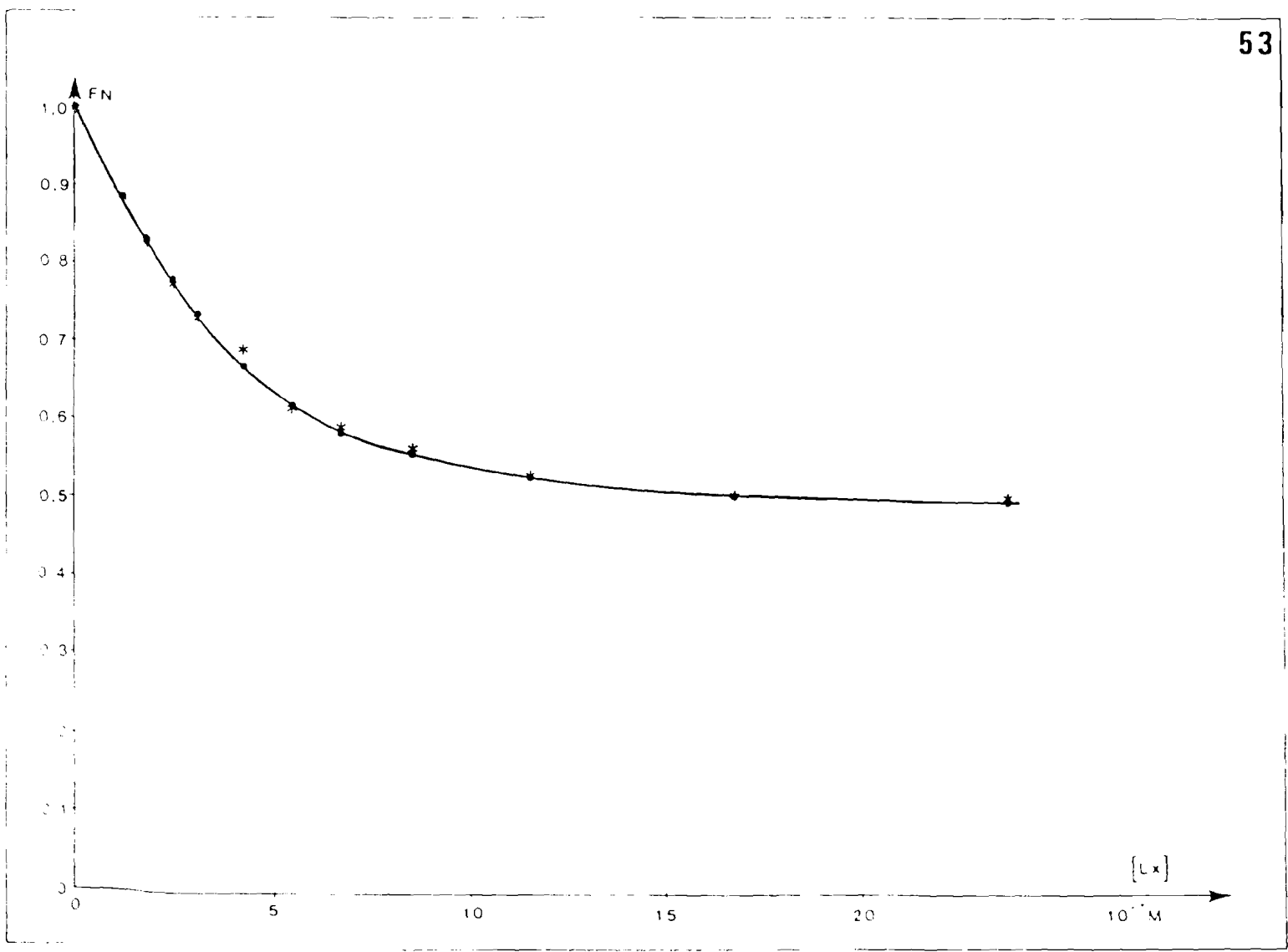
- * Points expérimentaux
- Points théoriques

FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PYR

52

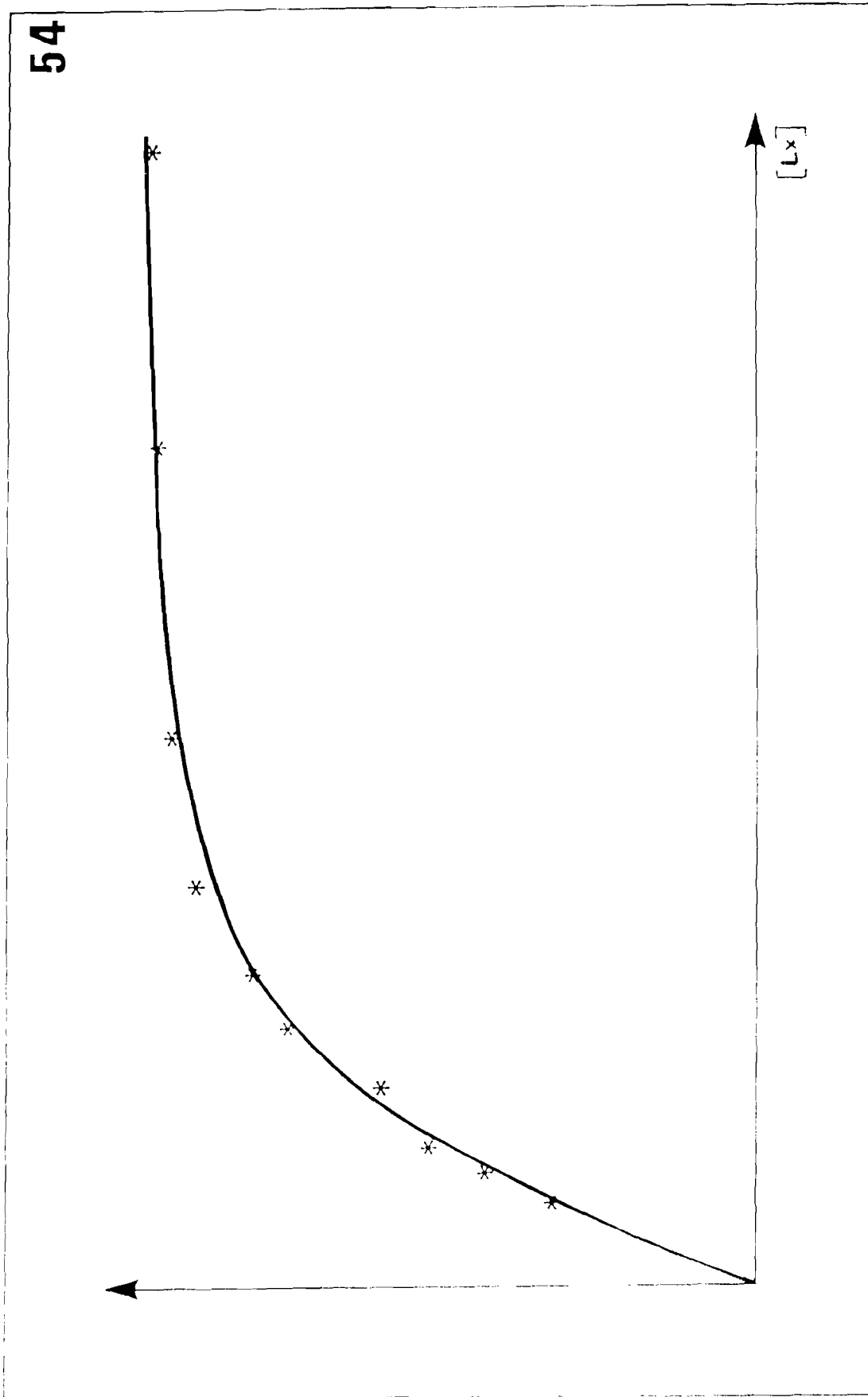


FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PYR (Apple II)



- * Points experimentaux
- Points theoriques

FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PYR



FLUORESCENCE NORMALISEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN DFR (Appl.)

4. DISCUSSION

COMPLEXES BINAIRES

Il faut d'abord remarquer que en ce qui concerne le complexe binaire, pour une même activité spécifique, la quantité de chaleur mesurée en présence d'un excès de ligand, le nombre de sites si on admet un ΔH par site constant varie en fonction de la préparation enzymatique considérée malgré la pureté contrôlée par électrophorèse de celle-ci et varie également en fonction du temps pour une même préparation enzymatique.

Il semble donc que l'on se trouve en présence d'une protéine pure, mais perdant plus ou moins rapidement sa conformation favorable à la fixation du médicament.

Les seules données comparables sont donc celles effectuées sur une même préparation enzymatique le même jour.

VARIATION ENTHALPIQUE

Si on considère le ΔH par site (Q_{sat}/n), il est égal en faisant une moyenne sur six préparations enzymatiques à 35 ± 3 kJ.

CONSTANTE D'AFFINITE

Elle semble être de l'ordre de 10^7 M^{-1} . Il faut remarquer que ces mesures ont été effectuées à un temps variable après la fin de la purification de la protéine, mais jamais inférieur à 48 heures.

Rappelons que dans la littérature il n'est jamais fait mention du temps écoulé avant les mesures qu'il n'existe aucune valeur publiée pour la Pyriméthamine et que le Methotrexate et le Triméthoprime ont

respectivement des constantes d'affinité pour l'enzyme de boeuf de $3.10^8 M^{-1}$ et de $4.10^5 M^{-1}$ (23).

PARAMETRES THERMODYNAMIQUES D'INTER-ACTION

En considérant un ΔH par site de -35 kJ et une constante de $10^7 M^{-1}$ les variations d'énergie libre et d'entropie ont été calculées à partir des relations thermodynamiques classiques :

$$\Delta G = -RT \log K_a$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

La formation du complexe $\text{PYR} - \text{DHFR}$ présente un ΔG par site égal à $-37,8 \text{ kJ}$ et une valeur de ΔS par site égale à $+10 \text{ J.K}^{-1} \cdot \text{site}^{-1}$. Cette valeur légèrement positive pour la variation d'entropie est donc favorable à une réaction plutôt de type entropique et montre que s'est ajouté à des interactions de type électrostatique entre NH^+ protoné et le groupement carboxylique du site protéique, soit une interaction entre les sites hydrophobes de l'enzyme et vraisemblablement le cycle aromatique du médicament, soit un processus de désolvatation ou plus vraisemblablement les deux.

EFFET DE LA DENATURATION DE LA PROTEINE

Alors que l'activité de la protéine reste constante, nous avons signalé la diminution en fonction du temps de certains paramètres d'interaction PYR-DHFR . Il semble donc que la fixation de la seule PYR sur l'enzyme ne puisse être considérée comme le reflet de l'activité enzymatique qui concerne en fait le complexe ternaire DHF-NADPH-DHFR .

COMPLEXES TERNAIRES

Nous considèrerons la fixation de la PYR sur le complexe DHFR/NADPH.

VARIATION ENTHALPIQUE

Le ΔH par site semble légèrement supérieur à celui du complexe binaire puisque la moyenne sur quatre préparations enzymatiques est de $-42 \text{ kJ} \pm 4$.

CONSTANTES D'AFFINITE ET NOMBRE DE SITES

Pour chaque préparation enzymatique, on observe un léger effet coopératif négatif du NADPH vis à vis de la PYR puisque la constante du système ternaire est de l'ordre de $2 \text{ à } 5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Ceci différencie la PYR des autres inhibiteurs tels que le triméthoprime où un effet coopératif positif sur les DHFR bactérienne a été mis en évidence (23). Il faut remarquer qu'une mesure effectuée après un temps de contact plus important entre le NADPH et la DHFR a conduit à une valeur de 10^7 M^{-1} . Il sera donc nécessaire de vérifier ultérieurement l'action du temps de contact entre la protéine et le cofacteur.

Par contre, on observe un nombre de sites légèrement supérieur dans le système ternaire aussi bien par fluorescence que par microcalorimétrie. Citons comme exemples : 0,29 site en binaire devenant 0,36 en ternaire ou 0,47 devenant 0,59.

PARAMETRES THERMODYNAMIQUES DE FORMATION DU COMPLEXE TERNAIRE

En considérant un ΔH par site moyen de -42 kJ et une constante de $3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ la variation ΔG est égale à 35 kJ site^{-1} et la variation ΔS est de $-25 \text{ J.K}^{-1} \text{ site}^{-1}$. La variation entropique est donc défavorable

à la réaction qui est donc de nature enthalpique, la fixation du NADPH favorisant vraisemblablement par changement de conformation, l'interaction entre le NI protonné de la PYR et certains groupements négatifs de l'enzyme qui, pour les autres inhibiteurs (23) sont les groupements carboxyliques de l'aspartate ou du glutamate.

VARIATION OU FONCTION DU TEMPS DES PARAMETRES D'INTERACTION

Lorsque l'activité enzymatique d'une préparation reste constante on n'observe apparemment pas de diminution du ΔH , de la constante ou du nombre de sites pour la fixation de la PYR sur le complexe DHFR/NADPH alors que certains paramètres du complexe binaire ont diminué. Il semble donc d'une part que le coenzyme restaure la conformation favorable à la fixation du médicament et que d'autre part, il y ait une corrélation entre l'activité et la formation du système ternaire donc entre la fixation du substrat naturel et de la PYR.

FIXATION DU NADPH

En ce qui concerne le complexe binaire DHFR/NADPH seule les Q_{sat} ont pu être déterminées ; les faibles chaleurs mesurées surtout pour les défauts de ligand, induisent une grande imprécision dans les mesures microcalorimétriques et ne permettent donc pas une détermination du nombre de sites et donc du ΔH par site.

En ce qui concerne la fixation du NADPH sur le complexe PYR-DHFR, il faut remarquer que la chaleur mesurée Q_{sat} représente à la fois la fixation du NADPH mais également la fixation de la PYR en excès dans le milieu sur les nouveaux sites créés par le NADPH ainsi que le changement de conformation correspondant.

De ce fait, le calcul d'un nombre de sites serait d'une interprétation hasardeuse.

Par contre, il est intéressant de constater que la somme de Q_{sat} pour la formation du complexe ternaire quelque soit l'ordre d'ajout du cofacteur et du médicament est identique. (figure 23).

Ceci permet donc d'assurer que l'état final et donc la conformation du complexe ternaire est donc la même quelque soit la voie d'obtention du complexe.

COMPARAISON AVEC LE METHOTREXATE

Nous avons mis en évidence un phénomène de compétition entre la PYR et le MTX vis à vis de la DHFR, qui était d'ailleurs prévisible.

Par ailleurs, aussi bien la comparaison entre les valeurs de la constante d'affinité pour le MTX et la PYR pour les complexes binaires déterminés par fluorescence sur le même enzyme, le même jour, que le calcul des rapports des constantes réalisées par microcalorimétrie montre que le MTX se lie avec une constante environ vingt fois supérieure à celle de la PYR.

CONCLUSIONS

La Pyriméthamine est un antipaludique à action schizonticide employée depuis les années 1950. Elle inhibe la dihydrofolate réductase qui intervient dans la biosynthèse des bases puriques chez les hématozoaires.

On peut se demander si elle n'exerce pas une action toxique chez l'hôte en inhibant la dihydrofolate réductase de ce dernier.

Notons que l'inhibition se traduit par une réaction équilibrée, obéissant à la loi d'action de masse, entre la Pyriméthamine et la dihydrofolate réductase caractérisée par une constante d'affinité K_a et un nombre de site de liaison n de la protéine.

A notre connaissance des mesures directes des paramètres de liaison de la Pyriméthamine n'ont été réalisées que sur des DHFR de bactéries.

Il était donc logique pour nous de travailler sur la DHFR de boeuf qui ressemble à celle de l'homme et surtout à celle de certaines lignées cellulaires tumorales.

Notre travail a donc porté sur l'étude de l'interaction de la Pyriméthamine avec la DHFR de foie de boeuf par fluorescence et par microcalorimétrie.

Nous avons exposé successivement des généralités sur la Pyriméthamine, sur les DHFR en général puis nous avons rapporté les travaux antérieurs sur l'interaction Pyriméthamine-D.H.F.R. et enfin nous avons présenté nos travaux personnels.

En effet, dans le chapitre premier, nous avons exposé les propriétés chimiques et pharmacologiques de la Pyriméthamine.

Nous retiendrons essentiellement que la Pyriméthamine est un 2,4-diamino-pyrimidine.

C'est un antifolique. L'enzyme cible est responsable de la réduction de l'acide dihydrofolique en acide tétrahydrofolique. Les dérivés tétrahydrofoliques sont des composés qui interviennent dans le transport des radicaux à un atome de carbone lors du métabolisme et de l'interconversion de certains acides aminés dans la biosynthèse des bases puriques et pyrimidiques.

Nous avons exposé la toxicité de la Pyriméthamine, les associations médicamenteuses, son mode d'administration, sa posologie et ses indications.

Dans le paragraphe suivant, nous avons traité du devenir du médicament dans l'organisme. La Pyriméthamine se lie à 87 % aux protéines plasmatiques. La persistance du médicament dans les tissus sera en rapport avec son activité prophylactique.

Les biotransformations se font par une N oxydation en position 3 du noyau pyrimidine et une hydroxylation en position 4 du groupe éthyl.

Le deuxième chapitre se rapporte aux différentes DHRF.

La dihydrofolate réductase représente la cible moléculaire de différentes classes de médicaments, à savoir des anticancéreux, des antibactériens et des antipaludeens. Tous ces médicaments sont des antifoliques.

Nous avons fait état de la distribution de l'enzyme dans les tissus, le foie étant l'un des organes les plus riches. En ce qui concerne la répartition intracellulaire de l'enzyme, sa présence est signalée au niveau

du cytoplasme, des microsomes, du noyau et des mitochondries.

Selon certains auteurs, l'activité spécifique de l'enzyme est en rapport avec sa localisation, et il existerait dans le cas des souches bactériennes des formes d'isoenzymes. D'autre part, il existe une grande ressemblance entre les différentes DHFR issues de diverses souches de *Plasmodium*.

Concernant la purification des DHFR, nous avons rappelé les avantages apportés par la chromatographie d'affinité. Contrairement aux procédés conventionnels de purification présentant un faible rendement la chromatographie d'affinité permet de faciliter grandement la préparation de l'enzyme.

En ce qui concerne la DHFR de *Plasmodium*, sa purification encore très partielle pourrait expliquer la valeur très élevée de la masse moléculaire relevée dans la littérature.

Le paragraphe suivant se rapporte à l'activité enzymatique dont le mécanisme reste assez mal connu. L'activité de l'enzyme est très sensible à la force ionique, à la présence d'agents dénaturants et au pH. Les résidus amino acides suivants : Arg, Lys, Cys, His, Met interviennent spécifiquement dans l'interaction et donc dans l'activité enzymatique et leur blocage par des agents chimiques entraîne l'inhibition de la réaction biochimique. En outre, les résidus fluorophores Trp et Tyr sont aussi impliqués, d'où l'apparition d'une inhibition de fluorescence lors de la fixation des ligands.

Les études spectroscopiques des complexes binaires et ternaires de l'enzyme avec la Pyriméthamine constituent le troisième chapitre.

Nous exposons les résultats des études faites par Fluorescence, Dichroïsme circulaire, Résonance Magnétique Nucléaire, ainsi que par Microcalorimétrie et Dialyse à l'équilibre. Ces études permettent soit de déterminer les paramètres d'interaction soit de préciser la conformation de l'enzyme et les niveaux d'interaction, ainsi que la nature des forces

mises en jeu lors de la liaison DHFR-ligand, aussi bien dans les complexes binaires DHFR-inhibiteur que dans les complexes ternaires DHFR-inhibiteur-coenzyme.

Nous retenons de ces études que :

1. La Pyrimétamine ne protège pas l'enzyme contre une dénaturation contrairement à d'autres antifoliques comme le Méthotrexate,
2. La constante de dissociation du complexe enzyme bactérien-Pyriméthamine est de 10^{-6} M,
3. La constante de dissociation des complexes ternaires se situe entre 4.10^{-7} M et 7.10^{-6} M.

On peut ajouter que la Pyriméthamine semble très différente dans son comportement vis à vis de la D.H.F.R. de bactéries ou de plasmodiums des autres antifoliques tel que le Méthotrexate.

La Pyriméthamine a une affinité pour les deux formes interconvertibles de la D.H.F.R. d'*Escherichia Coli*.

Nos travaux personnels sont exposés dans le chapitre IV.

Après avoir souligné l'intérêt pharmacologique et biochimique de notre travail nous avons décrit l'extraction et la purification de la D.H.F.R. ainsi que la méthodologie des mesures de fluorescence et de microcalorimétrie.

La première de ces techniques nous a permis, pour chaque préparation enzymatique, de déterminer la constante d'affinité et le nombre de sites de fixation de la protéine. L'exploitation des données expérimentales obtenues par fluorescence effectuée suivant deux procédés conduit à des résultats parfaitement concordants.

La Microcalorimétrie nous a permis de déterminer directement

l'ensemble des paramètres thermodynamiques de l'interaction: c'est-à-dire la variation d'enthalpie ΔH , le nombre de site ainsi que le rapport entre les constantes d'affinité de deux compétiteurs. La connaissance de ces paramètres nous a renseigné sur le type des forces mises en jeu et sur le caractère dominant enthalpique ou entropique de celles-ci.

Nous avons utilisé pour les mesures de fluorescence un spectrofluorimètre KONTRON S.M.F. 25 à cuves thermostatables.

L'appareil utilisé en microcalorimétrie est un fluxmètre à circulation Bioactivity Monitor.

Dans le paragraphe suivant, nous avons traité de la méthodologie utilisée.

En ce qui concerne la préparation de la D.H.F.R. nous avons pris comme référence la méthode de KAUFMAN et KEMERER que nous avons modifiée à notre convenance. Cette méthode comprend plusieurs chromatographies :

- une chromatographie d'affinité,
- une filtration sur gel qui permet de dessaler et d'éliminer les protéines qui seraient présentes dans l'éluat de la colonne d'affinité,
- une chromatographie sur hydroxylapatite permettant de séparer deux pics : dont l'un représente la D.H.F.R. seule et l'autre le complexe D.H.F.R.-D.H.F. (D.H.F. provenant de l'élution de la colonne d'affinité).

Nous ne rappellerons pas ici de façon détaillée les différentes méthodes d'obtention et d'évaluation des résultats obtenus aussi bien par microcalorimétrie que par fluorescence faites dans la première partie du chapitre IV.

Les mesures de fluorescence et de microcalorimétrie ont été effectuées à 10°C à pH 6,8. Ces expériences ont permis la détermination

1. En ce qui concerne la fluorescence :

- la fluorescence normalisée F_x de l'enzyme en présence de quantité variable de ligand,
- la fluorescence normalisée résiduelle F_b correspondant à l'enzyme saturée en ligand,
- la fluorescence initiale normalisée $F_0 = 1$ de l'enzyme en l'absence de ligand.

Nous avons ensuite tracé sur la même figure le graphe de la variation de la fluorescence normalisée en fonction de la concentration en ligand et le graphe théorique. Ce dernier est le résultat du traitement des données par une méthode itérative mis au point au Laboratoire. Ceci nous a permis de déterminer la valeur de la constante d'affinité et du nombre de site de l'interaction étudiée.

2. En ce qui concerne la microcalorimétrie, la détermination de la chaleur de réaction en présence d'un excès de ligand par rapport à la D.H.F.R. (environ 10) puis en présence d'un défaut de ligand nous permet de déterminer la variation d'enthalpie et le nombre de site. La constante d'affinité trop importante ici ne peut être déterminée par microcalorimétrie.

Nos principaux résultats ont été les suivants :

En microcalorimétrie

a. Systèmes binaires

- Interaction PYR-DHFR

Le ΔH est constant et égal à $-35,5 \pm 2$ kJ site⁻¹.

La variation d'enthalpie libre par site est de -37 kJ, tandis que le ΔS est égal $+10$ J.K⁻¹ site⁻¹.

- Interaction MTX-DHFR

La chaleur de saturation mesurée est de 32 kJ M⁻¹.

- Conception MTX-PYR

La réaction PYR (en excès) - complexe binaire DHFR + MTX (en excès) est endothermique. Cette chaleur correspond au déplacement d'une partie du méthotrexate lié à l'enzyme et à la chaleur de fixation de la PYR. Il y a donc effectivement compétition entre le Méthotrexate et la Pyriméthamine pour leur liaison avec la DHFR.

- Compétition DHF-PYR

Nous avons montré que la PYR et le DHF sont également compétiteurs pour leur fixation à la D.H.F.R. ce qui était évident étant donné le mode d'action du médicament.

- Interaction NADPH-DHFR

En ce qui concerne le complexe binaire DHFR/NADPH, nous n'avons pas pu calculer le nombre de site de fixation du NADPH étant donné la faible chaleur mesurée lors de la fixation du ligand.

b. Complexes ternaires

- Interaction PYR/DHF + NADPH

La chaleur de saturation mesurée est de $- 22,83 \text{ kJ M}^{-1}$.

Le nombre de site de la PYR est de 0,59.

Si le ΔH par site est de $- 42 \text{ kJ}$, le $\Delta G = - 35 \text{ kJ}$ et le ΔS par site = $- 25 \text{ JK}^{-1}$. Cette variation d'entropie est défavorable à la réaction qui est donc de nature enthalpique.

D'autre part, en microcalorimétrie, nous avons déterminé le rapport entre la constante du MTX et celle de la PYR : ce rapport est égal à 20.

Nous avons pu en réalisant des expériences d'interaction à des temps différents après la fin de la purification, mettre en évidence une diminution du nombre de sites pour le système binaire beaucoup plus importante que pour le système ternaire.

En Fluorescence

a. Systèmes binaire

- Interaction PYR-DHFR

La constante d'affinité est toujours de l'ordre de 10^7 M^{-1} .

Cette constante ne varie pas dans le temps de façon significative.

- Interaction MTX-DHFR

La constante mesurée est de l'ordre de $2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$.

La Pyriméthamine et le Méthotrexate ont à peu près la même "capacité de liaison" nK_a vis à vis de la D.H.F.R.

b. Systèmes ternaires

La constante d'affinité est de l'ordre de $2 \text{ à } 5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$.
On peut donc en déduire un léger effet coopératif négatif du NADPH vis à vis de la PYR.

En conclusion, nous avons pu constater sur le plan fondamental :

1. Au cours de temps, une dénaturation de l'enzyme en ce qui concerne la fixation de PYR.
2. Un effet protecteur possible du coenzyme vis à vis de cette dénaturation et la restauration par le NADPH d'une conformation favorable à une interaction de type électrostatique entre le médicament et l'enzyme.
3. Le fait que l'affinité du médicament (à l'inverse d'autres inhibiteurs de la DHFR pour les enzymes bactériens) est légèrement plus faible pour l'enzyme en présence du cofacteur. Par contre, compte tenu de l'augmentation du nombre de sites, la "capacité totale de liaison" nK_a est à peu près identique.

4. L'absence de corrélation entre les mesures d'activité et les mesures de fixation dans le système binaire alors que cette corrélation se retrouve au niveau du système ternaire.

5. Le peu d'influence de la présence de la PYR vis à vis de la fixation du NADPH.

6. Un phénomène de compétition possible, entre le Méthotrexate et la Pyriméthamine dû à une identité ou à une proximité des sites de fixation.

Par ailleurs, sur le plan pharmacologique, le fait que la constante d'affinité de la PYR soit du même ordre que celle du substrat naturel, l'acide dihydrofolique et soit environ de 20 fois inférieure à celle du MTX, anticancéreux de grande toxicité, poserait évidemment le problème de l'utilisation de la PYR en tant qu'antipaludique notamment en prophylaxie.

Cependant, il est en fait plus juste de comparer les constantes d'affinité des systèmes ternaires ou du fait d'un effet coopératif positif du NADPH pour le MTX et négatif pour la PYR, le rapport des constantes est plus vraisemblablement de l'ordre de 100 à 1000.

Par ailleurs, les phénomènes cinétiques et notamment de transport sont très différents entre le MTX et la PYR pour laquelle ce transport est de type passif. De ce fait, et du fait également au niveau hématologique d'une compétition entre les enzymes de l'hôte et du plasmodium, la concentration de PYR intracellulaire peut être faible par rapport à celle du substrat naturel ce qui diminue l'importance des valeurs relatives des constantes d'affinité. Il serait donc important de pouvoir vérifier directement par des méthodes physico-chimiques si la différence d'affinité entre l'enzyme de l'hôte et du parasite est aussi importante pour la PYR que celle mise en évidence pour le triméthoprime entre les DHFR de mammifères et les DHFR bactériennes.

LU ET APPROUVE
Le Président du Jury
Pr. C. BRIAND

VI M. MARSEILLE LL
Le Doyen
Pr. J.P. CANO

BIBLIOGRAPHIE

- 1 ACTON N., BROSSI A. - Heterocycles 80, 14 (4), 471-476.
- 2 AHMAD R.A., ROGERS H.J. - Br. J. Clin. Pharmacol., 1980;
10 (5), 519-524.
- 3 AHMAD R.A., ROGERS H.J. - Br. J. Clin. Pharmacol., 1981;
11, n° 1, 101-102.
- 4 ALBRECH T.A., PEARCE F.K., SULING W.J., HUTCHISON D.J.
Biochemistry, 1961, 8, 960-967
- 5 BACCARANI D., PHILIP S., SMITH D., BURCHALL J. - Bioche-
mistry, 1975, 14, 5267-5273.
- 6 BACCARANI D., AVERRET D., BURCHALL J. - Biochemistry, 1977
16, 3566-3572
- 7 BACCARANI et al. - Biochemistry 1982, 21, 5068
- 8 BARBARA BIELASKI KITCHELL and ROBERT W. HENKEUS -
Biochimica and biophysica, Acta 1978, 534, 89-98
- 9 BERTINO J.R., ROTH B.A.
The Journal of Biological Chemistry, 1964, 239, n° 2
- 10 BERTINO J.R., SIMMONS B., DONAHUE D.M. - Biochem. Pharma-
col., 1964, 13, 225-228
- 11 BERTINO J.R., CASHMORE A. - Clin. Pharmacol. Ther. 1965,
6, 763-770.

- 12 BIRDSALL B., GRIFFITHS D.V. - FEBS Lett., 1977, 80, 313-316.
- 13 BIRDSALL B., BURGEN A.S. - Biochemistry 1978, 17, 11, 2102-2110
- 14 BIRDSALL et al. - Biochemistry, 1980, 19, 3723.
- 15 BLOUNT R.E. - Ann. Inter. Med. 1969, 70, 142-147
- 16 BRAGANCA B.M., KENKARE - Acta Uni. Intern. contre Cancer, 1964, 20, 980-986
- 17 BRIAN K.K. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 4985-4989
- 18 BROWN S.S., NEAL G.E., WILLIAMS D.C. - Biochem. J. 1965 97, 34-37
- 19 CAVALLITO J.C., NICHOL C.A. - Drug metabolism and disposition 1978, 6, n° 3
- 20 CAYLEY P.J., DUNN S.M.J., KING R.W., COCCO L., BLAKLEY R., WALKER T. - Biophys. Biochem. Res. Comm. 1977, 76, 183-189
- 21 CHEMOTHERAPY AND DRUG RESISTANCE IN MALARIA - Academic Press London 1980
- 22 CHEMOTHERAPY AND DRUG RESISTANCE - Academic Press London, 1970
- 23 COCCO L., BARBARA R. - Archives of Biochemistry and Biophysics, 1983, 226, 2, 567-577
- 24 DE ANGELIS R.L. et al. - Journal of chromatography, 1975, 106, 41-49
- 25 DELCAMP J.T., SUSTEN S.S., BLANKEN SHIF D.T., FREISHEIM J.H. Biochemistry, 1983, 22, 633-639

- 26 **DONNO L., G. VACATURO**- Current therapeutic research, 1980, 27, 3
- 27 **DOBERSTYN E.B., PHINTUYOTHIN P.** - Bulletin of the world health organisation, 1979, 57 (2), 275-279
- 28 **DUNNS M.J., BATCHELOR J.G., KING R.W.** - Biochemistry 1978, 17, 2, 2356-2364
- 29 **EASTHAM G.M., RIECKMAN K.H.** - Transaction of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene 1983, 77, 1, 91-93
- 30 **FUTTERMAN S.** - J. Biol. Chem., 1957, 228, 1031-1038
- 31 **GREENFIELD N.J., WILLIAMS M.N., POE M., HOOGSKEN K.** Biochemistry 1972, 11, 4706-4712
- 32 **GRIGNANIF, MARTELLI M.F., TOMATO M., FINZI A.F.** - Arch. Dermatol., 1967, 96, 577-581
- 33 **HANGAI V.J., LITTLE FIELD J.W.** - J. Biol.Chem., 1976, 251, 3075-3080
- 34 **HENRY J.A., DUNLOP A.W., MITCHELL S.N., TURNER P.** J. Pharm. Pharmacol., 1981, 33, 3, 179-182
- 35 **HILL G.J., KNIGHT V., JEFFERY G.M.** - Lancet, 1, 1967, 240-241
- 36 **HUBELL J.M., HENNING M.L.** - Biological Oxidation of Nitrogen J.W. Gorrod Ed.
- 37 **HUENNEKENS F.M., SCRIMGEDUR K.D.** - In Pteridin chemistry 1964, 355-376, Pergamon N.Y.
- 38 **JAMA**, 1969, 207 : 128-130
- 39 **JILL E. GREADY** - Advances in Pharmacology and Chemotherapy Vol. 17, 37-102

- 40 JONES C.R., OVENELL S.M. - Journal of Chromatography, 1979, 163, 179-185
- 41 JOSEPH R. ROBERTINO, BARBARA A. BROTH, ALLAN L. BIEBER - The Journal of Biological Chemistry, 1964, 239, 2
- 42 KAN S.C., SIDDIQUI W.A. - J. Protozol. 1969, 26 (4) ; 660-664
- 43 KARSENTY G., N.C. GORIN P. - La nouvelle presse médicale, 2980, 9, n° 36
- 44 KAUFMAN B.T., KEMERER V.F. - Arch. Biochem. Biophys. 1976, 172, 259-264
- 45 KAUFMAN B.T., GARDNER R.C. - J. Biol. Chem., 1966, 241, 1319-1324
- 46 KAUFMAN B.T., GARDNER R.C. - Federation, Proc., 1965, 24, 541-548
- 47 KAUFMAN H.E., GEISLER P.H. - Arch. Ophtal., 1960, 64, 140-141
- 48 KATHRYN H. PATTISHALL, JAMES J., BURCHALL - The Journal of Biological Chemistry, 1976, 251 (22), 7011-7020
- 49 KELLEMS R.E., NORHEN V.B., PFENDT E.A., ALT F.W., SCHIMKE R.J. - J. Biol. Chem., 1979, 254, 309-318
- 50 KOUZNETSOV R. - Bulletin of the World Health Organization 1979, 57 (4), 535-539
- 51 LAI D.H., PAN Y.C., GLEISNER, PETERSCH D.L., WILLIAMSK.R. BLAKEY R.L. - Biochemistry, 1982, 21, 3284-3294
- 52 MATTEWS D.A., ALDEN R.A., BOLIN J.T., FREER S.T., HAMLIN R. J. Biol. Chem., 1978, 253, 6946-6954

- 53 MICHELE CHAUVET - Thèse Doctorat 3e cycle Spécialité Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Marseille 9 Juin 1983
- 54 MYATT A.V., HERMANDEZ T., COATNEY E.R. - Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1953, 2, 788-795
- 55 NIXON P.F., BLAKEY R.L. - J. Biol. Chem., 1968, 243, 4722-4731
- 56 NIXON P.F. - Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 1975, 5, 35-41.
- 57 NICHOL C.M., CAVALLITO J.C. - Cancer treatment reports, 1977
61, 4, 559-564
- 58 NORMA J. GREENFIELD - Biochemica et Biophysica Acta 1975, 40:
32-46
- 59 PHARMACO RESISTANCE DE PLASMODIUM FALCIPARUM
Série de rapports techniques n° 680, 27-28, O.M.S. Genève 1982
- 60 RAAD A. AHMAD et coll. - Br. J. Clin. Pharmacol., 1978, 8,
112-118.
- 61 ROBERT et HALL - Proc. Am. Assoc. Canc. Res. 1963, 4, 57-61.
- 62 ROBERT FERONE - Bulletin of the world health organisation,
1977, 55 (2-3), 291-292
- 63 ROSMOKY et KELLAN - J. Chem. S.A., 1969, 1208
- 64 SETTMIDT L.H. - The American Journal of Tropical Medicine
and Hygiene Vol. 26, n° 5, Part I.
- 65 SHIMODA M., KOKUE E. - J. Vet. Pharmacol. Ther., 81, 4 (2), 165-170
- 66 SMITH and IHRIG - Am. J. Trop. Med. Hyg., 1959, 8: 60

- 67 SUBRAMANIAN S., BERNARD T. KAUFMAN - Proc. Natl. Acad. Sciences, 1978, 79 (7), 3201-3205.
- 68 SUSAN M.J. DUNN, JOHN G. BATCHELOR - Biochemistry, 1978, 17, 12, 2356-2364
- 69 SUSAN M.J., DUNN and RODNEY W. KING - Biochemistry, 1980, 19, 766-773
- 70 STICKNEY D.R. et al. - Proceedings of the American Association for Cancer Research, 1973, 14 : 52
- 71 TEN PAS A., ABRAHAM J.P. - Amer. J. Med. Sci., 1965, 249, 448-453
- 72 TIMN U., WEIDEKAN E. - Journal of Chromatography, 1982, 230, 107-114
- 73 TOMATO M., MARTELLI M.F., MORETTINI D., GRIGNANIF. Enzymol.Biol. Clin., 1967, 8, 209-215
- 74 VOLZ K., MATTEW D., ALDEN R., FIEER S., HANSCH C., KAUFMAN B., KRANT J. - J. Biol. Chem., (1982), 257, 25-28
- 75 WALTER H. WERNSDORFER - Chronique O.M.S., 1983, 37 (1), 12-1
- 76 WAXMAN S., HERBERT V. - New Eng. J. Med., 1969, 280, 1316-1319
- 77 WIEDEKAMN E., PLOZZA H. - Bulletin of the world health Organisat. 1982, 60 (1), 115-122
- 78 WIEDMANN M., CUMMING S.F., KAPLAN H., SPRENUCCI E. DOOLITTLE C., CALABRESI P. - Canc. Res., 1982, 42, 3896-3900
- 79 WILLIAM R., GRECO, MAIRE T. HAKALA - The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1980, 212, 1, 39-46

- 80 **WILLIAM R. GRECO and MAIRE T. HAKALA** - Molecular
Pharmacology, 1980, 18, 521-528
- 81 **WONG F.K., KOCH J., STOKSTAD E.L.** - Biochemistry, 1967,
346-358
- 82 **ZELIKSON R., LUZZATIM** - Eur. J. Biochem., 1977, 79, 285-292

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>CHAPITRE I - LA PYRIMETHAMINE</u>	
STRUCTURE CHIMIQUE	4
PROPRIETS PHYSICO-CHIMIQUES	6
MECANISME D'ACTION	9
TOXICITE DE LA PYRIMETHAMINE	17
MEDICAMENTS ASSOCIES	17
MODE D'ADMINISTRATION, POSOLOGIE, INDICATIONS	17
PHARMACOCINETIQUE	18
<u>CHAPITRE II - LES DIHYDROFOLATE REDUCTASES</u>	
DISTRIBUTION DE L'ENZYME	24
PURIFICATION DE L'ENZYME	25
PROPRIETES DE L'ENZYME	26
ACTIVITE ENZYMATIQUE	26
<u>CHAPITRE III - TRAVAUX ANTERIEURS</u>	
FLUORESCENCE	31
DICHROISME CIRCULAIRE	32
MICROCALORIMETRIE	34
RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE	36
DIALYSE A L'EQUILIBRE	36
<u>CHAPITRE IV - TRAVAUX PERSONNELS</u>	
OBJET DU TRAVAIL	41
APPAREILLAGES ET TECHNIQUES	43
- Appareillages	43
- Produits	48
- Méthodologie	52
- Mesures de microcalorimétrie	65
- Mesures de fluorescence	68
- Méthodes d'exploitation des données expérimentales	76
RESULTATS	82
DISCUSSION	133
<u>CONCLUSION</u>	138
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	1 à VII