

Caractérisation du polymorphisme de métallothionéines par CZE-DAD

G. Bordin, V. Virtanen et A.R. Rodriguez

Commission Européenne, Centre Commun de Recherche - IRMM, Retieseweg, 2440 Geel, Belgique

Capillary zone electrophoresis (CZE) with UV detection using a photodiode array (PDA) is shown to be an attractive technique for the characterization of the polymorphism of metallothionein. The PDA allows the assignment of a peak to an isoform complexing a metal, and the evaluation of the degree of complexation. Analytical parameters affect iso- and sub-isoforms in a different way indicating thus their different physicochemical characteristics.

Introduction : métallothionéines et électrophorèse capillaire

Les métallothionéines (MT) forment une classe de protéines de bas poids moléculaires (6–7 kDa), ubiquistes dans le monde animal. Elles sont caractérisées par une teneur élevée de cystéine (~30%), ce qui leur confère un fort pouvoir complexant vis-à-vis de certains cations métalliques tels que Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} ou Hg^{2+} . À travers la formation de thiolates métalliques organisés en deux domaines et , les MT exercent, entre autres, d'importantes fonctions biologiques à la fois dans l'homéostasie de certains éléments essentiels

comme le zinc et le cuivre, et dans les mécanismes de détoxification d'éléments hautement toxiques comme le cadmium et le mercure. Les caractéristiques et les propriétés physico-chimiques des MT, ainsi que leurs rôles au niveau biologique ont fait l'objet de plusieurs monographies dont la plus récente date de 1993 [1].

Dans de nombreuses espèces, on a montré l'existence d'isoformes de MT (isoMT) qui ne diffèrent que par la substitution d'un ou plusieurs acides aminés autres que les résidus cystéiniques qui conservent eux des positions stables. Chez les mammifères, deux isoMT principales ont été identifiées, MT-1 et MT-2, ainsi nommées en raison de leur ordre d'éluion en chromatographie d'échange d'anions. Ces deux isoformes sont le produit de deux gènes distincts [1]. Plus récemment, deux nouvelles isoformes, MT-3 et MT-4, ont été identifiées respectivement et spécifiquement dans des tissus cérébraux et linguaux de mammifères [2-3].

Par ailleurs, il a été montré que chez de nombreux animaux, et en particulier chez les mammifères, les isoformes MT-1 et MT-2 pouvaient être constituées de plusieurs sous-isoformes (sous-isoMT). En conséquence, « l'arbre » 1 MT n (1) iso MT m (n) sous-isoMT révèle qu'il peut y avoir une grande variabilité de polymorphisme dans ces métalloprotéines.

Si les fonctions biologiques des MT sont aujourd'hui assez bien connues dans leur globalité, il n'en va pas de

même en ce qui concerne celles, plus spécifiques, des isoformes et des sous-isoformes. Dans ce domaine, les progrès sont fortement tributaires du développement de méthodes analytiques performantes qui doivent permettre de séparer, d'identifier et de quantifier chacune des formes présentes.

À côté des méthodes fondées sur l'utilisation de la chromatographie de partage à polarité de phases inversée (RP-HPLC) qui conservent tout leur intérêt [1], celles qui se développent sur les principes de l'électrophorèse capillaire (CE) connaissent depuis quelques années un essor tout à fait justifié [e.g. 4-6]. L'électrophorèse capillaire de zone (CZE) et la chromatographie électrocinétique micellaire capillaire (MECC) ont ainsi fait l'objet de plusieurs études d'application à la séparation d'isoMT et de sous-isoMT, soit en utilisant des colonnes capillaires en silice fondue, soit des colonnes capillaires greffées. Les nombreux résultats issus de ces travaux restent cependant très partiels.

De manière générale, les techniques d'électrophorèse capillaire présentent de nombreux avantages, parmi lesquels la possibilité d'un grand choix dans la composition des électrolytes y compris à des pH extrêmes, des temps d'analyse réduits, le besoin de très petits volumes d'échantillons et de faibles quantités de réactifs et une grande automatisation instrumentale [7].

Dans notre laboratoire, nous contribuons depuis plusieurs années aux études du polymorphisme de MT, à la fois par RP-HPLC [8-10] et par CZE [11-13]. Les résultats les plus significatifs des travaux mettant en oeuvre la CZE sont présentés et résumés dans le présent article. L'objectif essentiel de nos recherches est le développement d'une méthode rapide et sensible permettant la séparation des isoMT et sous-isoMT dans un capillaire en silice fondue. Bien que les capillaires greffés permettent parfois de meilleures séparations [14], l'utilisation de capillaires à surface non modifiée se justifie dans de nombreux cas [15]. Par ailleurs, les capillaires greffés ont une durée de vie plus courte, sont plus fragiles et plus chers que ceux dont la surface n'a pas subi de modification.

Si les travaux cités précédemment démontrent la grande adéquation entre l'utilisation des techniques de CE et l'objectif recherché dans le cas des MT, aucun d'eux ne décrit

de façon systématique les effets du changement des divers paramètres analytiques fondamentaux que sont la composition et la concentration de l'électrolyte, le pH ou la température sur le flux électrosmotique et sur la mobilité électrophorétique des différentes molécules à séparer. Ces données sont pourtant essentielles pour la compréhension de l'influence spécifique de chaque paramètre sur la séparation des isoformes d'une MT et donc pour l'obtention de plus d'informations sur les différences de caractéristiques chimiques de chaque isoMT ou sous-isoMT prise individuellement. La même observation vaut pour ce qui concerne l'addition de solvants organiques à l'électrolyte. Nous nous sommes donc attachés à étudier en profondeur ces divers facteurs analytiques.

Du point de vue de la détection, nous avons d'abord utilisé un spectrophotomètre d'absorbance UV à longueur d'onde fixe, qui est sans aucun doute le mode de détection le plus universel et le plus commun qui soit, mais également l'un des moins spécifiques. Nous lui avons donc ensuite substitué un détecteur à barrettes de diodes (DAD) qui permet un enregistrement en ligne du spectre d'absorbance UV de chaque composé séparé lors de l'électrophorèse. Ces informations se révèlent très utiles dans le cas de molécules du type MT, puisque la liaison métal-thiolate entraîne l'existence de spectres d'absorbance différents en fonction du métal, avec un pic d'absorbance maximale à $\lambda = 230$ nm pour Zn-S, 250 nm pour Cd-S et 270 nm pour Cu-S. On a ainsi directement accès à une première caractérisation métallique de chaque isoMT ou sous-isoMT.

Séparations en milieu tampon Tris-borate

Les MT étudiées, extraites de foie de lapin (RL) et de rein de cheval (HK) (Co. Sigma), ont d'abord été soumises à la CZE en milieu tampon équimolaire Tris-borate (110 mM, pH 6.9) [11]. La figure 1 montre les électrophérogrammes de HK (1A) et de RL (1B) avec respectivement trois et deux pics principaux.

En CZE, les composés migrent en fonction de leur rapport charge sur masse. Entre autres paramètres analytiques,

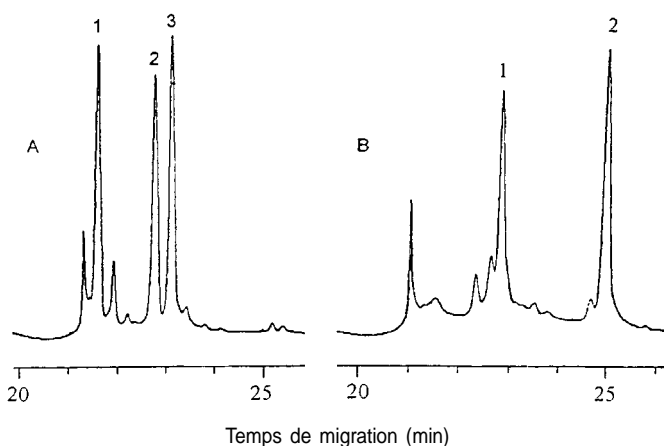


Figure 1. Electrophérogrammes des métallothionéines de rein de cheval HK A) et de foie de lapin RL B) obtenus par CZE en milieu tampon équimolaire Tris-borate 110 mM, pH 6,90, 11 kV, 20 °C, détection UV à $\lambda = 200$ nm, capillaire 75 μ m (D.I.).

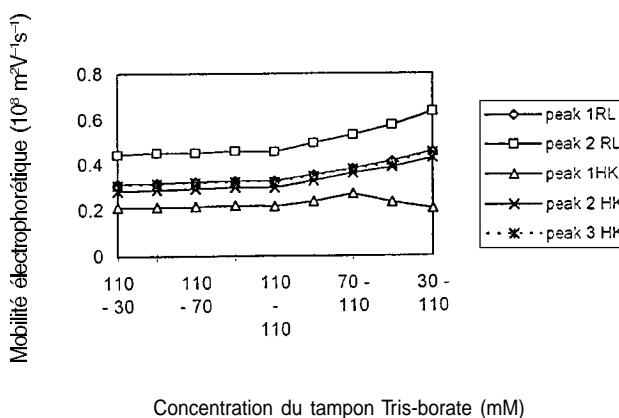


Figure 2. Evolution de la mobilité électrophorétique ($10^8 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) des pics principaux des deux MT en fonction de la composition de la solution tampon. Conditions expérimentales identiques à celles de la figure 1.

la force ionique de l'électrolyte et le pH sont donc particulièrement fondamentaux. Une modification de la concentration du tampon fera décroître ou augmenter le flux électroosmotique (EOF) et, par conséquent, décroître ou augmenter les temps de migration. De même, un accroissement du pH, favorisant la dissociation des groupements SiOH du capillaire, fera augmenter la mobilité électroosmotique μ_{eo} . Les résultats que nous avons obtenus sont ainsi tout à fait en accord avec la théorie.

La température joue également un rôle important : lorsqu'elle augmente, la viscosité de la solution tampon diminue, ce qui résulte en une augmentation de μ_{eo} et en une diminution des temps de migration des diverses espèces. La résolution des pics est donc naturellement affectée. La température de 20 °C apparaît comme le meilleur compromis possible [11]. Une augmentation de la tension appliquée provoque également un accroissement de la mobilité électroosmotique μ_{eo} .

Ces divers paramètres influent aussi sur les mobilités électrophorétiques μ_{ep} des isoMT et des sous-isoMT mais de manière parfois différente suivant l'espèce considérée. Par exemple, la figure 2 montre l'influence de la composition de la solution tampon : quand le Tris est en excès, les mobilités électrophorétiques restent constantes, mais dès que la concentration en borate devient supérieure à celle du Tris, on observe un accroissement des mobilités, à l'exception de celle du pic 1 de HK. La variation du pH montre un effet très semblable.

Addition d'un solvant organique (MeOH) à la solution tampon

Il augmente la viscosité du tampon et induit des variations de constante diélectrique conduisant à une diminution de la mobilité électroosmotique et des mobilités électrophorétiques des isoformes et donc à une élévation des temps de migration. Mais, parallèlement, la présence du solvant organique améliore notablement la qualité des séparations comme le montre la figure 3, qu'il est intéressant de com-

parer à la figure 1. Pour la MT de foie de lapin (Fig. 3B), en plus des deux pics principaux 1 et 2, l'addition de méthanol révèle la présence de deux petits pics (a et b) qui auparavant comigraient avec les pics principaux (Fig. 1B) : dans ce dernier cas, deux opérations étaient nécessaires avec des conditions analytiques différentes, pour atteindre le résultat illustré sur la figure 3B [11,12]. Quant à la MT de rein de cheval (Fig. 3A), l'addition de MeOH provoque un dédoublement de deux des trois pics principaux (2 et 3), le phénomène s'accroissant avec l'augmentation de la quantité de solvant ajouté. Ces nouveaux pics ne signifient cependant pas nécessairement la résolution de formes additionnelles, mais peut-être la visualisation de modifications conformationnelles d'isoformes déjà résolues.

L'utilisation du détecteur DAD permet en tout cas de lever certaines ambiguïtés sur la nature même de quelques pics. Pour un échantillon de HK soumis aux conditions de la figure 1A, le spectre UV des pics 2 ou 3 est tout à fait typique de celui d'une MT contenant du Cd et du Zn, alors que celui du pic 1, ainsi que des petits pics adjacents, est parfaitement caractéristique d'une apothionéine, c'est-à-dire d'une MT sans métal. Ce dernier résultat est *a priori* étonnant dans la mesure où l'on s'attend à ne rencontrer les apothionéines qu'en milieu acide. En conséquence, nos observations expérimentales montrent clairement que la distribution des cations métalliques au sein de la MT considérée n'est pas uniforme entre les diverses isoMT et sous-isoMT.

Séparations en milieu tampon Tris-tricine

Une série d'expériences semblable à celle présentée précédemment a été réalisée en milieu Tris-tricine, avec ou sans méthanol, pour la MT de foie de lapin. Dans les conditions optimisées, le milieu Tris-tricine-MeOH conduit à de meilleures séparations que celles obtenues en milieu Tris-borate-MeOH (voir Fig. 3B). On note ainsi une bien meilleure résolution des pics 1 et a d'une part et 2 et b de l'autre [13]. Là encore, l'addition de méthanol dans une proportion de 30 à 40% favorise grandement la résolution d'espèces qui autrement migrent ensemble.

Identification des isoformes principales

La figure 4 représente les électrophérogrammes de la MT de foie de lapin (4A) et de ses deux isoformes MT-1 (4B) et MT-2 (4C), obtenus en milieu Tris-tricine. On constate d'abord une contamination croisée des deux isoformes, résultat probable d'une purification incomplète : les pics 9 et 10 de la figure 4B (MT-1) sont très certainement un résidu de MT-2 alors que les pics 4 et 5 de la figure 4C (MT-2) proviennent de MT-1. Par ailleurs, la MT qui est un « mélange » de MT-1 et MT-2 contient plusieurs pics (5, 8, 11) que l'on ne trouve dans aucune des deux isoformes. Le pic 5, l'un des deux plus importants de la MT, n'est pas assimilable au pic 4 de MT-1 comme l'ont montré des expériences d'additions croisées (MT + MT-1) tant en milieu Tris-borate que Tris-tricine [11,13]. Malgré tout, les spectres UV de ces pics spécifiques à la MT ont tous les

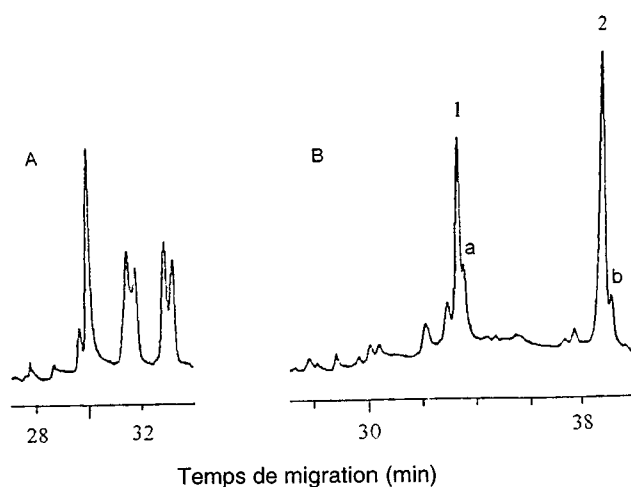


Figure 3 : Electrophérogrammes des métallothionéines de rein de cheval HK (A) et de foie de lapin RL (B) en milieu tampon équimolaire Tris-borate 110 mM + 40 % de MeOH, pH 6,70, 22,5 kV, 20 °C, détection UV à $\lambda = 200$ nm, capillaire 50 μ m (D.I.).

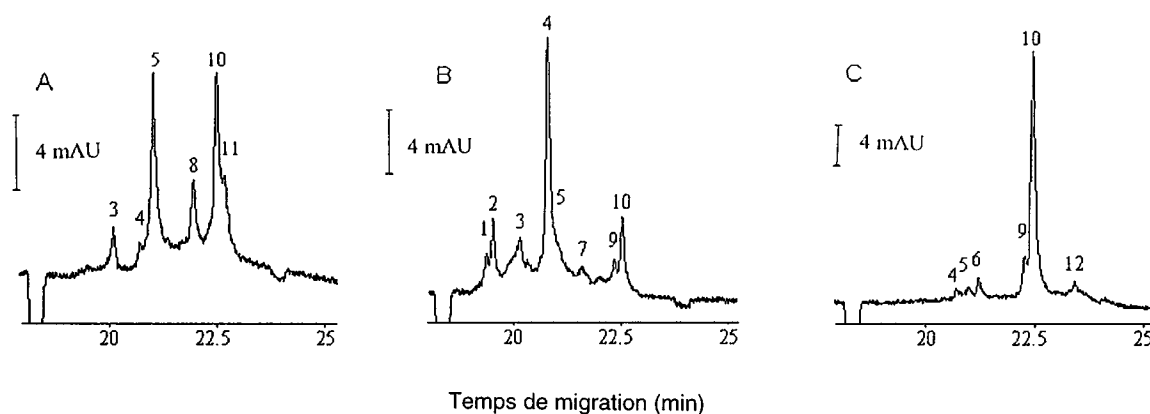


Figure 4. Electrophérogrammes de la métallothionéine de foie de lapin A) et de ses deux isoformes MT-1 B) et MT-2 C) en milieu tampon équimolaire Tris-tricine 150 mM, pH 7,75, 10 kV, 15 °C, détection UV à $\lambda = 200$ nm, capillaire 50 μ m (D.I.).

caractéristiques de thiolates métalliques. Le pic 5 en particulier montre les épaulements à 225 – 230 nm et 250 – 255 nm indiquant respectivement des liaisons thiol-Zn et thiol-Cd. Le pic 10 de MT (Fig. 4A) correspond à la contribution directe de MT-2. Certains des pics non communs pourraient peut-être correspondre à des isoMT ou sous-isoMT modifiées après oxydation, dimérisation ou polymérisation entre autres possibilités, mais seules des études plus ciblées de ces formes (avec détection par spectrométrie de masse par exemple) permettront sans doute de trancher.

Conclusion

Nos travaux confirment tout l'intérêt qu'il peut y avoir à utiliser l'électrophorèse capillaire de zone pour la caractérisation de biomolécules aussi complexes que les métallothionéines. Une méthode assez simple a été développée faisant appel à un capillaire en silice fondue non greffé et à une détection par UV-DAD. On a pu montrer que les paramètres analytiques principaux (concentration du tampon, pH, température...) affectaient parfois différemment les isoMT et sous-isoMT, indiquant ainsi des caractéristiques chimiques individuelles distinctes. L'addition d'un solvant organique améliore fortement la résolution des séparations. La détection par DAD permet de caractériser immédiatement la nature d'un pic en tant qu'isoforme complexée par tel et/ou tel métal, forme totalement ou partiellement complexée, apo-isoforme, forme modifiée, etc. L'ensemble de ces résultats constitue une intéressante contribution à la connaissance du polymorphisme très différent de deux MT extraites de tissus de mammifères.

Références

1. *Metallothionein III*, Suzuki K. T.; Imura, N.; Kimura, M. Eds., Birkhauser Verlag, Basel, 1993.
2. Uchida, Y.; Takio, K.; Titani, K.; Ihara, Y.; Tomonaga, M. *Neuron* **1991**, 7, 337-347.
3. Quaife, C. J.; Findley, S. D.; Erickson, J. C.; Froelick, G. J.; Kelly, E. J.; Zambrowicz, B. P.; Palmiter, R. D. *Biochemistry* **1994**, 33, 7250.
4. Beattie, J. H.; Richards, M. P.; Self, R. *J. Chromatogr.* **1993**, 632, 127-135.
5. Beattie, J. H.; Richards, M. P. *J. Chromatogr. A* **1995**, 700, 95-103.
6. Minami, T.; Matsubara, M.; O-higashi, M.; Otaki, N.; Kimura, M.; Kubo, K.; Okabe, N.; Okazaki, Y. *J. Chromatogr. B* **1996**, 685, 353.
7. Kuhn, R.; Hoffstetter-Kuhn, S. *Capillary Electrophoresis: Principles and Practise*, Springer-Verlag, Berlin, 1993.
8. Bordin, G.; Cordeiro Raposo, F.; Rodriguez, A. R. *Can. J. Chem.* **1994**, 72, 1238-1245.
9. Bordin, G.; Cordeiro Raposo, F.; Rodriguez, A. R. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **1996**, 19(19), 3085-3104.
10. Bordin, G.; Cordeiro Raposo, F.; Rodriguez, A. R. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **1998** (in press).
11. Virtanen, V.; Bordin, G.; Rodriguez, A. R. *J. Chromatogr. A* **1996**, 734, 391-400.
12. Virtanen, V.; Bordin, G.; Rodriguez, A. R. *Chromatographia* **1998** (accepted for publication).
13. Virtanen, V.; Bordin, G.; Rodriguez, A. R. *Anal. Chim. Acta* **1998** (in press).
14. Richards, M. *J. Chromatogr. B* **1994**, 657, 345-355.
15. Beattie, J. *Talanta* **1998** (in press).