

Etude par Résonance Magnétique Nuclaire de Molécules à Intérêt Thérapeutique et Biologique Etude des Interactions Entre les Hormones Thyroïdiennes et les Proteins Sériques*

Biyolojik Kökenli ve Tedavide Kullanılan Bileşiklerin Nükleer Manyetik Resonans ile İncelenmesi / Serum Proteinleri ve Tiroid Hormonları Arasındaki Etkileşimlerin İncelenmesi

Tuncel ÖZDEN**

Alain RABARON***

Michel PLAT***

La mesure des temps de relaxation spin-spin T_1 des protons par RMN du ^1H permet d'étudier les interactions de liaison entre des macromolécules biologiques comme les proteins sériques et des ligands d'origine biologique ou médicamenteuse (1).

Afin d'illustrer les applications de cette méthode nous avons enterpris l'étude des interactions entre hormones thyroïdiennes particulièrement la thyroxine et les protéines sériques de transport telles que l'albumine et les γ -globulines.

Il est en effet démontré depuis plusieurs années que la thyroxine est transportée dans la sang sous une forme liée à certaines fractions protéines (2). Il est admis aujourd'hui que trois protéines plasmatiques sont susceptibles de fixer la thyroxine avec des constantes d'affinité élevées-d'ordre de 10^{11} /mole (3).

- une inter γ -globuline: la thyroxine-binding-globuline ou T,B,G.

- une préalbumine: la thvroxine-binding-préalbumine ou T.B.P.A.

Redaksiyona verildiği tarih: 24 Kasım 1980

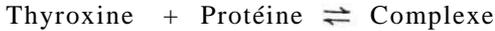
* dans le cadre du "Diplome d'Etudes Pharmaceutiques Specialisees de Chimie Thérapeutique" par Tuncel ÖZDEN, 1977

** Farmasötik Kimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi

*** Université de Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry, Department de Pharmacie Chimique

- l'albumine

L'optimum de ces protéines à fixer les hormones thyroïdiennes suivant des réactions d'équilibre dépend d'une part de la concentration plasmatique de la protéine et d'autre part de la constante d'affinité de la réaction.



Bien que présentes en très faibles quantités dans le sérum (10-30 mg/l), la purification et la séparation de ces trois protéines a fait l'objet ces dernières années de nombreux travaux analysés dans une revue récente (4).

La but de ce travail est l'étude du mécanisme de la liaison thyroxine-protéine de transport par mesure des variations des temps de relaxation T_2 des protons aromatiques de la thyroxine en présence de macromolécule protéique.

METHODES

Les spectres de RMN de solutions de thyroxine et de protéines dans D_2O à pH contrôlé ont été enregistrés sur des spectromètres VARIAN T60A, en onde continue en VARIAN CFT 20 par transformée de Fourier à 80 MHz. En onde continue la vitesse de balayage était de 0.2 Hz/s. En transformée de Fourier, les spectres sont enregistrés sur 8K, une échelle de 600 Hz avec des impulsions de 90° suivies d'un temps de récupération de 9 secondes, afin d'améliorer le rapport signal/bruit. La résonance du solvant a été supprimée par la méthode d'inversion-recouvrement avec un temps d'attente fixe de 2.2 secondes entre les impulsions à 180° et à 90° .

Les largeurs à mi-hauteur $\Delta\nu_{1/2}$ sont mesurées en Hz sur les pics convenablement étalés et les temps de relaxation T_2 déterminés par la relation:

$$T_2 = \frac{1}{\pi \cdot \Delta\nu_{1/2}} \text{ en secondes}$$

Compte tenu des différents paramètres influençant le temps de relaxation T_2 et la précision des mesures de $\Delta\nu_{1/2}$ l'imprécision sur les T_2 est estimée à $\pm 10\%$.

La mesure des temps de relaxation T_2 observés permet le calcul du temps de relaxation spin-milieu par la relation simple:

$$T_1 = T_2$$

En effet en solution et pour les faibles concentration utilisées la plupart des vérifications effectuées démontrent que T_1 et T_2 sont sensiblement égaux.

Toutes les solutions sont réalisées dans D_2O 99.5 % additionnée de quelques gouttes de NaOD N, la thyroxine étant beaucoup plus soluble en milieu alcalin et en présence de protéines.

Les concentrations en thyroxine sont exprimées en moles/l M et les concentrations en protéine en pourcentage.

Les produits utilisés sont les produits commerciaux Sigma: L-thyroxine, albumin humaine et γ -globuline humaine HGII.

Les valeurs reportées constituent des moyennes de 3 à 4 déterminations séparées.

Les valeurs de pH sont déterminées sur Radiometer RHM 62 et non corrigées de l'effet isotopique de D_2O (+0.4).

Le spectre de RMN d'une solution 0.01 M de thyroxine dans pH: 11.8 D_2O est représenté Figure 1.

Après deutération des protons échangeables on observe deux signaux singulets à bas champs 7.71 ppm et 7.13 ppm, attribués respectivement aux protons H_a et H_b compte tenu de l'effet de blindage supplémentaire du pont oxygène sur les protons H_b . A 2.81 ppm le proton H_a et à 1.65 ppm les deux protons H_b .

L'aspect singulet des signaux des protons H_a et H_b permet une détermination plus aisée de leur largeurs à mi hauteur et par conséquent des temps de relaxation T_1 .

Les largeurs à mi-hauteur sont mesurées sur du spectres étalés à l'échelle de 0.2 Hz/mm en veillant à éviter toute saturation du signal ($H_1 = 0.05$ mG). Seuls les T_1 des protons aromatiques ont pu être mesurés avec une précision convenable.

Influence des γ - globulins

Les Tableaux I et II rassemblent les résultats observés pour différentes concentration de γ - globulins, tandis-que la Figure: II représente la courbe de variation de T_2 des protons H_a et H_b en fonction de la concentration en protéine.

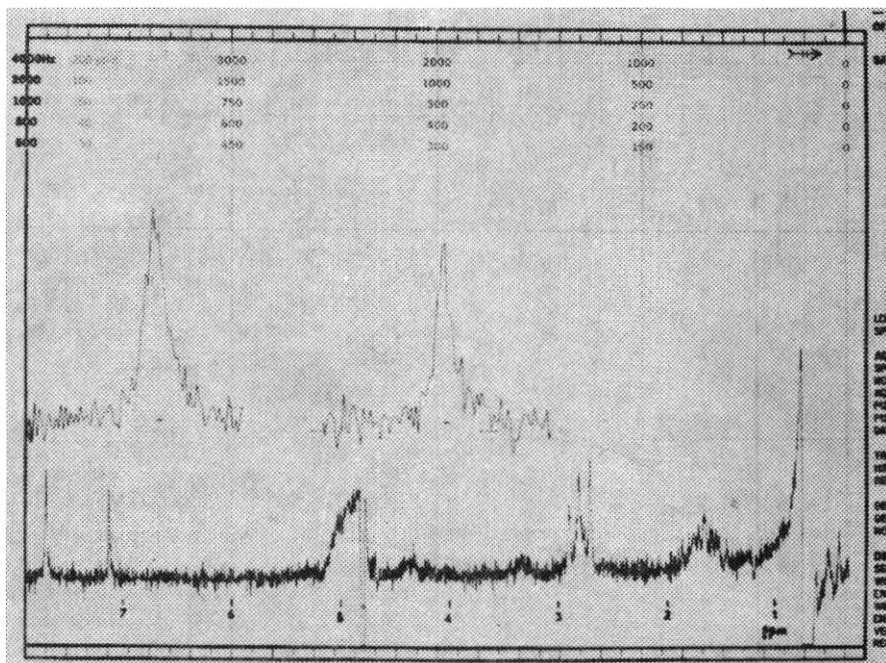
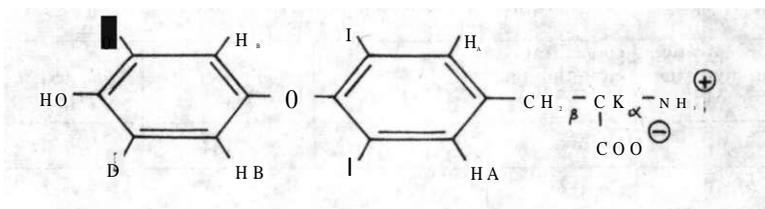


Fig. 1: Le Spectre RMN de Thyroxine dans D₂O

Tableau I: Mesures sur T60A

concentration en thyroxine M	concentration en globu- line %	pH	1 / T ₁ sec ⁻¹ HA	1 / T ₁ sec ⁻¹ HB
0.05	0.5	11.2	2.83	4.09
0.05	1.0	11.2	3.77	4.71
0.05	1.5	11.2	4.40	5.65
0.05	2.0	11.2	5.65	6.29
0.05	2.5	11.2	6.29	7.23

Tableau II: Mesures sur CFT 20

concentration en thyroxine M	concentration en γ -globuline %	pH	$1/T_2$ sec ⁻¹ H _A	$1/T_2$ sec ⁻¹ H _B
0.01	0.5	11.2	7.54	7.54
0.01	1.0	11.2	9.11	9.11
0.01	1.5	11.2	10.05	10.69
0.01	2.0	11.2	10.70	12.57
0.01	2.5	11.2	11.31	13.83

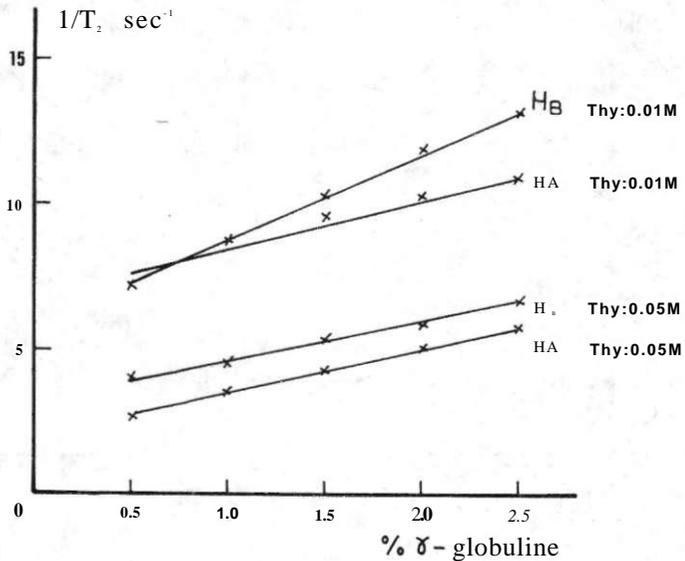


Fig. II: Courbe de variation de T2 des protons HA et H_B en fonction de la concentration en γ -globuline

Influence de l'albumine

Les Tableaux III et IV rassemblant les résultats observés pour différentes concentrations d'albumine, tandis que Figure III représente la courbe de variation des protons H_A et H_B en fonction de la concentration en protéine.

Tableau III : Mesures sur T6o A

concentration en thyroxine M	concentration en albumine %	pH	1/T ₂ , sec ⁻¹ H _A	1/T ₁ , sec ⁻¹ H _A
0.05		11.2	4.09	5.34
0.05	1.0	11.2	4.81	6.02
0.05	1.5	11.2	6.90	7.85
0.05	2.0	11.2	7.86	9.11
0.05	2.5	11.2	8.80	10.37

Tableau IV: Mesures sur CFT20

concentration en thyroxine M	concentration en albumine %	pH	1/T ₂ , sec ⁻¹ H _A	1/T ₁ , sec ⁻¹ H _A
0.01		11.2	9.42	10.70
0.01	1.0	11.2	11.00	12.57
0.01	1.5	11.2	13.83	15.40
0.01	2.0	11.2	16.66	17.91
0.01	2.5	11.2	19.80	20.75

Modele d'interaction thyroxine-albumine

Pour expliquer quantitativement l'influence des proteines sériques sur les T₂ de la thyroxine on peut proposer la modèle cinétique suivant: les molécules de thyroxine existent en solution soit à l'état libre soit à l'état lié avec un équilibre dynamique régit par la loi d'actions masse:



$$K_A = \frac{[\text{TA}]}{[\text{T}] \cdot [\text{A}]}$$

ou [T] et [A] sont les concentrations en thyroxine et en albumine libre et K_A la constante d'affinité.

L'aspect en RMN d'un signal dépendra des valeurs respectives de ses vitesses de relaxation à l'état libre, à l'état lié et de la vitesse de l'échange.

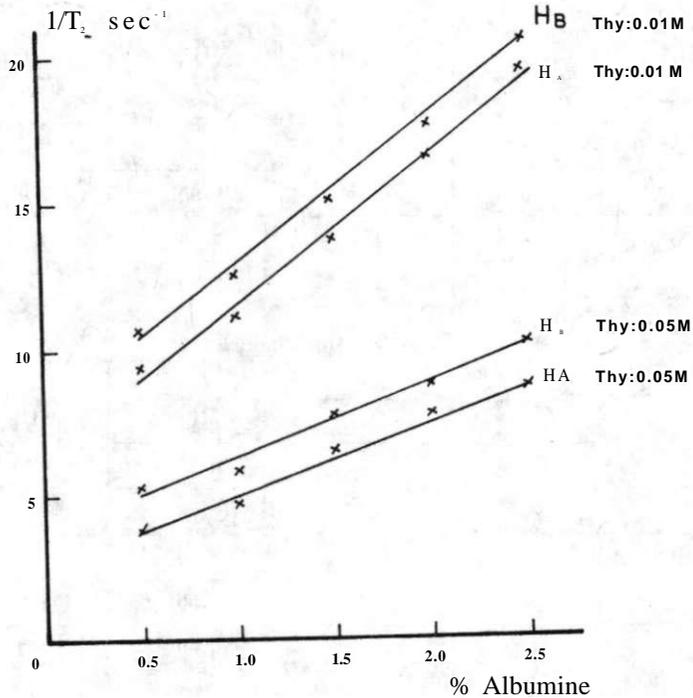


Fig. III : Courbe de variation des T, des protons H_A et H_B en fonction de la concentration en albumine



(a) Si $(1/T)_{\text{ech}} < (1/T)_{\text{libre}} < (1/T)_{\text{lié}}$

L'échange étant très lent en observera deux signaux correspondant aux protons des molécules libres et des molécules liées: l'un étroit, l'autre très large.

(b) Si $(1/T)_{\text{libre}} < (1/T)_{\text{ech}} < (1/T)_{\text{lié}}$

Les molécules libres n'auront pas le temps de relaxer dans l'état libre car l'échange intervient; comme les molécules libres sont en large excès, le temps de relaxation sera indépendant de la concentration en albumine et sera fonction des valeurs respectives de $(1/T)_{\text{libre}}$ et de $(1/T)_{\text{ech}}$ les signaux auront donc tous même $\Delta\nu_{1/2}$ condition que la température soit constante.

c) Si l'échange est rapide par rapport aux processus de relaxation :

$$(1/T)_{\text{libre}} < (1/T)_{\text{lié}} < (1/T)_{\text{éch.}}$$

Le temps de relaxation mesuré sera une moyenne pondérée de $(1/T)_{\text{libre}}$ et de $(1/T)_{\text{lié}}$. On observera donc un seul signal dont la largeur à mi-hauteur variera avec la concentration en protéine C, est ce qui est observé dans le cas de thyroxine.

$$(1/T)_{\text{obs}} = x (1/T)_{\text{lié}} + (1-x) (1/T)_{\text{libre}}$$

$$\text{ou } x = \frac{\text{thyroxine liée}}{\text{thyroxine libre}}$$

$$x = \frac{[TA]}{[T] + [TA]}$$

le temps de relaxation mesuré dépend donc de deux facteurs inconnus, x taux de ligand lié et $(1/T)_{\text{lié}}$

En calculant x par la loi d'action-masse on peut déterminer $(1/T)_{\text{lié}}$. Dans certains cas il est également possible de calculer K_A .

Détermination de $(1/T)_{\text{lié}}$

Pour déterminer $(1/T)_{\text{lié}}$ à partir de l'équation

$$(1/T)_{\text{obs}} = x (1/T)_{\text{lié}} + (1-x) (1/T)_{\text{libre}}$$

x peut être calculé à partir de la relation d'équilibre.

$$K_A = \frac{[AT]}{[A] \cdot [T]}$$

des concentrations en albumine et en thyroxine: soient a et t les concentrations totales d'albumine et de thyroxine.

la concentration en albumine libre $[A] = a - [AT]$

la concentration en thyroxine libre $[T] = t - [AT]$

d'où $[A] \cdot [T] = \frac{[AT]}{K_A}$ devient

$$(a - [AT]) (t - [AT]) - \frac{[AT]}{K_A} = 0$$

$$[AT]^2 - (a + t + 1/K_A) [AT] + at = 0$$

La valeur de $[AT]$ cherchée est la racine de cette équation du 2^{ème} degré telle que $[AT] < a$.

Connaisant $[AT]$ on a $x = \frac{[AT]}{t}$ puis $(1/T)_{lié}$

$$(1/T)_{lié} = \frac{1}{x} [(1/T)_{obs} - (1/T)_{libre} + x (1/T)_{libre}]$$

Les valeurs de $(1/T)_{lié}$ sont déterminées pour H_A et pour H_B à partir de 3 mesures expérimentales. Le tableau V résume les calculs et utilise comme valeur de $K_A = 1.6 \cdot 10^5$ à pH: 11.2 la constante d'affinité K_A est dix fois plus faible que la constante K_A à pH: 7.4 qui est connue et à pour valeur.

$K_A^{7.4} = 1.6 \times 10^6$ (5) On peut toutefois remarquer que dans les calculs K_A intervient seulement au niveau du paramètre $(a + t + 1/K_A)$ et que des variations même importantes de K_A ne modifient pratiquement pas le paramètre, ce qui justifie l'approximation précédente.

$$H_A (1/T)_{libre} = 4.40 \quad (1/T)_{lié} = 425 \text{ (multiplié par 97)}$$

$$H_B (1/T)_{libre} = 3.61 \quad (1/T)_{lié} = 567 \text{ (multiplié par 157)}$$

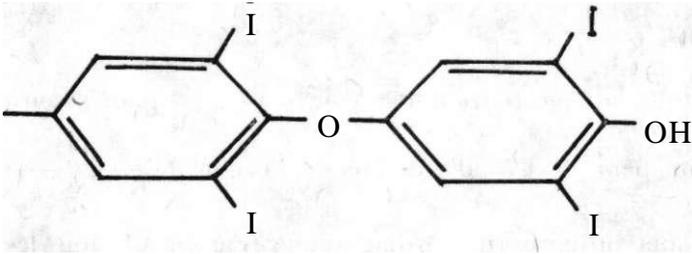
Le tableau V révèle les faits suivants: aux concentrations utilisées l'albumine est pratiquement saturée $AT \approx a$, alors que 1.5 à 3 % de la thyroxine est liée à l'albumine. Malgré les imprécisions de certaines mesures on retrouve des valeurs de $(1/T)_{lié}$ peu étalées.

Le coefficient multiplicateur est plus grand pour les protons H_B ce qui indique que le premier noyau est impliqué dans une interaction avec la chaîne polypeptidique beaucoup plus rigide que le second noyau qui porte les H_A .

Cette interaction est donc hydrophobe et fait intervenir les forces de Van der Waals d'un site de liaison dont la géométrie épouserait la structure spéciale du reste.

Méthode de détermination de K_A per RMN

La mesure des temps de relaxation $1/T_2$ des protons d'un ligand en présence de macromolécule permet la détermination de la constante d'affinité à deux conditions:



1) Il est nécessaire de connaître la nombre de moles de ligand liées à une mole de macro molécule ; dans le cas da complexe thyroxine-albumine humaine ce nombre est connu et égal à 1 (6).

2) La gamme de concentrations accessibles par RMN compte tenu des valeurs habituelles des sensibilités et rapport signal/bruit des appareils actuels ne permet pas de descendre en dessous de 10^{-3} M de ligand (cas des appareils à transformée de Fourier). Il en résulta que l'on ne peut mesurer par RMN que des K_A de l'ordre de 10^3 .

En appelant respectivement a et $[A]$ les concentrations en albumine totale et libre et t et $[T]$ les concentrations en thyroxine totale et libre la loi d'action-masse s'écrit:

$$[A] \cdot [T] = \frac{[AT]}{K_A} \text{ soit } [a - [AT]] [t - [AT]] = \frac{[AT]}{K_A}$$

$$(a - xt) (t - xt) = \frac{xt}{K_A}$$

$$at - axt - xt^2 - x^2 t^2 = \frac{xt}{K_A}$$

division part xt

$$\frac{a}{x} - a - t + xt = \frac{1}{K_A}$$

$$t (x-1) = \frac{1}{K_A} + \frac{a}{x} (x-1)$$

division par (x-1)

$$t = \frac{1}{K_A (x-1)} + \frac{a}{x}$$

Cette relation montre que la courbe $t f(a, x)$ pour x constant est

un droite peut $1/x$ et d'ordonnée à l'origine $\frac{1}{K_A (x-1)}$.

Si donc on porte sur un diagramme (Figure III) tous les points (a, t) qui ont la même valeur de x donc la même valeur de $(1/T_2)_{\text{observé}}$ et la même largeur à mi hauteur on doit constater que ces points sont alignés: la pente de la droite permet de calculer x qui est d'ailleurs très inférieure à 1 si bien que la combe coupe l'axe vertical au point $-1/K_A$.

À titre d'exemple les droites correspondant aux valeurs $1/T = 8.5, 9, 9.5, 10 \text{ sec}^{-1}$ ont été tracées pour H_A et H_B toutefois comme on ne dispose que de 2 points expérimentaux par droite et que la valeur prévue de K_A se trouve en dehors de la fouchette des valeurs mesurables par RMN les résultats susceptibles d'être retirés de ces combes ne sont pas significatifs.

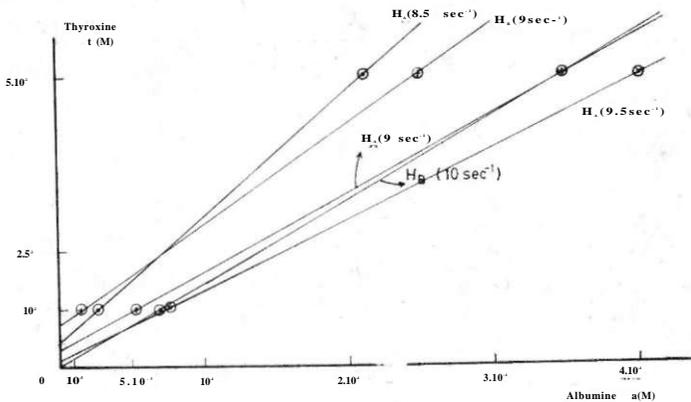


Fig. IV

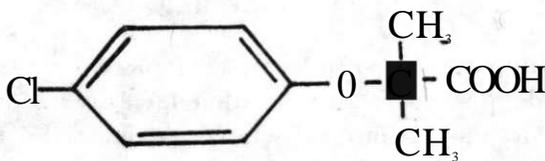
Ainsi pour une valeur de $1/T_2 = 10 \text{ sec}^{-1}$ soit $T_2 = 0.1 \text{ sec}$: la droite $t = f(a)$ a pour expression

$$t = 1,45 \cdot 10^2 a - 9,1 \cdot 10^{-4}$$

d'où l'on tire la valeur de $x = 1/1,45 \cdot 10^2 = 7 \cdot 10^{-3}$ et la valeur de $K_A = -1 / -9,1 \cdot 10^{-4} = 1100$

Etude de la Compétition Clofibrate-Thyroxine au Niveau du Site de Liaison

L'un des buts recherchés dans ce travail était la mise en évidence d'une compétition entre le Clofibrate (on plus exactement l'acide clofibrrique obtenu par hydrolyse de la fraction ester) et la L-thyroxine au niveau du site de liaison de la thyroxine sur l'albumine, l'acide clofibrrique étant connu comme se liant spécifiquement à l'albumine (7).



Acide Clofibrrique

A cet effet nous enregistrons les spectres de RMN d'une solution de thyroxine 10^{-2} M et d'albumine 1 % en présence de quantités croissantes d'acide clofibrrique et déterminé les temps de relaxation T_2 des protons H_A et H_B de la thyroxine. Aucune variation sensible des valeurs de T_2 n'a pu être mise en évidence comme le montre le Tableau VI.

Tableau: VI

concentration en acide clofibrrique M	HA 1/T sec ⁻¹	HB 1/T sec ⁻¹
0.05	5.97	7.01
0.10	5.97	7.00
0.30	5.80	6.91
0.40	5.35	6.57

Ces résultats indiquent que la constante d'affinité K_A de l'acide dofibrigue est inférieure à celle de la thyroxine; car dans le cas contraire la plus forte affinité de la protéine pour l'acide clofibrigue l'enporterait et il en résulterait un abaissement du taux de thyroxine liée à la protéine $x = AT/t$ donc une diminution de $1/T$ observé.

Les valeurs publiées dans la littérature sont d'ailleurs en accord avec cette conclusion (8) :

Thyroxine	pH = 7.4	$K_A = 1,6 \cdot 10^5$
Clofibrate		$K_A = 1,3 \cdot 10^6$

On ne peut donc pas avancer que l'action hypolipémiante du clofibrate proviendrait d'une libération de thyroxine libre dans la plasma.

CONCLUSION et RESUME

Le présent travail constitue un exemple simple des possibilités d'utilisation des paramètres de relaxation nucléaire mesurés par RMN dans l'étude des interactions entre molécules à activité thérapeutique et macromolécules biologiques.

Il a permis d'une part la mise au point de la méthode expérimentale et d'autre part la mise en lumière des avantages et des limites de la RMN dans ce domaine.

Parmi les avantages on retiendra que la mesure de ces paramètres: RMN s'effectue sans perturbation de l'équilibre biologique et permet la mesure des faibles constantes d'affinité avec une précision convenable. Parmi les inconvénients figurent les problèmes de solubilité et de concentration nécessaires pour une mesure valable de ces paramètres. L'arrivée sur le marché des spectromètres à transformée de Fourier, des microcellules et des filtres à bande latérale unique devrait permet d'atténuer considérablement ces inconvénients et par l'étude de solution 10^{-5} à 10^{-3} M de mesurer des K_A de l'ordre de 10^6 - 10^4 .

ÖZET

Bu çalışmada, biyolojik veya ilaç olarak kullanılan bileşikler ile biyolojik makromoleküller arasındaki etkileşim NMR spektroskopisi

ile incelenmiştir. Örnek olarak bir tiroid hormonu olan tiroksin ele alınmış ve bu bileşiğin NMR spektrumundaki aromatik protonların relaksasyon zamanlarından yararlanılarak kanda hangi protein fraksiyonu tarafından taşındığı ve bu taşınma sırasındaki ilaç-makromolekül bağlanma mekanizması ortaya konulmaya çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu bileşiğin kanda albumine bağlanarak taşındığı tesbitlenmiş ve mekanizması verilmiştir.

Yine ilgili protonların relaksasyon zamanlarından hareketle tiroksinin affinite sabitesi de bulunmuştur.

Elde edilen tüm sonuçların biyolojik deneyler sonucu bulunanlarla idantik olduğu gözlenmiştir.

Ayrıca makromoleküle bağlanma bölgesi seviyesinde tiroksin ile klofibrat arasındaki kompetisyon da araştırılmıştır.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- **Jardetsky, O.:** *Adv. Chem. Phys.*, 1964, **7**, 499
- 2- **Trevorrow, V.:** *J. Biol. Chem.*, 1939, **127**, 737
- 3- **Robbins, J., Rall, J. E.:** *Physiol. Revs.*, 1960, **40**, 415
- 4- **Lacureil, M., Lacureil, N., Crouzat-Reynes, G.:** *Lyon Pharm.*, 1977, 223
- 5- **Putnam, F. W.:** *The Plasma Proteins, Vol;1, Acai. Press* 1975 pp. 156
- 6- **Steiner, R. F., Roth, J., Robbins, J.:** *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 560
- 7- **Barrett, A. M., Thorp, J. M.:** *Br. J. Pharmac. Chemotherap.*, 1968, **32**, 381
- 8- **Spector, A., Santos, A., Ashbrook, J. D., Fletcher, J. E.:** *Annal. JV. T. Acad. Sci.*, 1973, **226**, 247