

# La (bio)chromatographie pour la reconnaissance moléculaire

## Une méthode d'analyse efficace

Claire André

**Résumé** La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est un outil puissant pour étudier la reconnaissance moléculaire, notamment le mécanisme d'association entre un xénobiotique et une molécule cible, avec des applications biopharmaceutiques et médicales. Cet article présente à titre d'exemple comment la biochromatographie a permis d'appréhender les mécanismes d'association de divers xénobiotiques (rodenticides, médicaments, fullerènes...) avec différents récepteurs potentiels présents dans l'environnement, comme l'acide humique, ou chez l'homme comme la membrane cellulaire *via* une membrane artificielle immobilisée et l'arginase, une enzyme du cycle de l'urée.

**Mots-clés** **Chromatographie liquide haute performance (CLHP), reconnaissance moléculaire, acide humique, membrane artificielle immobilisée, thermodynamique.**

**Abstract** **(Bio)chromatography: an efficient tool for molecular recognition**  
High performance liquid chromatography (HPLC) is an efficient tool to study molecular recognition mechanism and more specifically the association between a xenobiotic and a target molecule with the aim of reaching biopharmaceutic and clinical applications. As an illustration, this article explains how biochromatography has been able to grasp the association mechanisms of various xenobiotics (rodenticides, drugs, fullerenes...) with various potential receptors present in the environment, as humic acid, or in man such as the cellular membrane thanks to the development of an immobilized artificial membrane and the arginase enzyme of the urea cycle.

**Keywords** **High performance liquid chromatography (HPLC), molecular recognition, humic acid, immobilized artificial membrane, thermodynamic.**

L'activité de recherche que je conduis au sein du Laboratoire de chimie analytique de l'équipe « Sciences séparatives et biopharmaceutiques » s'articule tout particulièrement autour de la chromatographie liquide haute performance (CLHP). Mon premier axe de recherche concerne la valorisation et la mise au point de nouvelles phases stationnaires pour la séparation de molécules dans un mélange. Ceci a conduit à la synthèse de nouveaux sélecteurs chiraux immobilisés sur un support chromatographique pour la séparation des énantiomères de pharmaco-molécules ou de pesticides. Je me suis également intéressée, dans un deuxième axe de recherche, à montrer que la CLHP permettait non seulement d'optimiser la séparation de composés dans un mélange, mais aussi que c'était un outil puissant pour analyser le mécanisme d'association entre un xénobiotique et une molécule cible (reconnaissance moléculaire), avec des applications biopharmaceutiques et médicales. J'ai choisi de ne traiter dans cet article que cette deuxième thématique de recherche et de présenter à titre d'exemple comment la biochromatographie m'a permis d'appréhender les mécanismes d'association de divers xénobiotiques (rodenticides, médicaments, fullerènes...) avec différents récepteurs potentiels présents chez l'homme ou dans l'environnement tels que :

- l'acide humique (AH), principale matière organique du sol adsorbant de nombreux pesticides et pouvant leur servir de véhicule dans l'eau (en cas de lessivage des sols par exemple) ;

- la membrane cellulaire *via* une membrane artificielle immobilisée (MAI), principale barrière du passage des xénobiotiques dans les cellules ;  
- l'arginase, enzyme du cycle de l'urée, cible potentielle contre l'hypertension artérielle.

### Analyse du processus de fixation de pesticides sur l'acide humique

La connaissance des interactions entre le sol et/ou ses constituants et les pesticides permet de mieux appréhender le devenir des polluants organiques (comme les pesticides), et notamment la contamination des eaux naturelles par ces substances. Plusieurs facteurs jouent un rôle important dans la rétention des pesticides par le sol : d'une part des caractéristiques intrinsèques des sols, et d'autre part, des propriétés des pesticides. Les propriétés des pesticides impliquées sont, d'après de nombreux auteurs, leur caractère hydrophobe et leur degré d'ionisation [1-2]. Concernant les propriétés des sols, la majorité des auteurs soulignent l'importance de la matière organique, du pH et de la température [3-4].

### Structure de l'acide humique

L'acide humique (AH) est une macromolécule de nature polymère dont la structure diffère selon son origine, mais la

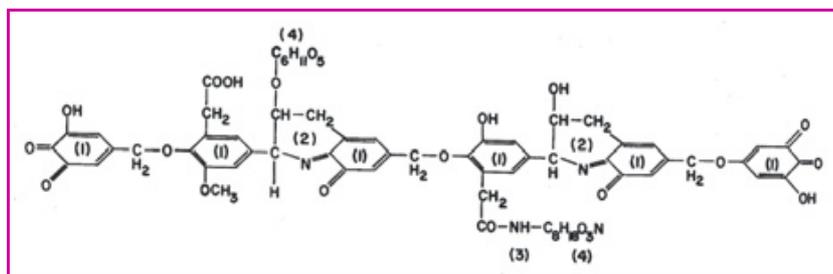


Figure 1 - Modèle de structure de l'acide humique (AH).

plupart des AH sont constitués d'unités de base similaires et de groupements fonctionnels proches de ceux du modèle proposé figure 1 [5-7].

Leur grand pouvoir de combinaison avec les molécules organiques (tels les pesticides) est essentiellement dû à la proportion élevée de groupements fonctionnels oxygénés incluant des groupements carboxyliques (-COOH), hydroxyles aliphatiques (-OH) et carbonyles (C=O) [7]. D'autres fonctions peuvent intervenir comme des groupements amines, imines, etc.

**Les pesticides analysés : les rodenticides**

Les rodenticides sont utilisés pour lutter contre la prolifération des rongeurs. On peut distinguer deux grands types en fonction du temps écoulé entre la prise du poison par le rongeur et la mort qui s'en suit :

- les rodenticides aigus, lorsque les symptômes interviennent rapidement après l'ingestion ;
- les rodenticides chroniques, lorsqu'il existe un décalage de plusieurs jours entre l'ingestion et l'effet toxique. Ceux-ci sont divisés en deux classes, en fonction de leur structure chimique de base :

- les anticoagulants dérivant d'une structure chimique indane-dione, dits anticoagulants de première génération. À titre d'exemple, les structures chimiques du chlorophacinone et du diphacinone ainsi que leurs utilisations sont donnés dans le tableau I ;
- les anticoagulants de seconde génération, qui dérivent tous d'une structure coumarinique (voir tableau I). Tous ces rodenticides sont nettement plus persistants dans l'organisme que ceux de première génération et leurs doses létales sont beaucoup plus faibles, de sorte que leurs effets toxiques peuvent être obtenus après ingestion d'un seul repas.

L'inconvénient majeur des anticoagulants est leur toxicité pour l'ensemble des vertébrés, toxicité variable selon l'espèce et le produit. Les animaux peuvent s'intoxiquer directement en consommant le poison [8] ou indirectement en s'alimentant de bêtes mourantes ou fraîchement mortes suite à l'ingestion de rodenticides [9-14]. Par exemple dans la région de Franche-Comté, on estime que l'utilisation abusive de la bromadiolone a provoqué la diminution de 70 % du milan royal, espèce pourtant protégée et menacée. La bromadiolone est maintenant régie et autorisée

par l'arrêté ministériel du 29 janvier 2003. Des conditions d'emploi sont fixées, qui sont censées empêcher les pratiques les plus dangereuses pour notre environnement. Mais très peu de données existent sur le devenir de ces

Tableau I - Structures chimiques et utilisations de deux rodenticides de première génération et de quatre rodenticides de deuxième génération.

Rodenticides	Structures chimiques	Utilisation
<b>de première génération</b>		
Chlorophacinone		Campagnol des champs, mulot et rat musqué Efficacité insuffisante contre souris et rat noir
Diphacinone		Campagnol des champs et mulot Efficacité insuffisante contre souris et rat noir
<b>de deuxième génération</b>		
Bromadiolone		Campagnol terrestre, rat et souris Absence de résistance
Brodifacoum		Mulot, rat et souris Absence de résistance
Difénacoum		Campagnol terrestre, mulot, rat noir, souris et surmulot Absence de résistance
Warfarine		Surmulot Nombreuses résistances

pesticides dans l'environnement. Cependant, certaines études montrent que :

- Ces poisons ne se volatilisent pas facilement dans l'atmosphère. Les valeurs prises par la constante de Henry sont représentatives d'une faible volatilité à partir de l'eau ou de surface humectées [15].

- La plupart de ces composés sont susceptibles d'être bioaccumulés par les organismes terrestres (tissus adipeux et foie) et aquatiques. De plus, ils sont persistants dans le sol et ne semblent pas biotransformés par les micro-organismes présents au niveau du sol [16].

- Malgré une faible solubilité dans l'eau, la contamination par les rodenticides des eaux superficielles et souterraines résulte soit du transfert par lixiviation du rodenticide répandu sur le sol par les eaux de ruissellement, soit du nettoyage des récipients, des cuves ou des réservoirs lors de la préparation des spécialités.

## Liaison rodenticides-acide humique

Le mécanisme d'association d'une série de rodenticides et de l'acide humique a donc été analysé par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Dans un premier temps, comme il n'existe pas de phases stationnaires greffées avec l'acide humique, nous avons été contraints d'utiliser une colonne remplie de particules de silice greffées par de longues chaînes carbonées comportant 18 atomes de carbone (C18) pour étudier le mécanisme de fixation des rodenticides sur l'acide humique [17-18]. L'acide humique a été dissout dans la phase mobile. Comme l'acide humique, molécule très hydrophobe, se fixe sur la phase stationnaire C18, le modèle double de Langmuir a été utilisé (équation (6) dans l'encadré). Dans cette équation,  $\bar{k}_I$  représente l'adsorption des rodenticides sur la surface C18, et  $\bar{k}_{II}$  leur association avec l'acide humique adsorbé sur la

## Biochromatographie et reconnaissance moléculaire : un peu de théorie

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est une méthode de choix pour analyser le mécanisme de reconnaissance moléculaire entre un ligand (X) et une macromolécule (molécule cible, M). En chromatographie sur colonne, la phase stationnaire sera constituée d'un support chromatographique (particules de silice par exemple) sur lequel la macromolécule d'intérêt est immobilisée par simple adsorption chimique ou par création d'une liaison covalente avec la surface chromatographique. La phase mobile utilisée est le plus souvent un mélange hydro-organique, comme le mélange tampon phosphate-méthanol. Le ligand injecté à l'intérieur du système chromatographique va donc se distribuer entre la macromolécule immobilisée et la phase mobile. Le ligand est caractérisé par son facteur de rétention  $k$  qui est en première approximation directement proportionnel à sa constante d'association avec la macromolécule biologique.  $k$  peut être mesuré directement à partir du tracé chromatographique (chromatogramme) grâce au temps qui sépare le sommet du pic d'éluion du ligand de son injection. Le tracé des courbes de van't Hoff :

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \phi \quad (1)$$

où  $\phi$  est le pourcentage de phase de la colonne (volume de la phase stationnaire divisé par le volume de la phase mobile), permettra d'analyser le mécanisme de reconnaissance moléculaire et de déterminer les diverses grandeurs chromatographiques qui y sont attachées. Si les variations d'enthalpie  $\Delta H$  et d'entropie  $\Delta S$  du mécanisme de reconnaissance moléculaire sont indépendantes de la température, les courbes de van't Hoff ( $\ln k$  vs  $1/T$ ) sont alors linéaires et permettent le calcul de  $\Delta H$  et de  $\Delta S$  par simple régression linéaire. Si par contre  $\Delta H$  et  $\Delta S$  varient avec la température, l'intégration des équations de Kirchoff [30-33] sera nécessaire pour calculer ces grandeurs thermodynamiques. Par conséquent, si on suppose lors du processus d'association ligand/molécule cible, un changement de capacité calorifique à pression constante  $\Delta C_p$  indépendant de la température, les variations de  $\Delta H$  et  $\Delta S$  avec  $T$  sont données par les équations suivantes :

$$\Delta H = \Delta C_p (T - T_H) \quad (2)$$

$$\Delta S = \Delta C_p \ln \left( \frac{T}{T_S} \right) \quad (3)$$

En combinant les équations (1), (2) et (3), la variation du logarithme du facteur de rétention  $k$  du ligand sur la macromolécule biologique est donnée par la relation suivante :

$$\ln k = \frac{\Delta C_p}{R} \left( \frac{T_H}{T} - \ln \frac{T_S}{T} - 1 \right) + \ln \phi \quad (4)$$

où  $T_H$  et  $T_S$  sont les deux températures de référence pour lesquelles les valeurs de  $\Delta H$  et  $\Delta S$  sont respectivement égales à zéro. Cette dernière équation permettra le calcul des grandeurs  $T_H$ ,  $T_S$  et  $\Delta C_p$  par une simple régression non linéaire. En utilisant les équations (2) et (3), les valeurs des paramètres thermodynamiques  $\Delta H$  et  $\Delta S$  du processus d'association seront déterminées dans le domaine de température d'étude. D'autres modèles (théorie du binding [34]) ont été développés afin d'analyser le mécanisme d'association entre une macromolécule M et un ligand X. Nous nous sommes intéressés plus spécifiquement aux modèles de Langmuir qui sont les plus utilisés en CLHP pour étudier la fixation d'un ligand X pouvant se lier sur un ou plusieurs sites de la phase stationnaire (phase stationnaire C18 ou greffée par la macromolécule M). Dans le cas où l'on considère un seul site de fixation, le modèle simple de Langmuir, représenté par l'équation suivante, est le plus utilisé [35-36] :

$$k = \frac{\phi \alpha K_X}{(1 + K_X [X]_{pm})^2} = \frac{\bar{k}}{(1 + K_X [X]_{pm})^2} \quad (5)$$

où  $k$  représente la rétention du ligand X sur la phase stationnaire,  $\alpha$  le facteur de saturation de la colonne du ligand X,  $[X]_{pm}$  la concentration de X dans la phase mobile  $pm$  (milieu d'étude),  $K_X$  la constante d'association de X pour le site de fixation et  $\bar{k}$  une constante directement proportionnelle à  $K_X$  ( $\bar{k} = \phi \alpha K_X$ ). Si, par contre, le ligand X se fixe sur deux sites de fixation (récepteur) de la phase stationnaire, alors la rétention du soluté sur la phase stationnaire est donnée par le modèle double de Langmuir :

$$k = \frac{\phi \alpha K_I}{(1 + K_I [X]_{pm})^2} + \frac{\phi \alpha K_{II}}{(1 + K_{II} [X]_{pm})^2} \\ = \frac{\bar{k}_I}{(1 + K_I [X]_{pm})^2} + \frac{\bar{k}_{II}}{(1 + K_{II} [X]_{pm})^2} \quad (6)$$

où  $\bar{k}_I$  et  $\bar{k}_{II}$  sont, comme dans le cas précédent, directement proportionnels aux constantes d'association du ligand X sur les deux sites de la phase stationnaire ( $K_I$  et  $K_{II}$ ).

Dans les deux cas (modèle simple ou double), la colonne utilisée pour la détermination de ces isothermes est d'abord équilibrée avec une phase mobile contenant X. Ensuite, on injecte à l'intérieur du système chromatographique des solutions étalons contenant des concentrations connues en X. Après l'injection, les équilibres d'association entre X et le ou les sites de fixation de la phase stationnaire de la colonne sont modifiés. Cette perturbation se caractérise par l'apparition d'un pic sur le chromatogramme.

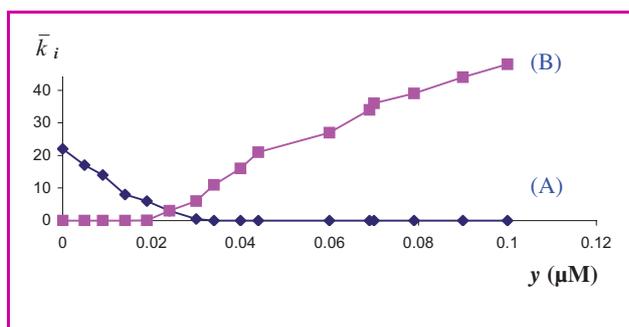


Figure 2 -  $\bar{k}_I$  (A) et  $\bar{k}_{II}$  (B) en fonction de la concentration en acide humique  $y$  ( $\mu\text{M}$ ) pour la molécule de chlorophacinone à 25 °C et à pH = 5.

surface C18. La *figure 2* montre les variations de  $\bar{k}_I$  et  $\bar{k}_{II}$  en fonction de la concentration en acide humique  $y$  dans la phase mobile pour la molécule de chlorophacinone à une température de 25 °C et à pH = 5. L'allure de cette courbe démontre clairement que :

- Pour  $y < 0,025 \mu\text{M}$ , les valeurs de  $\bar{k}_I$  diminuent alors que celles de  $\bar{k}_{II}$  augmentent. Les valeurs de  $\bar{k}_I$ , proportionnelles à la constante de fixation des rodenticides sur la phase stationnaire C18, sont toujours plus grandes que celles correspondant à l'association du rodenticide adsorbé sur la surface C18. Ces résultats démontrent que pour  $y < 0,025 \mu\text{M}$ , l'adsorption des rodenticides se fait majoritairement sur la phase stationnaire C18.

- pour  $y > 0,025 \mu\text{M}$ , on observe exactement l'inverse. Les valeurs de  $\bar{k}_{II}$  sont plus grandes que celles de  $\bar{k}_I$  et lorsque la concentration en acide humique  $y$  croît dans la phase mobile, les valeurs de  $\bar{k}_{II}$  augmentent et celles de  $\bar{k}_I$  restent quasiment constantes. Ces résultats démontrent que c'est dans cette zone de concentration ( $y > 0,025 \mu\text{M}$ ) que nous pouvons modéliser l'association des rodenticides avec l'acide humique.

Ces résultats ont montré que l'acide humique s'adsorbait sur les particules de silice greffées avec de longues chaînes carbonées C18. Ceci nous a donc conduit à mettre au point une nouvelle colonne chromatographique constituée de particules de silice sur lesquelles sont greffées les molécules d'AH [19]. Pour cela, nous avons utilisé la méthode « in batch » qui consiste à immobiliser l'AH en se servant d'une colonne pré-remplie par le support chromatographique en silice [20-22]. Les groupements silanol de la silice sont d'abord activés par le (3-aminopropyl)-triéthoxysilane afin d'obtenir une surface sur laquelle sont greffés des groupements amines primaires. On fait ensuite réagir le glutardialdéhyde qui se lie sur la silice activée grâce à la formation d'une liaison imine. Puis, l'AH est immobilisé *via* ces groupements amines primaires qui se lient avec le deuxième groupement carbonyle du glutardialdéhyde en formant de nouveau une liaison imine. Enfin, les groupements carbonyles résiduels de la surface sont inactivés grâce au 2-aminoéthanol par la formation d'une liaison imine. La *figure 3* présente le schéma réactionnel principal de cette méthode d'immobilisation.

Le *tableau II* rassemble les valeurs des constantes d'association ( $K$ ) des pesticides sur l'acide humique, déterminés, à 25 °C et pH = 5, grâce à la mise au point de cette nouvelle colonne. Ces valeurs montrent que la fixation des rodenticides à structure coumarinique est plus élevée que celle des rodenticides à structure indane-dione. La

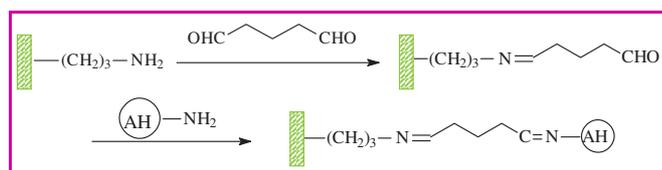


Figure 3 - Schéma réactionnel de la méthode d'immobilisation de l'acide humique sur la surface en silice.

bromadiolone présente la fixation la plus élevée et la diphacinone la plus faible. Ces premiers résultats confirment l'importance de l'hydrophobicité de ces rodenticides pour se fixer sur la matière organique du sol : plus la molécule est hydrophobe, plus elle a tendance à s'associer avec l'acide humique, résultats déjà observés avec d'autres pesticides [2, 23]. On peut noter également que pour des conditions chromatographiques identiques à celles utilisées pour les rodenticides, le paraquat et le chlordimeform, qui se trouvent sous forme cationique, ont des facteurs de rétention plus élevés (*i.e.* des constantes d'association plus élevées). Ceci indique que les interactions ioniques sont fortement impliquées dans le mécanisme d'association pesticide/acide humique. La colonne acide humique nouvellement créée nous a permis de modéliser d'une manière fiable le mécanisme de fixation des pesticides de propriétés physico-chimiques très différentes et ainsi, de comparer leurs propriétés de fixation sur la principale matière organique du sol, l'acide humique. La mise au point de cette colonne permet d'aboutir à des conclusions similaires à celles obtenues en dissolvant l'AH dans la phase mobile et en utilisant une colonne classique C18, mais en réduisant considérablement le nombre d'expériences à réaliser et donc en optimisant le temps d'analyse.

## Analyse du processus de fixation de pesticides sur une membrane artificielle immobilisée

### Membrane plasmique et membrane artificielle immobilisée

La membrane plasmique (appelée aussi membrane biologique) est un assemblage de protéines diverses insérées dans la matrice fluide de la double couche phospholipidique. Les phospholipides sont à la base de la structure principale de toutes membranes biologiques. C'est leur structure moléculaire qui leur permet de former la

Tableau II - Valeurs des constantes d'association des pesticides sur l'acide humique à 25 °C et pH = 5 (déviation standard < 0,05).

Rodenticides	K (10 <sup>4</sup> )
Bromadiolone	6,01
Brodifacoum	5,65
Chlorophacinone	4,78
Difénacoum	5,23
Diphacinone	4,26
Chlordimeform	13,25
Paraquat	18,98

membrane. Ils ont une partie hydrophobe (les deux chaînes d'acides gras) et une partie hydrophile (le groupement phosphate qui peut aussi porter un groupement). La phosphatidylcholine, un des phospholipides typique d'une membrane plasmique, est présentée *figure 4* à titre d'exemple.

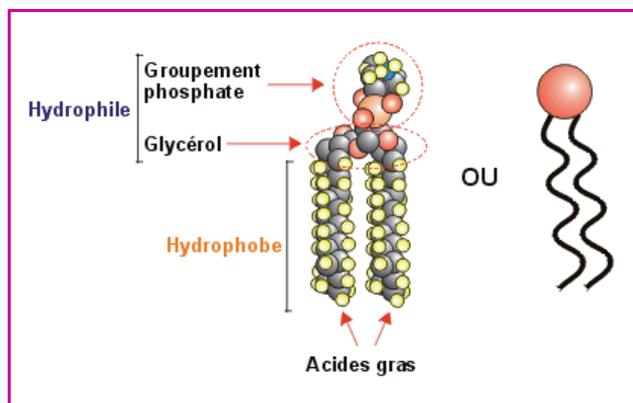


Figure 4 - Structure d'un phospholipide typique d'une membrane plasmique : le phosphatidylcholine [24].

La membrane plasmique présente une perméabilité sélective : elle se laisse traverser par certaines substances plus facilement que par d'autres. Dans le transport de substances non macromoléculaires, on distingue la diffusion simple, la diffusion facilitée et le transport actif [24]. La mise au point de phases stationnaires constituées de particules de silice sur lesquelles sont greffées des phospholipides (constituant ainsi une membrane artificielle immobilisée) permet de mimer le transport par diffusion simple de xénobiotiques à travers la membrane cellulaire [25-27]. La membrane artificielle immobilisée (MAI) est constituée par le greffage par liaison covalente d'un groupement diacylphosphatidylcholine sur des particules de silice substituées par un groupement propylamine. De manière à améliorer la durée de vie de la MAI, les groupements résiduels aminés sont couverts par des chaînes alkyles en C3 ou C10. La structure de la MAI actuellement la plus utilisée pour mimer la perméabilité membranaire est donnée *figure 5*.

### Liaison rodenticides-membrane artificielle immobilisée

L'étude du mécanisme d'association d'une série de rodenticides avec la MAI a été réalisée afin de modéliser leur mécanisme de diffusion à travers la membrane cellulaire [28]. Pour qualifier et quantifier les différentes composantes des interactions mises en jeu dans la liaison MAI-rodenticides, nous avons utilisé le chlorure de sodium NaCl comme « modificateur de liaison » ajouté à la phase mobile. Les courbes de van't Hoff (équation (1) dans l'*encadré* p. 13) ont été tracées pour chaque rodenticide à toutes les valeurs de NaCl. Nous obtenons des droites, ce qui implique que pour chaque concentration en modificateur de la liaison, la fixation des rodenticides sur la MAI se fait avec i) un nombre de sites constants et ii) une variation enthalpique ( $\Delta H^\circ$ ) indépendante de la température (T) dans le domaine  $15 < T < 40$  °C. La courbe de variation  $\Delta H^\circ$  est représentée *figure 6*.

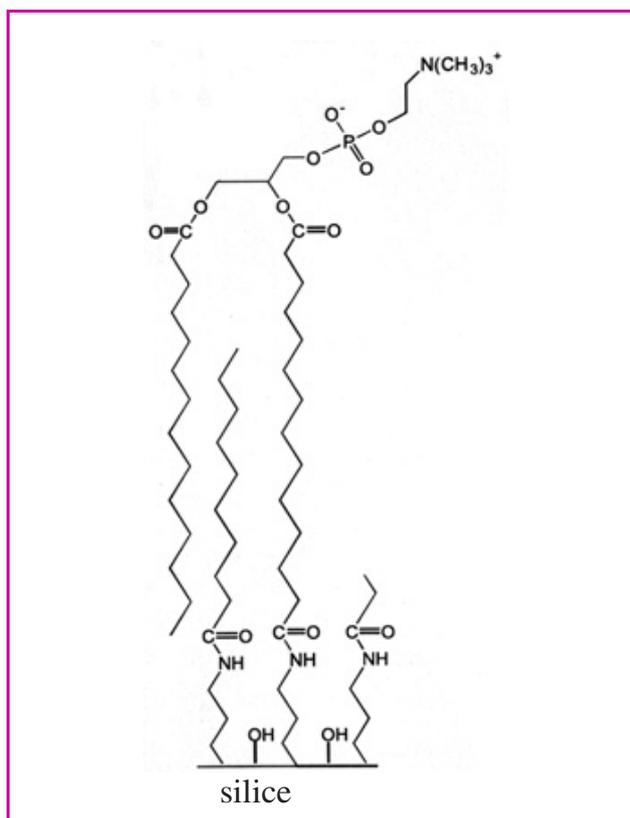


Figure 5 - Structure de l'IAM-PC-DD2 (« immobilized artificial membrane-phosphatidyl choline discovery drug »).

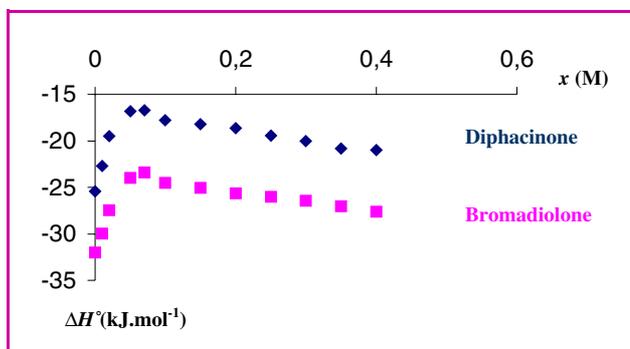


Figure 6 -  $\Delta H^\circ$  (kJ.mol<sup>-1</sup>) en fonction de la concentration en chlorure de sodium (M) dans le milieu d'étude pour la bromadiolone et la diphacinone.

Les variations obtenues sont identiques pour tous les rodenticides étudiés. Afin de déterminer les valeurs des constantes d'association sur la MAI de ces pesticides, le modèle simple de Langmuir (équation (5) dans l'*encadré*) a été utilisé. À 15 °C, les valeurs de  $K_{MAI}$  sont rassemblées dans le *tableau III* pour les cinq rodenticides.

De même, la courbe de la *figure 7* représente la variation  $K_X$  à 15 °C en fonction de la concentration en NaCl pour les molécules de bromadiolone et de diphacinone. Une variation similaire est observée pour les autres rodenticides. Ces résultats semblent montrer que :

- les rodenticides à structure coumarinique ont une constante d'association avec la MAI plus grande que les rodenticides à structure indane-dione ;

Tableau III - Valeurs des constantes d'association  $K_X$  des rodenticides sur la MAI des cinq rodenticides à 15 °C (déviatoin standard < 0,05).

Rodenticides	$K_X (10^4)$
Bromadiolone	4,23
Brodifacoum	4,10
Chlorophacinone	1,75
Difenacoum	3,40
Diphacinone	1,70

- un changement de mécanisme de fixation de ces rodenticides avec la MAI est observé pour une concentration en chlorure de sodium  $x$  égale à 0,1 M.

Pour des valeurs faibles en sel (chlorure de sodium  $x < 0,1$  M), les valeurs des constantes d'association  $K$  diminuent (*figure 7*) tandis que les paramètres thermodynamiques augmentent (*figure 6*). Ces variations s'expliquent par un mécanisme de compétition entre les ions du sel et les rodenticides avec leur site de fixation à la MAI. Les ions  $Na^+$  (respectivement  $Cl^-$ ) du sel interagissent par des interactions électrostatiques avec le groupement phosphate des phospholipides (respectivement ammonium quaternaire des phospholipides) de la membrane immobilisée (*figure 5*, structure de la MAI). Ainsi, lorsque la concentration en  $Na^+$  croît dans le milieu, le nombre de sites accessibles sur la MAI au rodenticide va décroître, provoquant une diminution de leur fixation à la membrane artificielle (le facteur de rétention  $k$  diminue). Ces résultats confirment bien le rôle important des interactions polaires de la MAI sur ce processus de fixation.

Pour des concentrations en chlorure de sodium  $x$  supérieures à 0,1 M, les valeurs de  $k$  (donc de  $K$ , *figure 7*) augmentent lorsque la concentration en sel dans le milieu croît. Cette augmentation est due à celle de la tension de surface du milieu et à une diminution de l'activité de l'eau, donc à l'augmentation des interactions hydrophobes entre ces rodenticides et la MAI.

Ces résultats ont permis de montrer que les rodenticides étudiés se fixent fortement sur la MAI par des interactions hydrophobes. De plus, l'existence d'interactions polaires dites « de surface » entre le rodenticide et les groupements polaires phosphates de tête des phospholipides explique l'insertion incomplète de ces ligands à l'intérieur de la couche lipidique de la membrane.

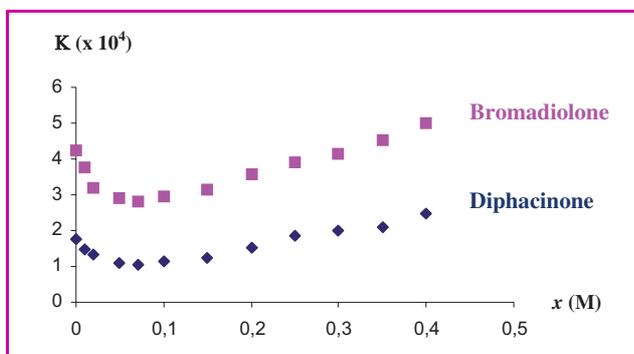


Figure 7 -  $K$  en fonction de la concentration en chlorure de sodium  $x$  (M) dans le milieu d'étude pour la bromadiolone et la diphacinone.

Enfin, afin d'affiner la compréhension du mécanisme de toxicité cellulaire, ces données chromatographiques ont été comparées avec des résultats biologiques. Ainsi pour chaque rodenticide, la concentration en pesticide requise pour tuer 50 % des cellules (concentration inhibitrice 50 ;  $CI_{50}$ ) d'une lignée de kératinocytes (HaCaT) et d'hépatocytes (HepG2) humains est déterminée. Le *tableau IV* présente les différentes valeurs obtenues sur les deux lignées cellulaires [29].

Tableau IV - Valeurs moyennes des concentrations en rodenticides nécessaires pour tuer 50 % des cellules HepG2 ( $CI_{50}$ ; HepG2) et HaCaT ( $CI_{50}$ ; HaCaT) pour les cinq rodenticides (déviatoin standard < 0,7 pour les HepG2 et < 3,6 pour les HaCaT).

Rodenticides	$CI_{50}$ ; HepG2 ( $\mu$ M)	$CI_{50}$ ; HaCaT ( $\mu$ M)
Bromadiolone	7,2	31
Brodifacoum	atoxique	36
Chlorophacinone	3,8	66
Difenacoum	6,3	41
Diphacinone	2,6	75

Ces résultats montrent qu'à l'exception du brodifacoum, la toxicité des rodenticides étudiés (*i.e.* bromadiolone, difenacoum, chlorophacinone, diphacinone) est plus élevée sur les hépatocytes que sur les kératinocytes. Cela semble montrer que le mécanisme de toxicité (cibles d'action ?, métabolites ?) ou/et de passage à travers la membrane cellulaire (présence de récepteur ?) diffèrent sur les deux lignées cellulaires. La  $CI_{50}$  de chaque rodenticide est reliée avec sa constante d'association  $K$  à la MAI calculée précédemment. Cette membrane artificielle reflète, à l'exception près des récepteurs, une membrane cellulaire (*i.e.* diffusion simple).

- Au niveau de la lignée kératinocytaire, la  $CI_{50}$  semble directement proportionnelle à la constante d'association de ces rodenticides sur la MAI (*i.e.* facteur de rétention des rodenticides sur la MAI à 37 °C ; *figure 8*). D'après la loi de Fick et en supposant en première approximation que les composés étudiés ont un coefficient de diffusion voisin et qu'ils migrent le long d'un même gradient de concentration à travers la membrane cellulaire, nous pouvons émettre l'hypothèse que la toxicité des rodenticides est étroitement liée à leur flux de migration à travers la membrane cellulaire.
- Au niveau de la lignée hépatocytaire, aucune corrélation n'est obtenue entre l'affinité du rodenticide pour la MAI et sa toxicité. Cela suppose que le mécanisme de toxicité cellulaire est fonction de la structure des rodenticides (présence de métabolites ? démontrée uniquement pour les rodenticides de première génération) et/ou de la pénétration dans la cellule (présence de récepteurs ?). D'autres expériences en cours semblent appuyer cette dernière hypothèse.

## Conclusions et perspectives

Deux travaux sont actuellement en cours au sein de notre équipe. Le premier a trait à l'étude du mécanisme de passage à travers la membrane cellulaire d'une série de nanomolécules de fullerènes, molécules dont on connaît mal le profil toxicologique.

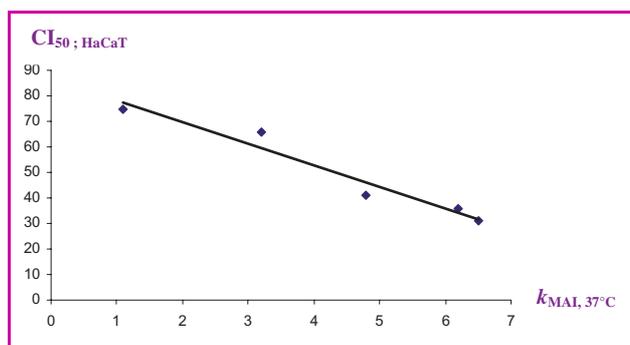


Figure 8 - Concentrations nécessaires en rodenticides pour tuer 50 % des cellules HaCaT ( $CI_{50; HaCaT}$ ) en fonction du facteur de rétention  $k_{MAI, 37^\circ C}$  pour les cinq rodenticides.

Afin de mimer leur mécanisme de passage à travers la membrane plasmique, nous avons déjà analysé l'évolution du facteur de rétention de la molécule de fullerène C60 sur une membrane artificielle immobilisée en fonction de l'inverse de la température (courbe de van't Hoff, figure 9).

Une modification de la pente de cette courbe est observée à une température proche de 17 °C, confirmant un changement de capacité calorifique  $\Delta C_p$  (équation (4) dans l'encadré p. 13) lors du processus d'association fullerène-MAI égal à  $-1,495 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ . Cette valeur négative obtenue associée à d'autres résultats non présentés ici montre que des phénomènes de déshydratation à l'interface fullerène/MAI et des changements conformationnels graduels et réversibles de la MAI interviennent lors du processus d'association. Un tel mécanisme d'association conduisant à l'apparition de brisure de symétrie des courbes de van't Hoff a été observé également dans l'étude du mécanisme de liaison entre la nor-NOHA et l'arginase, cible potentielle contre l'hypertension artérielle. En effet, compte tenu de la compétition existant entre l'arginase et la NO-synthétase pour leur substrat commun, la L-arginine, l'arginase pourrait diminuer la disponibilité en L-arginine pour la NO-synthétase et participer à la dysfonction endothéliale. Notre équipe a montré l'intérêt d'inhiber l'activité de l'arginase, notamment par la nor-NOHA, pour diminuer l'hypertension artérielle. Afin de caractériser par biochromatographie les interactions entre l'arginase et la nor-NOHA, un support chromatographique sur lequel a été greffée l'enzyme a été mis au point. Les premiers résultats obtenus sont en cours de publication. Cette colonne enzymatique nous a permis outre de mieux cerner les contours du mécanisme d'association de la nor-NOHA avec

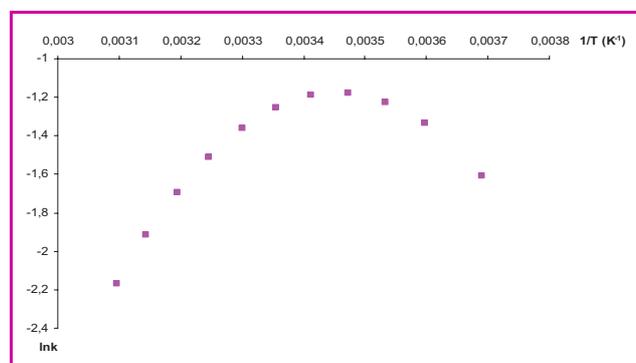


Figure 9 -  $\ln k$  en fonction de  $1/T \text{ (K}^{-1}\text{)}$  pour la molécule de C60 sur la membrane artificielle immobilisée.

l'arginase, de montrer le rôle clé du couple carboxylate-noyau imidazolium de l'histidine (His 141) du site actif de l'enzyme sur le fonctionnement du cycle catalytique de cette métalloenzyme à cluster binucléaire de manganèse qui hydrolyse la L-arginine en ornithine et urée.

Pouvait-on imaginer meilleurs exemples pour souligner :

- l'interdisciplinarité de ces travaux nécessitant des collaborations fortes avec les collègues organiciens, chimistes thérapeutes, pharmacologues, physiologistes, biologistes et biochimistes ?
- le fait que par rapport aux autres méthodes physico-chimiques (dialyse, titrages calorimétriques, spectrofluorimétrie, dichroïsme circulaire...), la chromatographie liquide haute performance permet une approche plus complète et plus rapide de l'étude du mécanisme d'association ligand X/macromolécule M ?

Il est ainsi possible d'étudier l'influence d'un grand nombre de paramètres physico-chimiques sur l'association ligand X/macromolécule M, qu'ils soient quantitatifs (pH et force ionique du milieu, température, concentration en agent compétiteur...) ou qualitatifs (nature d'un sel, modification de la structure de la macromolécule M, structure du ligand X...). Cette technique peut aussi mimer au mieux le milieu biologique (pH, température). L'étude de la température permet également d'accéder aux paramètres thermodynamiques du processus d'association ligand X/macromolécule M. D'un point de vue expérimental, certains problèmes rencontrés dans d'autres techniques, comme l'adsorption du ligand X sur la membrane de dialyse et les effets de quenching en spectrofluorimétrie, sont évités. Cette méthode rend également possible une analyse de l'association ligand X/macromolécule M selon différentes modalités permettant de déterminer diverses caractéristiques de l'association.

## Références

- [1] Calvet R., *Environ. Health Perspectives*, **1989**, 83, p. 145.
- [2] Kozak J., Valla M., Vacek O., Evaluation of the influence of soil characteristics on the herbicide sorption by means of the correspondence analysis, *Humic substances in the global environment and implications on human health*, N. Senesi, T.M. Miano (eds), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, **1994**.
- [3] Calvet R., Tercé M., Arvieu J.C., *Annal. Agron.*, **1980**, 31, p. 229.
- [4] Nicholls P.H., *Pestic. Sci.*, **1988**, 22, p. 123.
- [5] *Humic substances in soil, sediment and water, Vol. 1*, G.R. Aiken, D.M. McKnight, R.L. Wershaw, P. MacCarthy, John Wiley & Sons, New York, **1985**.
- [6] Klein W., Scheunert I., Bound pesticide residues in soil, plants and food with particular emphasis on the application of nuclear techniques, *Agrochemicals: fate in food and the environment, Int. Atomic Energy Agency (Vienna)*, **1982**, p. 177.
- [7] Stevenson F.J., *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*, 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, New York, **1994**.
- [8] Dodds W.J., Frantz S.C., *Pest. Control. Technol.*, **1984**, 12, p. 14.
- [9] Godfrey M.E.R., The toxicology of brodifacoum to target and non-target species in New Zealand, *Proceeding of a conference on the organization and practice of vertebrate pest control*, Elvetham Hall, Hampshire (G.-B.), 30 août-3 sept. 1982, Haslemere, Surrey, Imperail Chemical Industries, Plant Protection Division, **1984**, p. 631.
- [10] Godfrey M.E.R., *Acta. Zool. Fennica*, **1985**, 173, p. 209.
- [11] Greig-Smith P.W., Fletcher M.R., Hunter K., Quick M.P., Ruthven A.D., Shaw I.C., Pesticide poisoning of animals in 1988: investigations of suspected incidents in Great Britain, *A report of the Environmental Panel of the Advisory Committee on Pesticides*, **1988**.
- [12] Grolleau G., Lorgue G., Nahas K., *Bulletin OEPP*, **1989**, 19, p. 633.
- [13] Mendenhall V.M., Pank L.F., *Wild Soc. Bull.*, **1980**, 8, p. 311.
- [14] Newton I., Wyllie I., Freestone P., *Environ. Pollut.*, **1980**, 68, p. 101.
- [15] FAO, rodenticides : analyses, specifications, formulations, *FAO Plant Production and Protection*, Paper 16, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, **1979**, p. 1-79.
- [16] Jackson R., Hall B.E., *Aged soil leaching of 14C-brodifacoum*, IRI Project n° 381986, Haslemere, Surrey Zeneca Agrochemicals, **1992**.
- [17] André C., Truong T.T., Robert J.F., Thomassin M., Guillaume Y.C., *Anal. Chem.*, **2005**, 77, p. 4201.
- [18] André C., Truong T.T., Xicluna A., Thomassin M., Guillaume Y.C., *Chromatographia*, **2005**, 61, p. 225.

- [19] André C., Thomassin M., Robert J.F., Guillaume Y.C., *Anal. Chem.*, **2006**, 78, p. 873.
- [20] Tomer S., Dorsey J.G., Berthod A., *J. Chromatogr. A*, **2001**, 223, p. 7.
- [21] Yamato S., Kawakami N., Shimada K., Ono M., Idei N., Itoh Y., *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 406, p. 191.
- [22] Hiramatsu K., Kamei S., Suggimato M., Kinoshita K., Iwasaki K., Kawakita M., *J. Biochem.*, **1994**, 115, p. 584.
- [23] Piccolo A., Celano G., De Simone C., *Sci. Environ.*, **1992**, 117, p. 403.
- [24] Campbell N.A., Reece J.B., *Biologie*, De Boeck Université, **2004**.
- [25] Pidgeon C., Ong S., Liu H., Qui X., Pidgeon M., Dantzid A.H., Munroe J., Hornback W.J., Kasher J.S., Glunk L., Szczerba T., *J. Med. Chem.*, **1995**, 41, p. 853.
- [26] Stevens J., Roebbeburg L., Hamstra A., *Novel Approach for screening of drug absorption via an automated system*, Application note 218, Gilson États-Unis, **2004**.
- [27] Yang C., Cai H., Liu H., Pidgeon C., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1996**, 23, p. 229.
- [28] André C., Ping L., Thomassin M., Robert J.F., Guillaume Y.C., *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 524, p. 199.
- [29] André C., Guyon C., Guillaume Y.C., *J. Chromatogr. B*, **2004**, 813, p. 295.
- [30] Privalov P.L., *Adv. Protein. Chem.*, **1979**, 33, p. 167.
- [31] Baldwin R.L., *Proc. Natl. Sci. USA*, **1986**, 83, p. 8069.
- [32] Privalov P.L., Gill S.J., *Adv. Protein.Chem.*, **1988**, 39, p. 191.
- [33] Murphy K.P., Privalov P.L., Gill S.J., *Science*, **1990**, 247, p. 559.
- [34] Hammes G.G., *Thermodynamics and Kinetics for the Biological Sciences*, Wiley-Interscience, New York, **2000**.
- [35] Guiochon G., Golshan-Shirazi S., Katti A.M., *Fundamentals of Preparative and non linear Chromatography*, Academic Press, Boston, **1994**.
- [36] Heuer C., Kusters E., Plattner T., Seidel-Morgenstern A., *J. Chromatogr. A*, **1998**, 827, p. 175.



**Claire André**, récipiendaire en 2006 du **prix jeune chercheur de la division Chimie analytique de la SFC**, est maître de conférences à l'Université de Franche-Comté\*.

\* Équipe des « Sciences séparatives et biopharmaceutiques » (2SB/EA3924), Laboratoire de chimie analytique, UFR-Médecine Pharmacie, place Saint-Jacques, 25030 Besançon Cedex.  
Courriel : candre@edu.univ-fcomte.fr



# Meilleurs vœux pour 2008 !

Pour fêter la nouvelle année, voici notre sélection d'ouvrages pour tous les passionnés de science... À découvrir sans modération !



**Agenda astronomique 2008**  
180 pages - 12 €  
ISBN : 978-2-7598-0026-1



**Comprendre le cerveau : naissance d'une science de l'apprentissage**  
274 pages - 35 €  
ISBN : 978-2-7598-0028-5



**Comment devient-on scientifique ? Enquête sur la naissance d'une vocation**  
Florence Guichard - Préface de P.-G. de Gennes  
104 pages - 10 €  
ISBN : 978-2-7598-0032-2

[www.edpsciences.org](http://www.edpsciences.org)