



HAL
open science

Etude du transport de l'iode par chémogénomique

Fanny Waltz

► **To cite this version:**

Fanny Waltz. Etude du transport de l'iode par chémogénomique. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112214 . tel-01383018

HAL Id: tel-01383018

<https://theses.hal.science/tel-01383018>

Submitted on 18 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE PARIS XI
Faculté des sciences d'Orsay

THESE DE DOCTORAT

Présentée par :

Fanny WALTZ

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE PARIS XI, ORSAY
Spécialité chimie organique

Etude du transport de l'iode par chémogénomique

Thèse soutenue le 17 octobre 2011 devant la commission d'examen :

Pr. David Bonnaffé	Président du jury
Pr. Jean-Daniel Brion	Examineur
Dr. Alain Wagner	Rapporteur
Dr. Jean-Claude Florent	Rapporteur
Dr. Yves Ambroise	Directeur de thèse
Dr. Sarah Bregant	Examineur

Abréviations & Symboles

A	absorbance
A ₄₂₀	absorbance à 420 nm
ABP	Activity Based Probe
Ac	acétyl
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	adénosine diphosphate
ADT	ADP/ATP translocase
Akt	famille de protéines kinases
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
APS	ammonium persulfate
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
ATPase	adénosine triphosphatase
BCA	bicinchoninic acid
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
BRAF	nom d'une sérine/thréonine-kinase
BSA	Bovine Serum Albumine
Bu	butyl
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate (détergent)
COS	lignée cellulaire transformée dérivée d'un rein de singe
CRE	cAMP-Responsive Element
δ	déplacement chimique (RMN)
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichlorométhane
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DIT	diiodotyrosine
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DTT	dithiothréitol
EC ₅₀	half Effective Concentration
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
éq	équivalent
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
ESI-TOF	Electro-Spray Ionization - Time-Of-Flight
Et	éthyl

FKBP12	FK506 Binding Protein 12
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FRTL-5	Fisher Rat Thyroid Low serum 5 %
$G\alpha_s$	sous unité S de la protéine G alpha
GR	Glucocorticoid Receptor
HATU	hexafluorophosphate de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> - tétraméthyluronium
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HEK	Human Embryonic Kidney
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
hNIS	human Na^+/I Symporter
HRMS	High-Resolution Mass Spectroscopy
HRP	horseradish peroxidase
HSP90	Heat Shock Protein 90
IGF-1	Insulin-like Growth Factor - 1
IR	infrarouge
IC ₅₀	half Inhibitory Concentration
<i>J</i>	constante de couplage
K _d	constante d'affinité
K _m	constante de Michaelis-Menten
λ	longueur d'onde
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCF	Mitochondrial Carrier Family
Me	méthyl
MIT	monoiodotyrosine
MPCP	Mitochondrial Phosphate Carrier Protein
MS	Mass Spectrometry
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NIS	Na^+/I Symporter
NTF-1	NIS TSH responsive Factor-1
Pax-8	paired box 8
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC2	polycystin-2 (canal calcique)
PI3K	phosphoinositide 3-kinase

PKA	Protein Kinase A
ppm	partie par million
PS	Polymer-Supported
PSD	Post Source Decay
PVDF	polyvinylidene fluoride
Rac-1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2
Rap-1	Ras-related protein-1
R _f	Rapport frontal (CCM)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
rNIS	rat Na ⁺ /I Symporter
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SF3B	Splicing factor 3B
SiRNA	Small interfering RiboNucleic Acid
t.a.	température ambiante
TEA	triéthylamine
TEMED	tétraméthyléthylènediamine
TFA	acide trifluoroacétique
Tg	thyroglobuline
TGF	Transforming Growth Factor
THF	tétrahydrofurane
TPO	thyroperoxydase
TRH	Thyrotropin Releasing Hormone
Ts	tosyl
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
TSHr	Thyroid Stimulating Hormone Receptor
TTF	Thyroid Transcription Factor
UV	Ultraviolet
Z'	Facteur statistique

Unités

<u>Unités de masse</u>	g	gramme(s)
	mg	milligramme(s)
	µg	microgramme(s)
	ng	nanogramme(s)
	pg	picogramme(s)
	Da	Dalton(s)
	kDa	kilodalton(s)
<u>Unités de volume</u>	L	litre(s)
	mL	millilitre(s)
	µL	microlitre(s)
<u>Unités de quantité</u>	mol	mole(s)
	mmol	millimole(s)
	nmol	nanomole(s)
	pmol	picomole(s)
<u>Unités de concentration</u>	M	molaire(s) (mol.L ⁻¹)
	mM	millimolaire(s) (mmol.L ⁻¹)
	µM	micromolaire(s) (µmol.L ⁻¹)
<u>Unités de temps</u>	J	jour(s)
	h	heure(s)
	min	minute(s)
	s	seconde(s)
<u>Unités de longueur</u>	cm	centimètre(s)
	mm	millimètre(s)
	nm	nanomètre(s)
	Å	Ångström (1 Å = 10 ⁻¹⁰ m)
<u>Unité de Pression</u>	mbar	millibar(s)
<u>Unité de température</u>	°C	degré(s) Celsius
<u>Unités de fréquence</u>	Hz	hertz
	MHz	mégahertz
<u>Unité de vitesse</u>	RPM	tour par minute

Sommaire

Introduction	5
Chapitre 1 : Rapport bibliographique	9
1.1. LE TRANSPORT D'IODE.....	9
1.1.1. La thyroïde : généralités	9
1.1.1.a) Anatomie	9
1.1.1.b) Fonction.....	9
1.1.2. Le symporteur Na⁺/I⁻ : un élément clé du transport d'iode	11
1.1.2.a) Clonage et caractérisation structurale.....	11
1.1.2.b) Caractérisation fonctionnelle.....	12
<i>i. Etudes cinétiques et électrophysiologiques</i>	12
<i>ii. Mutagenèse : indices sur la relation structure-fonction</i>	13
1.1.2.c) Régulation de l'expression	14
<i>i. TSH, iode et thyroglobuline</i>	14
<i>ii. Activité transcriptionnelle</i>	15
<i>iii. Voies de transduction du signal</i>	16
<i>iv. Autres facteurs</i>	17
1.1.2.d) Régulation de l'activité	17
1.1.2.e) NIS extrathyroïdiens.....	18
1.1.3. Transport d'iode : implications cliniques	18
1.1.3.a) Pathologies non cancéreuses de la thyroïde	18
<i>i. Hypothyroïdisme congénital et hyperthyroïdie</i>	18
<i>ii. Maladies auto-immunes</i>	19
1.1.3.b) Exposition prolongée aux isotopes radioactifs de l'iode	20
1.1.3.c) Cancers	20
<i>i. Cancers de la thyroïde et du sein</i>	20
<i>ii. Thérapie anticancéreuse par transfert génique</i>	21
1.1.4. Conclusion	22
1.2. LA CHÉMOGÉNOMIQUE.....	23
1.2.1. La chémo génomique : définition	23
1.2.2. Identification des cibles biologiques d'un composé organique	24
1.2.2.a) Identification par déduction.....	24
1.2.2.b) Méthodes génomiques et protéomiques	25
<i>i. Mutations et modulations d'expression</i>	25
<i>ii. Profilages transcriptionnel et protéomique</i>	25
<i>iii. Méthodes basées sur l'affinité du composé pour sa cible</i>	25
1.2.2.c) Méthodes biochimiques.....	27
<i>i. La chromatographie d'affinité</i>	27
<i>ii. Les sondes fonctionnalisées</i>	30
Sondes biotinylées	30
Sondes fluorescentes et radioactives	32
Sondes électrophiles	34
Sondes photoactivables	34

1.2.3. Conclusion.....	36
Chapitre 2 : Objectif, intérêts et stratégie envisagée	45
2.1. Objectif et intérêts	45
2.2. Stratégie envisagée	46
Chapitre 3 : A la recherche de la protéine cible de l'inhibiteur ITB₅.....	51
3.1. Etude de la relation structure-activité de la molécule.....	51
3.1.a) Mise au point d'un test biologique non radioactif.....	51
<i>i. Sélection d'une méthode de dosage de l'iodure adaptable à la mesure d'IC₅₀.....</i>	<i>51</i>
<i>ii. Optimisation du protocole de dosage</i>	<i>52</i>
Objectifs	52
Température, temps de réaction, concentrations de cérium et d'arsenic.....	53
Présence de détergents	53
Reproductibilité de la méthode	54
Influence de solvants organiques sur la reproductibilité	54
Influence de l'ordre d'addition du cérium et de l'arsenic.....	56
Conclusion	56
<i>iii. Mise au point d'un test cellulaire robuste.....</i>	<i>56</i>
Définition du facteur Z'	56
Principe du test cellulaire.....	57
Détermination du facteur Z'	58
<i>iv. Evaluation de la fiabilité du test</i>	<i>59</i>
<i>v. Conclusion</i>	<i>60</i>
3.1.b) Synthèse d'analogues	60
<i>i. Obtention d'analogues par synthèse parallèle</i>	<i>60</i>
<i>ii. Synthèses individuelles</i>	<i>61</i>
3.1.c) Evaluation de l'activité biologique des 184 analogues	63
<i>i. Déroulement du criblage</i>	<i>63</i>
<i>ii. Résultats et analyse SAR.....</i>	<i>63</i>
3.1.d) Conclusion.....	65
3.2. Synthèse d'une sonde biotinylée photoactivable et évaluation de son activité	66
3.2.a) Conception de la sonde et stratégie de synthèse.....	66
3.2.b) Synthèse du groupement photoactivable 22	67
3.2.c) Synthèse du bras biotinylé 24	69
3.2.d) Synthèse de la sonde ITB₅-P₁	69
<i>i. Introduction d'une fonction amine sur ITB₅ par alkylation.....</i>	<i>69</i>
<i>ii. Ajout du groupement photoactivable par amination réductrice</i>	<i>71</i>
<i>iii. Ajout du bras biotinylé par couplage peptidique</i>	<i>72</i>
3.2.e) Evaluation de l'activité de la sonde et de ses intermédiaires réactionnels	72
3.3. Photomarquage de la protéine cible	74
3.3.a) Optimisations préliminaires.....	74
<i>i. Culture cellulaire et protocole de lyse.....</i>	<i>74</i>
<i>ii. Quantité de protéines à déposer sur gel SDS-PAGE</i>	<i>75</i>
<i>iii. Quantité de Streptavidine-HRP à utiliser en Western-blot</i>	<i>76</i>
3.3.b) Optimisation des conditions de photomarquage	77
<i>i. Concentration de sonde</i>	<i>77</i>
<i>ii. Temps d'irradiation et expériences de compétition</i>	<i>78</i>
3.3.c) Tentative de photomarquage sur lysats	80

3.3.d) Conclusion.....	81
3.4. Isolement de la protéine photomarquée	81
3.4.a) Premier essai de capture sur billes de la protéine photomarquée.....	82
3.4.b) Augmentation du rapport protéine spécifique / protéines non spécifiques	83
<i>i. Contrôle de la stabilité de la protéine</i>	<i>83</i>
<i>ii. Contrôle de la capture</i>	<i>83</i>
<i>iii. Préincubation du lysat avec des billes d'agarose-Streptavidine</i>	<i>84</i>
<i>iv. Comparaison de différents types de billes</i>	<i>85</i>
<i>v. Optimisation des lavages et des conditions d'éluion</i>	<i>85</i>
3.4.c) Obtention d'un gel analysable en spectrométrie de masse.....	87
3.5. Identification de la protéine photomarquée.....	88
3.5.a) Première tentative d'identification	89
3.5.c) Expériences visant à augmenter la quantité de matériel analysable en masse	92
<i>i. Contrôle des lavages.....</i>	<i>93</i>
<i>ii. Recherche de conditions d'éluion plus efficaces.....</i>	<i>94</i>
Trypsinolyse sur billes	94
Test de différentes solutions d'éluion	95
<i>iii. Test d'une coloration argentique plus compatible avec les analyses de masse.....</i>	<i>96</i>
<i>iii. Utilisation de nouvelles sondes</i>	<i>97</i>
Synthèse d'une sonde desthiobiotinylée ITB₅-P₂	97
Synthèse d'une sonde clivable ITB₅-P₃.....	98
Evaluation de l'activité biologique des nouvelles sondes.....	100
Expériences de photomarquage	101
Expériences de capture sur billes	102
<i>iv. Exploitation de la sonde desthiobiotinylée</i>	<i>103</i>
Multiplication par 4 des quantités de protéines.....	103
Obtention d'un gel coloré au bleu de Coomassie	105
3.5.d) Identification de la protéine cible.....	105
3.5.e) Discussion.....	107
3.6. Conclusion du chapitre 3	110
Chapitre 4 : Travaux initiés sur le composé ITB₂	115
4.1. Synthèse d'une sonde biotinylée photoactivable et évaluation de son activité	115
<i>i. Conception de la sonde.....</i>	<i>115</i>
<i>ii. Synthèse de la sonde et évaluation de son activité biologique</i>	<i>116</i>
4.2. Expériences de photomarquage	118
<i>i. Test d'une gamme de concentration de sonde.....</i>	<i>119</i>
<i>ii. Test de différentes durées d'irradiation et expériences de compétition.....</i>	<i>120</i>
4.3. Tentative de capture sur billes	120
4.4. Conclusion du chapitre 4	122
Conclusion générale	127
Partie expérimentale	129
Synthèse organique	131
Biologie, biochimie et spectrométrie de masse	169
Annexes	203

Introduction

L'aptitude de la glande thyroïde à accumuler de l'iode sous forme d'ions iodures a été observée pour la première fois en 1896 par Baumann qui constata que la concentration en iode était 20 à 40 fois plus importante dans la glande que dans le plasma¹. L'utilisation de cette capacité à des fins thérapeutiques débute en 1942, date à laquelle des radio-isotopes de l'iode sont administrés pour la première fois à des patients dans le but de visualiser, voire de détruire leur glande thyroïde. Le transport d'iode devient alors rapidement un élément essentiel pour le diagnostic et le traitement de différentes pathologies thyroïdiennes.

Une importante avancée dans la compréhension des mécanismes moléculaires gouvernant ce processus de transport a été le clonage en 1996 de la protéine responsable du transfert des ions iodures : le symporteur Na^+/I^- (ou NIS)². De nombreuses recherches ont été conduites depuis afin de caractériser cette protéine, tant d'un point de vue structural que fonctionnel, ainsi que les mécanismes qui régulent son expression et son activité¹. Cependant, le mécanisme par lequel l'iode est transféré à l'intérieur des cellules thyroïdiennes, la manière dont le transport est régulé au niveau cellulaire et les protéines impliquées dans la régulation post-traductionnelle du symporteur restent encore largement inconnus. La compréhension de l'ensemble de ces mécanismes permettrait pourtant d'améliorer le traitement d'un grand nombre de patients. Le transport d'iode est en effet non seulement impliqué dans différentes pathologies de la thyroïde^{3,4}, mais aussi dans les contaminations à l'iode radioactif consécutives aux accidents nucléaires⁵ et dans de prometteuses stratégies de thérapie génique anticancéreuses⁶.

La chémogénomique, aussi appelée génétique chimique, est une approche multidisciplinaire dont le but est d'explorer les systèmes vivants au moyen de petites molécules organiques⁷. Elle permet soit d'attribuer une fonction à une protéine encore peu caractérisée (génétique chimique inverse), soit d'identifier des protéines impliquées dans un processus biologique donné (génétique chimique directe). Afin de mieux comprendre les mécanismes qui gouvernent le transport d'iode, notre laboratoire a mis en place une stratégie de génétique chimique directe qui a permis dans un premier temps de découvrir 10 molécules capables d'inhiber le transport d'iode⁸. L'objectif de cette thèse a été d'essayer d'identifier les cibles protéiques de deux de ces molécules : **ITB₅** et **ITB₂**. Des études d'électrophysiologie et de flux isotopique ont montré qu'**ITB₅** inhibe très rapidement le transport, tandis qu'**ITB₂** a un effet retardé. Etant donné que ces deux molécules ont visiblement un mode d'action différent, leur étude devait permettre d'identifier au moins deux protéines impliquées dans le transport des iodures, le symporteur Na^+/I^- lui-même n'étant pas exclu.

Le premier chapitre de ce manuscrit présente les connaissances acquises sur le symporteur depuis son clonage, les diverses implications cliniques du transport d'iode ainsi que les différentes stratégies qui existent pour identifier les protéines cibles de petites molécules organiques. Sont exposés, dans un deuxième chapitre, les arguments nous ayant conduit à adopter une stratégie de recherche de cible basée sur le photomarquage d'affinité et les différentes étapes que comporte cette stratégie. Les troisième et quatrième chapitres décrivent enfin l'ensemble des expériences ayant été réalisées afin d'identifier les cibles protéiques des inhibiteurs **ITB₅** (chapitre 3) et **ITB₂** (chapitre 4).

Bibliographie

- ¹ Riesco-Eizaguirre G., Santisteban P., A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications, *Eur. J. Endocrinol.*, **2006**, *155*, 495-512.
- ² Dai G., Levy O., Carrasco N., Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter, *Nature*, **1996**, *379*, 458-460.
- ³ Park S.M., Chatterjee V.K.K., Genetics of congenital hypothyroidism, *J. Med. Genet.*, **2005**, *42*, 379-389.
- ⁴ Michels A.W., Eisenbarth G.S., Immunologic endocrine disorders, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2010**, *125*, S226-37.
- ⁵ Ron E., Thyroid cancer incidence among people living in areas contaminated by radiation from the Chernobyl accident, *Health Phys.*, **2007**, *93*, 502-511.
- ⁶ Hingorani M., Spitzweg C., Vassaux G., Newbold K., Melcher A., Pandha H., Vile R., Harrington K., The biology of the sodium iodide symporter and its potential for targeted gene delivery, *Curr. Cancer Drug Targets*, **2010**, *10*, 242-267.
- ⁷ Lafanéchère L., in *Chémogénomique, des petites molécules pour explorer le vivant*, Eds Lafanéchère L., Maréchal E., Roy S., EDP Sciences, Collection Grenoble Sciences, **2007**, 91-107.
- ⁸ Lecat-Guillet N., Merer G., Lopez R., Pourcher T., Rousseau B., Ambroise Y., Small molecule inhibitor of the sodium iodide symporter function, *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 889-95.

Chapitre 1 : Rapport bibliographique

1.1. LE TRANSPORT D'IODE

1.1.1. La thyroïde : généralités

La caractéristique principale de la glande thyroïde est d'être capable de concentrer sélectivement l'iode depuis un milieu contenant de faibles concentrations en iodures (10^{-8} à 10^{-7} M) et de fortes concentrations en chlorures (0,01 à 0,1 M)¹. Cette capacité résulte probablement d'une adaptation cellulaire à la faible abondance de l'iode dans l'environnement afin d'assurer en permanence la production des hormones thyroïdiennes. Les principales sources d'iodures sont le lait, la viande, les fruits de mer, les céréales et le sel iodé mais on en trouve aussi dans l'eau de mer, les préparations vitaminées, certains médicaments ou agents de contraste et certains systèmes de purification d'eau².

1.1.1.a) Anatomie^{1,3}

La glande thyroïde est la plus vascularisée des glandes endocrines chez l'homme. Située dans la partie inférieure du cou devant la trachée et sous le larynx, elle est constituée de deux lobes latéraux verticaux reliés entre eux par une bande de tissu appelée isthme thyroïdien (Figure 1). Elle est organisée pour l'essentiel en follicules. Les follicules sont des structures sphériques constituées d'une monocouche de cellules épithéliales appelées thyrocytes et d'une cavité contenant une substance visqueuse appelée colloïde.

Les thyrocytes représentent l'unité morpho-fonctionnelle de la thyroïde et sont responsables à la fois de l'accumulation d'iodures et de la production de colloïde dont le constituant majeur est la thyroglobuline (Tg). Ces cellules sont nettement polarisées : leur membrane basale, en contact avec la circulation sanguine, est le siège du transport des iodures tandis que la membrane apicale, orientée vers la colloïde, est celui de la synthèse des hormones thyroïdiennes. La polarité des thyrocytes s'observe également dans l'organisation de leurs organites intracellulaires, le noyau étant situé dans la partie basolatérale et l'appareil de Golgi dans la partie apicale. La glande thyroïde compte par ailleurs une minorité de cellules parafolliculaires C produisant une hormone impliquée dans l'homéostasie du calcium, la calcitonine.

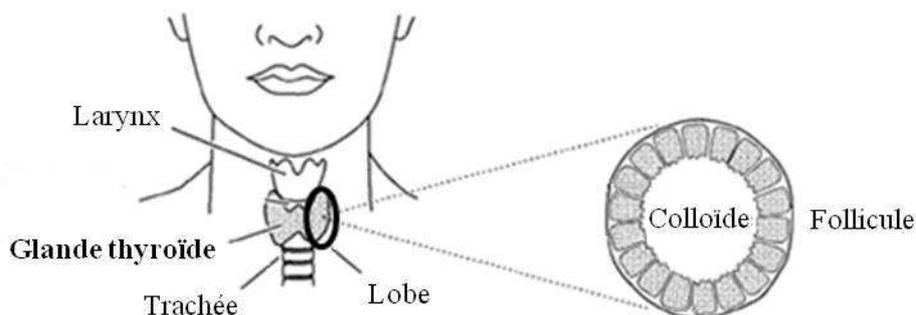


Figure 1. Morphologie de la thyroïde (d'après De la Vieja *et al.*⁴)

1.1.1.b) Fonction

La principale fonction de la thyroïde est de produire la triiodothyronine (T3) et la tétraiodothyronine (T4), deux hormones respectivement tri et tétraiodées (Figure 2.A). Ces deux composés sont essentiels pour la croissance, la différenciation et le métabolisme de nombreux tissus ainsi que pour le développement du système nerveux central⁵.

La polarité des thyrocytes est un élément essentiel pour que la biosynthèse des hormones thyroïdiennes puisse avoir lieu. Cette synthèse se déroule en quatre étapes (Figure 2.B). L'iodure est d'abord capté au niveau de la membrane basolatérale et transféré dans le milieu intracellulaire contre son gradient électrochimique grâce au symporteur Na^+/I^- (NIS)⁶. Il est ensuite transporté à travers la membrane apicale par un processus de transport passif assuré au moins en partie par la pendrine⁷. Un autre transporteur a été un temps suspecté de jouer ce rôle : l'« Apical Iodide Transporter »⁸. Il a été récemment démontré cependant que cette protéine est en réalité un symporteur sodium/monocarboxylate⁹. Une fois parvenu dans la colloïde, l'iodure est immédiatement oxydé par la thyroperoxydase (TPO) en présence de peroxyde d'hydrogène puis il est fixé sur des résidus tyrosines spécifiques de la Tg. Des résidus monoiodotyrosine (MIT) et diiodotyrosine (DIT) sont ainsi obtenus. Les précurseurs des hormones, Tg-T3 et Tg-T4, sont formés grâce au couplage deux à deux de ces résidus¹⁰ et sont stockés dans la colloïde aussi longtemps que nécessaire. Le moment venu, la Tg iodée est endocytée puis dirigée vers les lysosomes où des enzymes clivent les hormones T3 et T4 ainsi que les résidus MIT et DIT non utilisés. Les hormones sont sécrétées dans la circulation sanguine où elles sont prises en charge par des protéines-vecteurs. Les résidus MIT et DIT non utilisés sont déiodés par une iodotyrosine déhalogénase afin de permettre la réutilisation de l'iodure ou son élimination.

L'ensemble de ces étapes est stimulé par une hormone produite par l'hypophyse : la « Thyroid Stimulating Hormone » (TSH). Sa sécrétion est stimulée par une hormone hypothalamique, la « Thyrotropin Releasing Hormone » (TRH), et est réprimée rétroactivement par les niveaux de T3 et de T4 dans le plasma¹¹.

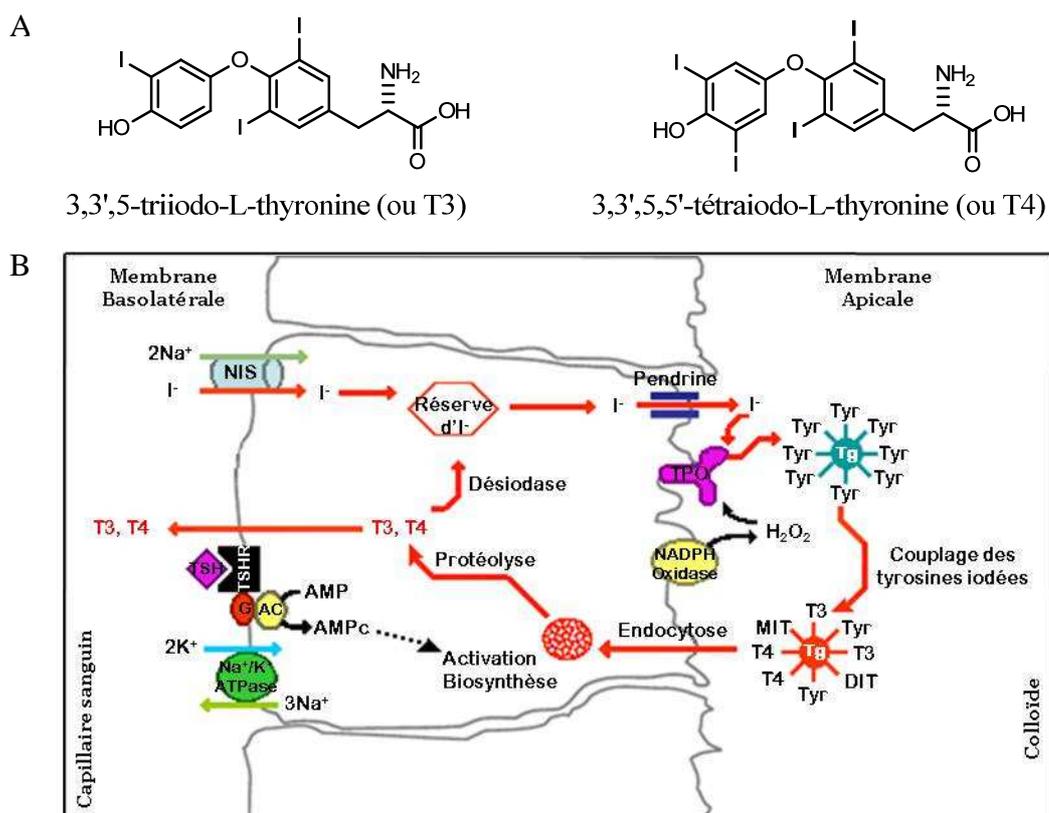


Figure 2. Hormones thyroïdiennes : structure et biosynthèse (d'après Verhaeghe E.¹²)

A) Structure des hormones thyroïdiennes T3 et T4

B) Biosynthèse des hormones T3 et T4

Tyr : tyrosine, TSHR : récepteur à la TSH, G : protéines G, AC : adénylate cyclase, AMPc : adénosyl monophosphate cyclique, ATPase : adénosyl triphosphatase

1.1.2. Le symporteur Na⁺/I⁻ : un élément clé du transport d'iode

1.1.2.a) Clonage et caractérisation structurale

L'injection dans des oocytes de *Xenopus Laevis* d'une librairie d'ADNc générée à partir de cellules dérivées d'une glande thyroïde de rat Fisher, les cellules FRTL-5, a permis d'isoler un clone de 2 839 paires de bases. Une fois ce clone transfecté dans des cellules dérivées d'un rein de singe, les cellules COS, une activité de transport d'iodures a été obtenue¹³. Ce clone présente un cadre ouvert de lecture de 1 854 nucléotides codant pour une protéine de 618 acides aminés. En se basant sur la structure secondaire supposée du symporteur Na⁺/glucose de séquence fortement homologue, le symporteur Na⁺/I⁻ a été dans un premier temps considéré comme une protéine possédant 12 domaines transmembranaires, des extrémités C et N-terminales intracellulaires et deux sites potentiels de glycosylation.

La génération d'anticorps anti-NIS a permis de confirmer la localisation cytosolique de l'extrémité C-terminale, la glycosylation de la protéine ainsi que la localisation du symporteur sur la membrane basolatérale des thyrocytes¹⁴. Des expériences de mutagenèse dirigée ont par contre révélé non pas deux mais trois sites de glycosylation et ont conduit à la correction du modèle structural initialement proposé¹⁵. Dans ce nouveau modèle, la protéine possède 13 domaines transmembranaires, une extrémité N-terminale extracellulaire et trois sites de glycosylation (asparagines 225, 485 et 497) (Figure 3). La localisation extracellulaire de l'extrémité N-terminale a été démontrée par différentes expériences^{15,16} tout comme celle de quatre segments hydrophiles sur six¹⁷. Ce modèle inclut également la présence de trois résidus chargés au sein de la membrane : l'asparagine 16, la glutamine 79 et l'arginine 208.

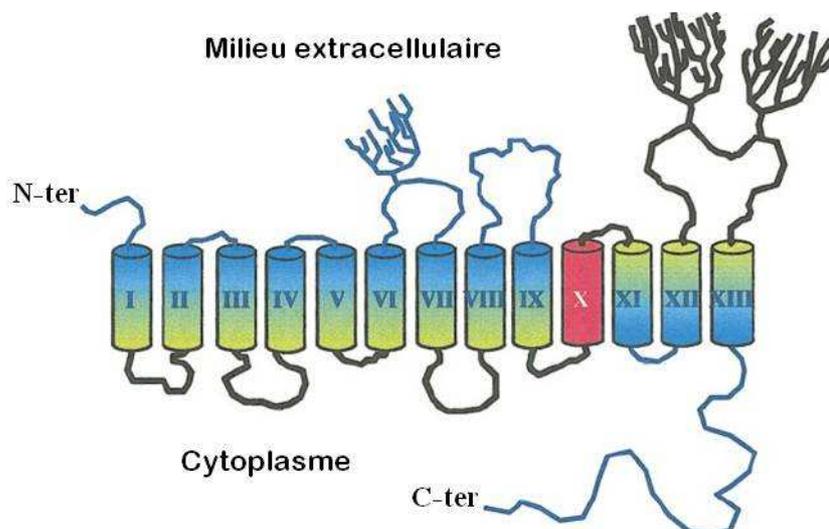


Figure 3. Modèle de structure secondaire actuellement accepté par la communauté scientifique (d'après De la Vieja *et al.*⁴) Branches : motifs glycosylés, domaine transmembranaire rouge : domaine ajouté après correction, N-ter : extrémité N-terminale, C-ter : extrémité C-terminale

L'extrémité C-terminale, longue de 70 acides aminés, contient plusieurs séquences consensus de phosphorylation, un motif dileucine, des motifs dipeptidiques acides et une séquence cible PDZ dont la fonction potentielle sera discutée ultérieurement. Quatre résidus leucine (199, 206, 213 et 220) forment par ailleurs un motif leucine zipper qui pourrait jouer un rôle dans l'oligomérisation du symporteur. Cette hypothèse est d'autant plus probable que des expériences de chromatographie d'exclusion stérique et de spectroscopie par diffusion de lumière ont récemment suggéré l'existence de dimères et de tétramères¹⁸.

Le symporteur Na⁺/I⁻ humain (hNIS) a été cloné peu de temps après celui du rat (rNIS)¹⁹. Sa séquence, longue de 443 acides aminés, présente 84 % d'identité et 92 % de similitude

avec la séquence du rNIS. La principale différence entre ces deux protéines est la présence dans le hNIS de cinq acides aminés supplémentaires entre les deux derniers segments transmembranaires et vingt dans l'extrémité C-terminale. Tout comme le rNIS, le symporteur humain est une protéine glycosylée²⁰.

1.1.2.b) Caractérisation fonctionnelle

Le symporteur Na^+/I^- transporte les ions iodures contre leur gradient électrochimique à travers la membrane basolatérale des thyrocytes. Il utilise pour ce faire l'énergie libérée lors du transport du Na^+ dans le sens de son gradient électrochimique²¹. Le gradient de Na^+ est maintenu par les pompes Na^+/K^+ ATPases. Le transport est ainsi stimulé par de fortes concentrations extracellulaires en Na^+ et de faibles concentrations extracellulaires en K^+ .

i. Etudes cinétiques et électrophysiologiques

L'analyse cinétique du transport a été réalisée par suivi de l'accumulation d' $^{125}\text{I}^-$ dans des cellules FRTL-5 qui transportent les iodures sans les organifier. Cette analyse montre une augmentation rapide de la concentration intracellulaire en iodures, suivie d'un ralentissement et de l'atteinte d'un plateau. Ce plateau résulte de l'équilibre qui se met en place entre les vitesses d'influx et d'efflux des ions iodures à travers la membrane basolatérale. L'efflux étant négligeable dans les premières minutes d'accumulation, la vitesse initiale de capture des iodures est linéaire et la constante de Michaelis (K_m) a donc pu être déterminée. Elle a été estimée à 30 μM dans des cellules FRTL-5²² et à 31 μM dans des tissus thyroïdiens¹.

L'électrogénicité du symport a d'abord été observée sur vésicules membranaires, la génération d'un potentiel membranaire négatif étant capable à elle seule d'engendrer une activité de transport²³. La dépendance au sodium suivant une sigmoïde avec un coefficient de Hill égal à 1,6, il a été suggéré qu'au moins 2 ions Na^+ étaient transportés pour un ion I^- . Des études électrophysiologiques réalisées par la suite ont montré que le transport d'iodures génère un influx net de charges positives, confirmant ainsi la nature électrogénique du symport. Elles ont aussi permis de confirmer la stœchiométrie du transport, à savoir 2 Na^+ pour un I^- , et d'estimer les constantes d'affinité apparentes du NIS pour I^- et Na^+ à 33 μM et 28 mM, respectivement²⁴.

Les expériences d'électrophysiologie ont montré par ailleurs que les ions sodium pouvaient à eux seuls générer un courant. La capture de sodium en l'absence d'iodures ayant été confirmée par l'utilisation de $^{22}\text{Na}^+$ et le coefficient de Hill pour l'activation des courants par le sodium étant de 1, il a été suggéré qu'en absence d'iodures le NIS se comporte comme un uniporteur de sodium. Ces études ont enfin rapporté des translocations de charge dans la membrane attribuables à des changements de conformation du transporteur. Etant donné que les potentiels auxquels les mouvements de charge ont lieu sont fonction de la concentration en sodium, il a été proposé que la fixation du sodium puisse conduire le symporteur à changer de conformation. L'ensemble de ces résultats combiné à l'étude des paramètres influençant les constantes d'affinité du sodium et des iodures pour le symporteur ont permis de proposer le modèle de symport suivant (Figure 4) :

- les deux ions Na^+ se fixent en premier sur le symporteur. Ils induisent un changement de conformation qui positionne le site de liaison d' I^- hors du champ électrique membranaire et qui permet à cet anion de se fixer
- un nouveau changement conformationnel permet la translocation simultanée de l'anion I^- et des deux cations Na^+ au travers de la membrane
- les trois ions sont ensuite libérés à l'intérieur de la cellule puis le transporteur change à nouveau de conformation pour retrouver sa position initiale.

Le turnover du NIS a été estimé à 22 s^{-1} en mode uniport et à 36 s^{-1} en mode symport. Ce modèle, bien qu'accepté par la communauté scientifique, n'est pas encore fermement établi ; le site de fixation de l'iodure n'est toujours pas connu et celui du sodium n'est pas encore totalement caractérisé.

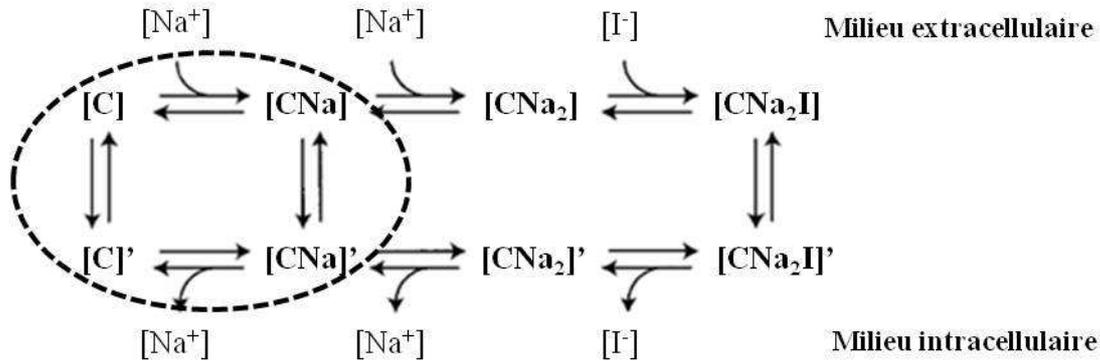


Figure 4. Modèle actuellement proposé pour le symport Na^+/I^- , mode uniport indiqué en pointillés (d'après Eskandari *et al.*²⁴) C : carrier

Plusieurs autres anions se sont révélés capables de générer des courants entrants ($\text{ClO}_3^- > \text{SCN}^- \gg \text{SeCN}^- \geq \text{NO}_3^- \gg \text{Br}^- > \text{BF}_4^- > \text{IO}_4^- \gg \text{SO}_4^{2-} \geq \text{F}^-$) ou de bloquer les courants induits par les iodures sans générer pour autant de courant par eux-mêmes (ClO_4^- , ReO_4^-). Une étude cinétique a permis de définir certains critères de sélectivité du transporteur pour ces anions²⁵, à savoir la monovalence, la taille (plus le volume des anions est important, plus leur affinité pour le transporteur est forte) et la géométrie (affinité moindre des anions linéaires (SCN^- , ClO_3^-) par rapport aux anions tétraédriques (ClO_4^- , ReO_4^- , TcO_4^-) ou hexaédriques (PF_6^- , AsF_6^-)). Le transport du ClO_4^- par le NIS a fait l'objet de nombreuses controverses^{24,26}, mais il semblerait finalement qu'une stœchiométrie $\text{Na}^+ : \text{ClO}_4^-$ de 1 : 1 soit à l'origine de l'absence de courants en présence de perchlorate²⁷.

ii. Mutagenèse : indices sur la relation structure-fonction

Depuis 1996, quatorze mutations du NIS ont été recensées comme causant des défauts de transport d'iodures (Figure 5). Cinq d'entre elles ont été étudiées au niveau moléculaire. Elles ont permis d'obtenir diverses informations sur la relation structure-fonction de la protéine dont la conformation dans la membrane reste encore à être déterminée.

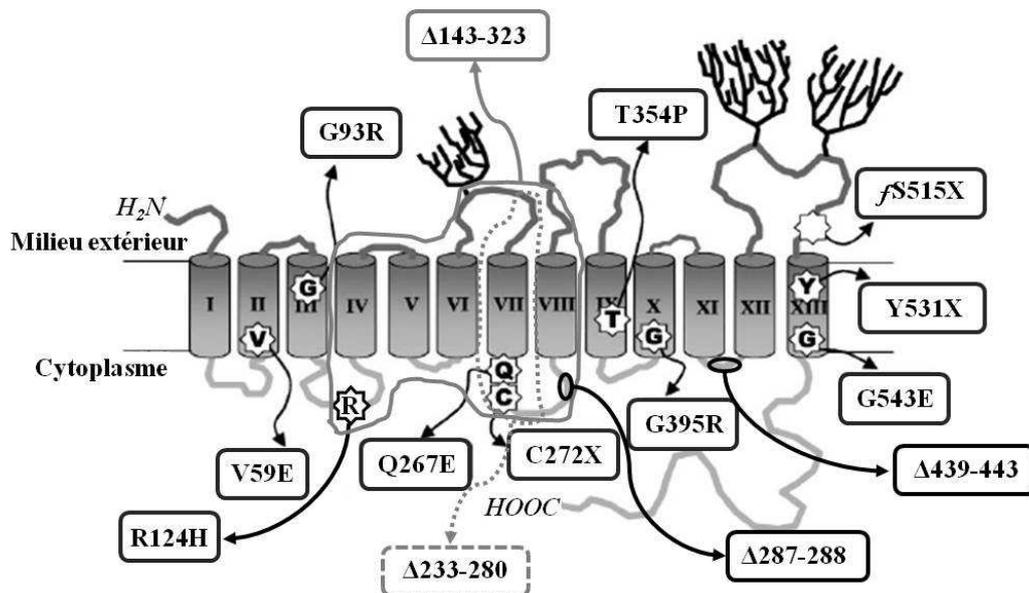


Figure 5. Mutations responsables de défauts de transport d'iodure (d'après Dohán *et al.*²⁸)

La mutation la plus étudiée à ce jour est la substitution de la thréonine 354 par une proline dans le segment transmembranaire IX. La protéine mutante est correctement localisée à la membrane mais elle est complètement inactive. Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que l'absence d'activité provient de l'absence d'une fonction hydroxyle à cette position²⁹. Le segment IX est le domaine transmembranaire qui contient le plus d'acides aminés hydroxylés : chacune des sérines et thréonines présentes dans ce segment a donc été remplacée par une proline ou une alanine. Les sérines 353 et 356 et les thréonines 354 et 357 se sont ainsi révélées essentielles pour le fonctionnement de la protéine³⁰. Des analyses cinétiques ont montré que les mutants présentent une affinité moindre pour le sodium et que l'augmentation des concentrations en sodium permet de récupérer en partie l'activité de symport³¹. Ces résidus pourraient donc jouer un rôle important dans la fixation du Na⁺ en partenariat avec les aspartates 360 et 369, deux résidus hautement conservés dans la famille des symporteurs Na⁺/soluté, qui se sont également révélés importants pour l'activité du NIS.

Des expériences de mutagenèse dirigée portant sur la glycine 395 du segment transmembranaire X ont montré qu'un petit acide aminé non chargé est requis à cette position pour obtenir une vitesse maximum de transport égale à celle du NIS sauvage³². Elles ont également indiqué la nécessité d'avoir un petit acide aminé non chargé en position 543, la substitution de la glycine 543 conduisant à une maturation seulement partielle du transporteur³³. L'étude des substitutions Q267E et V59E a par ailleurs permis de montrer qu'une glutamine est nécessaire en position 267 pour que le turnover de la protéine soit maximal³⁴ et que la valine 59 est située dans une région très compacte³⁵.

L'observation de la forte conservation de l'histidine 226 dans la famille des symporteurs sodium/soluté a enfin conduit à remplacer ce résidu ainsi que tous les acides aminés chargés extracellulaires par une alanine³⁶. La substitution des résidus chargés positivement a eu pour conséquence de diminuer la vitesse maximum de transport et celle des résidus chargés négativement d'augmenter la dissociation entre le NIS et les iodures. Ces résidus sont donc certainement fortement impliqués dans le processus de transport.

1.1.2.c) Régulation de l'expression

i. TSH, iodure et thyroglobuline

La TSH est une glycoprotéine qui interagit avec un récepteur couplé aux protéines G localisé sur la membrane basolatérale des thyrocytes : le TSHr⁴. Cette interaction conduit à l'activation de l'adénylate cyclase par la protéine Gas, ce qui a pour conséquence d'augmenter les niveaux d'AMPc et d'activer la protéine kinase AMPc-dépendante, elle-même régulatrice de différentes voies de signalisation. Une étude a montré que le symporteur était surexprimé suite à des traitements augmentant les niveaux de TSH dans la circulation (inhibition de la synthèse des hormones thyroïdiennes, régimes alimentaires pauvres en iodure). D'après cette même étude, l'expression de la protéine est diminuée chez des rats hypophysectomiés et une injection de TSH est nécessaire pour qu'un niveau basal d'expression soit restauré³⁷. Ces résultats ont été confirmés sur des cellules FRTL-5 cultivées pendant 10 jours en l'absence de TSH, l'ajout de l'hormone conduisant à une forte augmentation de l'ARNm du NIS en moins de 6 h et à une augmentation des niveaux de protéine en 36 h³⁸. La TSH régule donc positivement l'expression du symporteur Na⁺/I⁻.

Les iodures représentent le deuxième facteur régulateur le plus important de la synthèse hormonale thyroïdienne. Wolff et Chaikoff ont rapporté que l'organification de l'iodure est inhibée dès que la concentration plasmatique de cet anion dépasse un seuil critique égal à 30 µM. Un retour à la normale a par contre été observé par ces deux chercheurs après deux jours d'exposition des cellules à une forte concentration en iodures³⁹. Ces deux phénomènes

ont été appelés respectivement « effet Wolff-Chaikoff » et « échappement à l'effet Wolff-Chaikoff ». L'effet Wolff-Chaikoff pourrait être lié à la production d'iodolipides capables d'inhiber la formation d'AMPc et la production de peroxyde d'hydrogène⁴⁰. Quant à l'échappement à l'effet Wolff-Chaikoff, il serait dû au moins en partie à une moindre expression du NIS⁴¹ permettant de diminuer la quantité d'iodures transportée et donc de revenir à des concentrations intracellulaires normales. Confortant ces hypothèses, une analyse différentielle d'expression génique a montré récemment que de fortes concentrations d'iodures modulent l'expression du TSHr et du NIS⁴².

Le troisième régulateur thyroïdien important est la thyroglobuline. Cette protéine semble être capable de contrer l'action de la TSH sur l'expression de plusieurs gènes thyroïdiens. Elle peut en effet bloquer non seulement sa propre expression mais aussi celle de la TPO, du NIS et du TSHr en inhibant l'expression de différents facteurs de transcription⁴³. A l'inverse, elle stimule, en association avec les iodures, l'expression de la pendrine et donc l'efflux des iodures vers la colloïde⁴⁴. L'ensemble de ces informations a conduit à la proposition d'un modèle de fonctionnement en 3 phases pour la thyroïde. Dans un premier temps, la TSH stimule l'expression du NIS, de la TPO et de la Tg : le transport d'iodures est alors maximum (phase I). La Tg accumulée dans la colloïde et les iodures entrés *via* le NIS stimulent l'expression de la pendrine afin de permettre aux iodures d'atteindre la colloïde et d'être organifiés sur la Tg (phase II). Quand la quantité de thyroglobuline iodée accumulée est suffisante, la Tg inhibe l'expression des gènes indispensables au transport de l'iodure et à la synthèse hormonale (phase III). Lorsque le contenu en Tg diminue au-dessous d'un certain seuil, l'inhibition est levée et le cycle recommence. Il est entendu que ce cycle ne serait valable qu'en cas de concentrations normales en iodures et en TSH.

ii. Activité transcriptionnelle

Les trois principaux facteurs de transcription spécifiques de la thyroïde sont « Thyroid Transcription Factor-1 » (TTF-1), « Thyroid Transcription Factor-2 » (TTF-2) et « Paired box 8 » (Pax-8). Leur combinaison, en association avec d'autres facteurs de transcription, permet la régulation transcriptionnelle des gènes de la Tg, de la TPO, du TSHr et du NIS.

Le promoteur du NIS de rat est constitué de deux régions régulatrices : un promoteur et un enhancer (Figure 6). Le promoteur proximal contient un site de liaison à TTF-1⁴⁵ et une séquence répondant à la présence de TSH sur laquelle se fixe le « NIS-TSH-responsive factor-1 » (NTF-1)⁴⁶. L'enhancer quant à lui contient deux sites de liaison à TTF-1, deux à Pax8 et un « cAMP-responsive element » (séquence CRE)⁴⁷. TTF-1 ne semble jouer qu'un rôle mineur dans cette région. La synergie entre Pax-8 et les protéines se liant à la séquence CRE est par contre déterminante pour une obtenir une expression du symporteur forte et spécifique de la thyroïde.

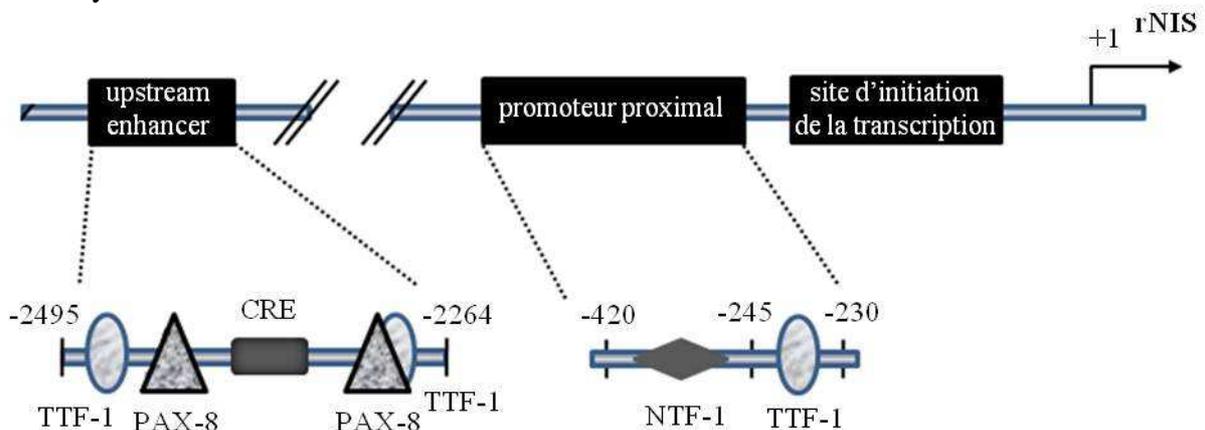


Figure 6. Représentation schématique du promoteur du NIS de rat (d'après Riesco-Eizaguirre *et al.*⁴⁸)

Le promoteur du NIS humain a également été étudié. Le promoteur minimal est situé entre -478 et -389 paires de bases et présente 73 % d'identité avec le promoteur proximal du rNIS⁴⁹. Aucun élément régulateur conférant une expression spécifique à la thyroïde n'y a cependant été découvert. Des sites potentiels de liaison à TTF-2 ayant été identifiés⁵⁰ et la comparaison des 3000 paires de bases précédant le site initial de transcription n'ayant indiqué que 30 % d'homologie entre le hNIS et le rNIS, il est probable que chaque espèce possède ses propres mécanismes de régulation transcriptionnelle. Néanmoins, un enhancer, localisé entre -9 847 et -8 968 paires de bases, s'est révélé très similaire à l'enhancer du rNIS. Il comporte un site de liaison à Pax-8, un à TTF-1 et une séquence CRE. De plus, la majeure partie de l'activité transcriptionnelle de l'enhancer est assurée là aussi par la synergie entre le facteur Pax-8 et les protéines se liant à la séquence CRE⁵¹.

iii. Voies de transduction du signal

La voie de signalisation centrale dans les cellules thyroïdiennes est la voie TSH-TSHr-AMPC-PKA (Figure 7). Les mécanismes par lesquels cette voie induit la transcription du NIS sont encore assez méconnus. Il semble que la protéine kinase A (PKA) puisse phosphoryler directement des facteurs de transcription⁵² impliqués dans l'expression du NIS ou dans l'expression de facteurs indispensables à l'expression du NIS, tels que Pax-8⁵³. Il a été montré par ailleurs que la PKA peut activer la voie des p38 MAP kinases *via* la protéine Rac-1 et que cette activation résulte en une augmentation d'expression du NIS⁵⁴. Une autre voie activatrice découverte récemment est celle de la signalisation Notch dont différents composants ont été identifiés dans les cellules thyroïdiennes et dont la surexpression conduit à une activation directe du promoteur du NIS⁵⁵.

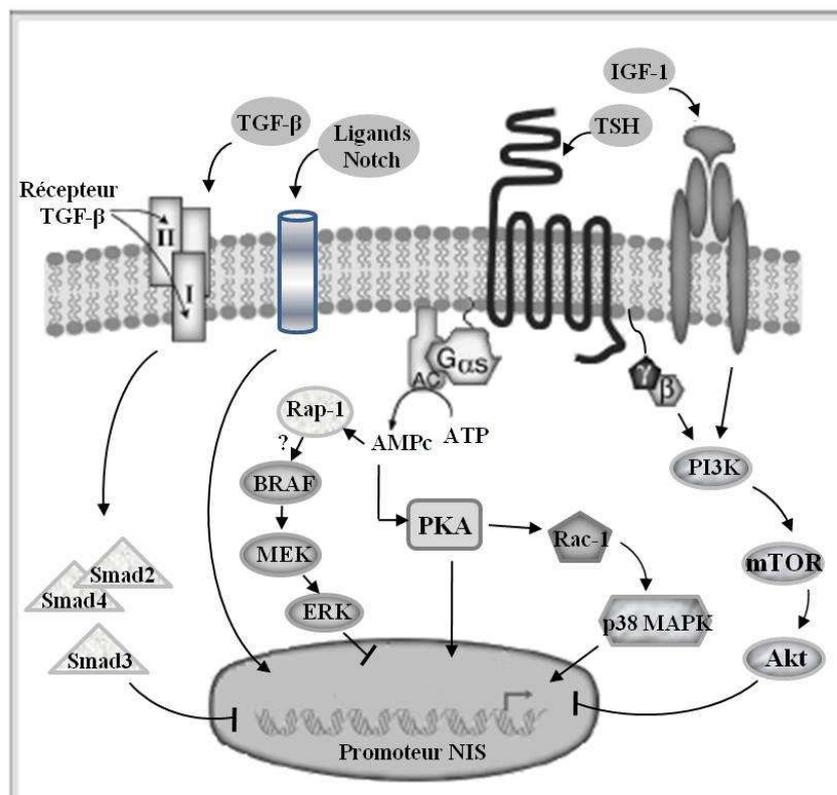


Figure 7. Voies de signalisation impliquées dans la régulation transcriptionnelle du NIS (d'après Riesco-Eizaguirre *et al.*⁴⁸)

Au contraire, il a été montré que l'inhibition des voies MEK/ERK et PI3K/mTOR/Akt conduit à une augmentation d'expression du NIS⁵⁶. La voie MEK/ERK pourrait être activée par la protéine Rap-1 de manière AMPc-dépendante et PKA-indépendante⁵⁷. Ses mécanismes d'action restent assez énigmatiques. En effet, cette voie a été décrite à la fois comme inhibant

l'expression du NIS et comme permettant d'augmenter le turnover des protéines NIS déjà synthétisées⁵⁸. Quant à la voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K), elle peut être activée soit par les protéines G β et G γ du TSHr⁵⁹, soit par l'« Insulin-like Growth Factor-1 » (IGF-1) au travers de son récepteur⁶⁰. Il est intéressant de noter que si cette voie inhibe l'expression du NIS dans les cellules thyroïdiennes, elle a l'effet opposé dans des cellules cancéreuses de sein⁶¹ : les mécanismes de régulation diffèrent donc selon le tissu et le contexte dans lesquels le symporteur est exprimé. La troisième voie inhibitrice identifiée à ce jour est celle du « Transforming Growth Factor- β » (TGF- β). Cette voie passe par les protéines Smad, dont la Smad3 qui empêche le facteur de transcription Pax-8 de se fixer sur le promoteur du NIS⁶².

iv. Autres facteurs

D'autres facteurs sont également capables de réguler l'expression du NIS. Il a été suggéré entre autres que l'organisation tridimensionnelle des thyrocytes pouvait être importante. Une étude menée sur des cultures primaires de thyrocytes capables de former une monocouche cellulaire ou d'adopter une structure folliculaire selon les conditions de culture a en effet montré que les structures folliculaires expriment davantage de symporteur⁶³. Les cytokines et interleukines peuvent par ailleurs inhiber l'expression du NIS, d'où la diminution de transport d'iodures observée dans le cadre de maladies auto-immunes⁴⁸.

De récentes études ont montré que la production d'oxyde nitrique, stimulée par la TSH, inhibe également l'expression du symporteur. Il a été suggéré que cette inhibition pourrait passer par la régulation de facteurs de transcription spécifiques de la thyroïde, connus pour être sensibles aux phénomènes d'oxydoréduction. L'oxyde nitrique constituerait ainsi une voie d'autorégulation supplémentaire par rapport à la thyroglobuline pour contrer les actions de la TSH⁶⁴. D'autres études ont montré que les lipopolysaccharides présents sur la paroi des bactéries Gram (-) pourraient quant à eux induire l'expression du NIS et que les thyrocytes seraient capables par conséquent de répondre à des infections systémiques⁶⁵.

1.1.2.d) Régulation de l'activité

Si la TSH régule la transcription du symporteur, elle en module également la fonction. L'étude de la corrélation entre la présence du symporteur et la présence d'une activité de capture a montré qu'après 5 jours de privation en TSH, les cellules ne possèdent plus aucune activité de transport alors que 30 % des protéines NIS sont encore présentes¹⁴. Des vésicules membranaires produites à partir des organites intracellulaires de ces cellules se sont avérées capables de transporter les iodures : l'absence de TSH conduit donc à l'internalisation du transporteur⁶⁶.

Le NIS possédant plusieurs sites potentiellement phosphorylables, il a été suggéré que la TSH pourrait contrôler la localisation subcellulaire du NIS *via* la phosphorylation. Cela est d'autant plus probable que la phosphorylation du NIS *in vivo* est confirmée et que les motifs de phosphorylation sont différents selon que la TSH soit présente ou non⁶⁷. D'après une étude récente utilisant la mutagénèse dirigée, la phosphorylation des sérines 43 et 581 modifierait la vitesse du transport et celle de la thréonine 49 pourrait affecter la stabilité de la protéine⁶⁸. Aucun des mutants produits n'a cependant conduit à une localisation membranaire diminuée. Il est néanmoins précisé dans cette étude que les résidus phosphorylés étudiés ont été observés en l'absence de stimulations et après expression du NIS dans des cellules HEK. Il se peut donc que dans d'autres conditions d'autres résidus phosphorylés soient découverts et que ces phosphorylations aient d'autres implications fonctionnelles. De nombreuses questions restent donc ouvertes sur les mécanismes qui conduisent à la phosphorylation du NIS et sur l'implication fonctionnelle de cette phosphorylation pour la protéine.

En dehors des sites de phosphorylation, l'extrémité C-terminale du transporteur compte trois éléments susceptibles d'être impliqués dans l'adressage, le maintien à la membrane ou l'internalisation du NIS²⁸ :

- **une séquence cible PDZ** connue pour permettre l'interaction avec des protéines contenant une séquence PDZ et pouvant empêcher l'internalisation du transporteur
- **un motif dileucine** responsable à la fois de l'internalisation de certaines protéines membranaires et du tri intracellulaire de ces protéines
- **des motifs dipeptidiques acides** pouvant fonctionner comme des signaux de récupération ou de rétention des protéines localisées à la membrane

Ces éléments ont néanmoins été très peu étudiés pour l'instant et leur fonction réelle reste inconnue.

1.1.2.e) NIS extrathyroïdiens

Très tôt, l'accumulation d'iodures dans d'autres tissus que la thyroïde a été rapportée. Ces processus de transport présentaient de grandes similarités avec le transport thyroïdien comme l'amplitude des gradients générés ou l'inhibition par le thiocyanate et le perchlorate mais aussi d'importantes différences telles que l'absence d'organification ou de régulation par la TSH²⁸. Néanmoins, divers cas de patients présentant simultanément des défauts de transport d'iodure dans la thyroïde et dans ces tissus suggéraient que les protéines exprimées étaient proches du NIS.

Afin de vérifier cette hypothèse, l'ADNc isolé du NIS a été utilisé dans diverses expériences de RT-PCR. Ces expériences ont conduit à la détection du symporteur dans de très nombreux tissus. La technique de RT-PCR étant très sensible et la possibilité d'obtenir des faux-positifs importante, il est encore nécessaire de corrélérer, dans ces tissus, l'expression de la protéine à une activité de transport dépendante du sodium et sensible au perchlorate. Seuls ces critères permettent en effet d'affirmer que la protéine détectée est bien fonctionnelle. Pour l'instant, seule l'expression du NIS dans les glandes salivaires, la muqueuse gastrique, les glandes mammaires en lactation, le plexus choroïde et le corps ciliaire de l'œil a été confirmée. Le clonage du NIS gastrique et des glandes parotides et mammaires indique une identité totale avec le NIS thyroïdien⁶⁹. Les processus de maturation tels que la glycosylation²⁸ et les mécanismes de régulation sont cependant clairement différents dans chaque organe.

1.1.3. Transport d'iode : implications cliniques

1.1.3.a) Pathologies non cancéreuses de la thyroïde

i. Hypothyroïdisme congénital et hyperthyroïdie

L'hypothyroïdisme congénital est le désordre métabolique le plus commun chez les nouveau-nés⁷⁰. Bien que peu fréquent (1 cas sur 3000), il peut avoir des effets délétères irréversibles sur leur développement et conduire au crétinisme et à l'infertilité s'il n'est pas traité. La plupart des cas se développent de manière sporadique mais environ 2 % d'entre eux sont familiaux. Les mutations impliquées sont de trois types : celles qui portent sur les gènes indispensables au bon développement de la glande thyroïde (TSHr, Gα_s, TTF-1, TTF2 et Pax-8), celles qui perturbent la synthèse hormonale (TPO, NIS, Tg, pendrine et système générateur d'H₂O₂) et celles qui rendent les hormones thyroïdiennes inefficaces (transporteurs d'iodothyronines). La recherche de ces défauts génétiques à un stade précoce permet de traiter les nouveau-nés par administration de T4 et de leur assurer un développement normal.

Les mutations du NIS découvertes à ce jour ont déjà été décrites plus haut (Figure 5). Elles sont toutes héritées de manière récessive et conduisent à des défauts de transport d'iodures qui peuvent être compensés par un régime alimentaire riche en iode plutôt que par un traitement hormonal. Lorsque le NIS n'est pas impliqué, sa capacité à transporter l'iodure peut être utilisée pour réaliser des scintigraphies thyroïdiennes avec de faibles doses d'iodure radioactif. Des informations peuvent alors être obtenues sur la taille et la localisation de la glande. L'inhibition du transport par le perchlorate suivie de la mesure de l'iodure déchargé depuis la glande permet par ailleurs d'identifier des défauts d'organification.

En dehors de la maladie de Basedow dont nous parlerons par la suite, il existe principalement deux causes d'hyperthyroïdie : les adénomes toxiques et la surexposition aux iodures causée par des composés de synthèse riches en iode⁷¹. Un adénome toxique est une tumeur thyroïdienne capable de produire ses propres hormones sans nécessiter de stimulation par la TSH. Elle résulte en général de mutations du TSHr qui conduisent ce récepteur à être activé en permanence. Quant aux composés capables de générer une surexposition aux iodures, on compte un régulateur cardiaque, l'amiodarone, et certains agents de contraste iodés tels que le diatrizoate. Selon la cause, le traitement peut inclure la prise de propylthiouracil ou de méthimazole (2 inhibiteurs de l'organification), de corticoïdes inhibant la conversion périphérique de la T4 en T3 (la T3 étant l'hormone effectrice) ou d'inhibiteurs du symporteur. De l'¹³¹I peut également être utilisé pour détruire les adénomes hyperactifs.

*ii. Maladies auto-immunes*⁷²

Les maladies auto-immunes de la thyroïde sont au nombre de deux : la maladie de Basedow et la thyroïdite d'Hashimoto. Ensemble, elles touchent 5 à 10 % de la population.

La maladie de Basedow est liée à la présence d'anticorps anti-TSHr qui activent en permanence ce récepteur. Elle est la cause la plus fréquente d'hyperthyroïdisme et en présente tous les symptômes (palpitations, intolérance à la chaleur, instabilité émotionnelle, perte de poids...). Les facteurs de risque comportent des prédispositions génétiques mais également des facteurs environnementaux, tels que la consommation de tabac ou une exposition à de fortes concentrations d'iodure. Au cours de la maladie, les lymphocytes B et T du système immunitaire s'infiltrent dans la glande thyroïde et l'organisme perd peu à peu sa tolérance vis-à-vis de différents antigènes thyroïdiens (TPO, Tg ou NIS). La maladie est diagnostiquée sur la base de niveaux de TSH fortement diminués et de niveaux d'hormones thyroïdiennes augmentés. Le diagnostic est souvent confirmé par un test de capture d'¹²⁵I ou d'¹²³I, le transport augmentant de manière importante lors de cette pathologie. Les traitements ont peu changé depuis les 50 dernières années. Ils consistent à administrer des anti-thyroïdiens de synthèse ou à procéder à l'ablation de la glande par chirurgie suivie de l'administration d'¹³¹I. L'ablation a cependant pour inconvénient de contraindre le sujet à prendre des hormones de synthèse tout le reste de sa vie.

La thyroïdite d'Hashimoto conduit elle à une perte progressive de la fonction thyroïdienne. Comme la maladie de Basedow, elle touche davantage les femmes que les hommes et se caractérise par l'infiltration de la thyroïde par les cellules du système immunitaire. Les lymphocytes T jouent ici un rôle central. Ils synthétisent en effet différentes cytokines qui comme nous l'avons vu précédemment sont capables de réprimer l'expression du symporteur Na⁺/I⁻. Différents auto-anticorps se développent au cours de la pathologie, les plus importants étant dirigés contre la TPO. Les symptômes sont ici ceux de l'hypothyroïdisme : fatigue, intolérance au froid, constipation, peau sèche, prise de poids, dépression... Le diagnostic est basé sur des niveaux de TSH augmentés et d'hormones thyroïdiennes diminués. Le traitement consiste, comme pour l'hypothyroïdisme, en une prise continue d'hormones de synthèse.

La détection des auto-anticorps circulants est souvent utilisée pour appuyer le diagnostic. Quelle que soit leur relation avec les mécanismes physiopathologiques mis en jeu, ces anticorps constituent des marqueurs précoces de la maladie. Des anticorps dirigés contre le NIS ont été identifiés dans les deux cas^{73,74}. Leur rôle exact reste encore indéterminé, d'autant que des expériences d'inhibition de transport réalisées avec des sera de patients ont montré que l'inhibition du transport d'iodures pourrait être causée par d'autres facteurs que des anticorps⁷⁵.

1.1.3.b) Exposition prolongée aux isotopes radioactifs de l'iode

Le transport d'iodures peut devenir particulièrement problématique lors d'accidents nucléaires tels que ceux de Tchernobyl (1986) et de Fukushima (2011) ou à la suite d'explosions d'armes nucléaires comme à Nagasaki et Hiroshima (1945). La capacité de la glande thyroïde à transporter l'iode permet à différents radio-isotopes de l'iode de s'accumuler dans cette glande et d'y être stockés pendant plusieurs jours, ce qui augmente sensiblement le risque de cancer thyroïdien. Suite à l'accident de Tchernobyl, environ 5 millions de russes, d'ukrainiens et de biélorusses ont été exposés à la fois à des radiations externes provenant d'espèces radioactives retombées sur le sol et à des radiations internes provenant de l'ingestion de lait ou de légumes contaminés par de l'iode ^{131}I ⁷⁶. Les enfants et les adolescents ont été les plus touchés, leur glande thyroïde transportant davantage d'iodures que celle des adultes. On estime qu'entre 1986 et 2002, environ 4 000 cas de cancers thyroïdiens ont été diagnostiqués chez des adolescents de moins de 15 ans dans ces trois pays.

La meilleure solution à ce jour pour éviter une contamination par des isotopes radioactifs de l'iode est l'ingestion de pastilles d'iode de potassium. Le but à court terme est d'empêcher le transport des isotopes radioactifs par compétition. A un terme un peu plus long, la prise de pastilles d'iode permet d'inhiber transitoirement l'organification de l'iode (induction de l'« effet Wolff-Chaikoff », cf. 1.1.2.c) *i*) ce qui permet d'empêcher le stockage des isotopes radioactifs dans la colloïde. Il a néanmoins été observé que la prise de fortes doses de KI pouvait déclencher chez certaines personnes une hypothyroïdie irréversible. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant le transport d'iodures permettrait sans doute de trouver des solutions complémentaires ou alternatives aux pastilles d'iode. Ces solutions pourraient aussi se révéler intéressantes pour compléter la protection des personnels médicaux qui manipulent fréquemment de faibles concentrations d'isotopes radioactifs transportés par le NIS tels que le ^{99}Tc , l' ^{125}I ou l' ^{131}I .

1.1.3.c) Cancers

i. Cancers de la thyroïde et du sein

Le transport d'iodures joue depuis longtemps un rôle central dans le traitement des cancers thyroïdiens. Premièrement, il permet de distinguer les tumeurs de nodules thyroïdiens bénins. Les tumeurs présentent en effet un transport d'iodures nettement diminué alors que les nodules bénins transportent l'iode aussi bien voire mieux que les tissus sains⁴. Deuxièmement, la capacité du NIS à transporter le $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ permet de visualiser les tumeurs par scintigraphie. Troisièmement, la capacité des tumeurs à transporter les iodures reste souvent suffisante pour pouvoir compléter leur ablation chirurgicale par l'administration d' ^{131}I . Cette combinaison est efficace dans la majeure partie des cas puisque le taux de survie au bout de 10 ans pour un homme adulte atteint les 80 à 90 %. Néanmoins, le taux de rechute reste élevé (près de 30 %) et dans les cellules cancéreuses les moins différenciées devenues incapables de transporter l'iode le pronostic des patients est loin d'être aussi bon²⁸. Après le clonage du NIS, diverses recherches ont donc été menées pour tenter de comprendre pourquoi

le transport est diminué, voire absent, dans les tumeurs thyroïdiennes. Aucune mutation n'a été trouvée dans l'ADNc du NIS extrait de carcinomes papillaires⁷⁷. Des expériences portant sur les niveaux d'expression et sur la localisation de la protéine ont montré par contre l'existence de deux cas différents. Soit les tumeurs expriment peu, voire pas du tout de symporteur, soit elles surexpriment un symporteur non fonctionnel car localisé intracellulairement²⁸.

Parmi les produits ayant permis de réinduire l'expression du NIS *in vitro*, on compte l'acide rétinoïque, la troglitazone et des inhibiteurs d'histones déacétylases connus pour inhiber la croissance des cellules transformées et induire la différenciation. Les études ne précisent cependant pas toujours si la protéine exprimée est fonctionnelle. Quant à celles qui indiquent une augmentation d'activité de capture, elles ne rapportent que dans quelques cas une réduction du volume des tumeurs après administration d'¹³¹I. Ces résultats soulignent l'importance d'avoir une image précise des mécanismes régulant la fonctionnalité du symporteur, en particulier dans les cellules cancéreuses, pour obtenir des traitements efficaces. La perturbation des voies de signalisation suite à la mutation de certains messagers intracellulaires, tels que BRAF⁷⁸, ainsi que la perte de polarité des cellules²⁸ font partie des explications avancées pour une rétention du symporteur à l'intérieur des cellules mais de nombreuses études sont encore nécessaires sur le sujet.

Le seul autre cancer exprimant un symporteur Na⁺/I endogène est le cancer du sein. Cette expression est particulièrement intéressante pour deux raisons : d'abord parce qu'elle est totalement absente dans les tissus sains en dehors des périodes de lactation et ensuite parce qu'elle concerne plus de 80 % des carcinomes mammaires²⁸. L'efficacité thérapeutique de l'¹³¹I reste cependant limitée par la faible capacité de ces tumeurs à accumuler de l'iodure, soit parce que l'expression du symporteur est trop faible, soit parce que celui-ci n'est pas toujours transporté à la membrane. Là encore l'acide rétinoïque s'est avéré être une bonne piste pour induire une plus forte expression du symporteur. La combinaison de composés tels que la dexaméthasone, l'hydrocortisone ou l'isobutylmethylxanthine avec des agonistes sélectifs de certains récepteurs de l'acide rétinoïque a par ailleurs permis d'améliorer la localisation à la membrane du NIS et l'efficacité des traitements⁴⁸. La compréhension des mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle du symporteur dans les carcinomes mammaires reste cependant nécessaire pour pouvoir atteindre des niveaux d'accumulation permettant d'envisager une radiothérapie à l'¹³¹I.

ii. Thérapie anticancéreuse par transfert génique

L'utilisation du transport d'iodures en thérapie anticancéreuse présente divers avantages⁷⁹ :

- les techniques et équipements nécessaires sont déjà bien connus des services de médecine nucléaire
- il est possible d'estimer par scintigraphie la quantité de cellules exprimant le symporteur ainsi que la dose de radioactivité spécifique reçue par les cellules
- les rayonnements émis par l'¹³¹I permettent d'atteindre les cellules tumorales qui n'expriment pas le NIS mais qui sont situées à proximité des cellules qui l'expriment
- le NIS peut être utilisé comme rapporteur pour visualiser l'expression de gènes transfectés.

L'idée d'utiliser ce transport pour traiter non seulement les carcinomes thyroïdiens et mammaires mais aussi un grand nombre d'autres cancers est donc apparue assez rapidement.

Des lignées cellulaires cancéreuses provenant de divers tissus et organes (ovaires, foie, colon, peau, seins, col de l'utérus, poumons, pancréas...) ont ainsi été transfectées *in vitro* avec l'ADNc du NIS, après quoi un transport d'iodures suffisant pour pouvoir détruire ces cellules a été observé. Les premières expériences d'implantation de ces cellules chez l'animal

suivies de l'administration d' ^{131}I n'ont cependant pas permis de diminuer la masse des cellules tumorales implantées. L'utilisation de promoteurs forts ou spécifiques des tissus ciblés a permis d'augmenter fortement les niveaux d'expression du NIS et le recours à des rétrovirus ou adénovirus a permis de vectoriser le gène du NIS *in vivo* dans des xéno greffes ou des tumeurs induites chimiquement. La combinaison de ces deux approches a permis d'obtenir à la fois une réduction importante du volume des tumeurs et un effet sélectif intéressant sur les cellules tumorales par rapport aux cellules saines^{80,81}. Plusieurs études ont par ailleurs montré que la thyroïde pouvait être protégée de la radiothérapie par un prétraitement hormonal⁷⁹ et une étude récente a démontré qu'il était possible de traiter des animaux de grande taille, tels que des chiens, par administration de doses d' ^{131}I similaires à celles utilisées dans les essais cliniques⁸².

Bien que tous ces résultats soient très prometteurs, l'efficacité et la spécificité de la vectorisation peuvent encore être améliorées, les mécanismes gouvernant le temps de rétention de l'iodure dans les tumeurs dans les conditions d'une thérapie génique restent à être étudiés et les capacités d'accumulation d'iodures peuvent encore être augmentées à condition d'optimiser la localisation des transporteurs à la membrane⁷⁹.

1.1.4. Conclusion

Le transport des ions iodures du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire constitue la première étape de la synthèse des hormones thyroïdiennes. La protéine responsable de ce transport est le symporteur sodium/iode, cloné en 1996. Les différentes études menées depuis cette date ont permis d'avancer dans la caractérisation structurale et fonctionnelle du symporteur ainsi que dans la connaissance des facteurs impliqués dans sa régulation transcriptionnelle. Nombre de questions restent cependant en suspens et tout particulièrement en ce qui concerne les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de la protéine. Il est pourtant nécessaire de comprendre comment ces mécanismes fonctionnent afin d'optimiser l'utilisation du symporteur à la fois pour le diagnostic et le traitement de diverses pathologies. La chimogénomique, dont nous allons parler dans une deuxième partie, est l'un des moyens disponibles pour explorer les systèmes biologiques complexes et tenter de comprendre leur fonctionnement. C'est l'approche que notre laboratoire a choisie afin d'approfondir les connaissances actuelles sur les mécanismes régulant le symporteur sodium/iode.

1.2. LA CHÉMOGÉNOMIQUE

1.2.1. La chémogénomique : définition

Les années 1990 ont vu se multiplier les projets de séquençage de génomes entiers (virus, bactéries, plantes, mammifères...) ⁸³. Ces projets ont mis à jour de nombreux gènes dont la fonction reste encore inconnue. Le défi consiste donc à relier l'ensemble de ces gènes à une ou plusieurs fonctions et à comprendre ce que chacun de ces gènes implique pour l'organisme. Une méthode classiquement utilisée pour répondre à cette question est d'introduire des mutations, ciblées ou aléatoires, et de relier le phénotype induit par ces mutations aux gènes mutés. Il existe cependant différents cas où la génétique conventionnelle ne permet pas d'obtenir les réponses escomptées :

- présence de duplicatas dans le génome permettant la mise en place de mécanismes de compensation pour pallier l'invalidité du gène muté
- aucun effet visible du fait des conditions expérimentales choisies
- mutation létale ne permettant pas de déterminer la fonction du gène muté
- difficulté à manipuler génétiquement certains organismes (faible efficacité de transfection ou de recombinaison homologe, absence de la machinerie nécessaire à l'utilisation de SiRNAs...)

La chémogénomique est une approche multidisciplinaire qui peut être utilisée en complément de la génétique ⁸⁴. Egalement appelée génétique chimique, elle consiste à perturber les systèmes biologiques, non pas par des mutations, mais au moyen de petites molécules organiques qui ciblent le produit des gènes, à savoir les protéines. L'utilisation de petites molécules présente divers avantages : leur action est rapide et contrôlable dans le temps ce qui évite la mise en place de processus de compensation et permet la manipulation de protéines même si elles sont indispensables au développement du sujet d'étude. Elles sont en outre faciles à manipuler, utilisables dans des cas où des mutations ne peuvent être envisagées et peuvent servir à la fois à la compréhension du fonctionnement d'un processus biologique et comme point de départ au développement de médicaments.

Comme en génétique, il existe deux manières de procéder pour explorer les fonctions biologiques : la méthode directe et la méthode inverse (Figure 8) ⁸⁵. En génétique chimique directe, des chimiothèques de composés sont criblées sur des cellules, des tissus ou des extraits afin d'identifier des molécules capables d'induire un phénotype donné. Les protéines cibles des molécules sélectionnées sont ensuite identifiées par différentes techniques génomiques ou biochimiques. Ce type d'approche a permis de découvrir, entre autres, la cyclooxygénase, une enzyme inhibée par l'aspirine qui s'est révélée être responsable de la synthèse des prostaglandines et des thromboxanes ⁸⁶.

Quant à la génétique chimique inverse, elle consiste à rechercher des molécules capables d'interagir avec une protéine isolée et de moduler son fonctionnement ⁸⁵. Les composés sélectionnés sont ensuite mis en présence de cellules ou de tissus pour observer le phénotype qui se développe lorsque l'activité de la protéine est perturbée et en déduire le rôle de la protéine dans une voie ou un processus biologique donné. Des molécules spécifiques de différentes isoformes de phosphoinositide 3-kinases ont ainsi permis d'élucider les rôles respectifs de ces isoformes dans la signalisation de l'insuline ⁸⁷.

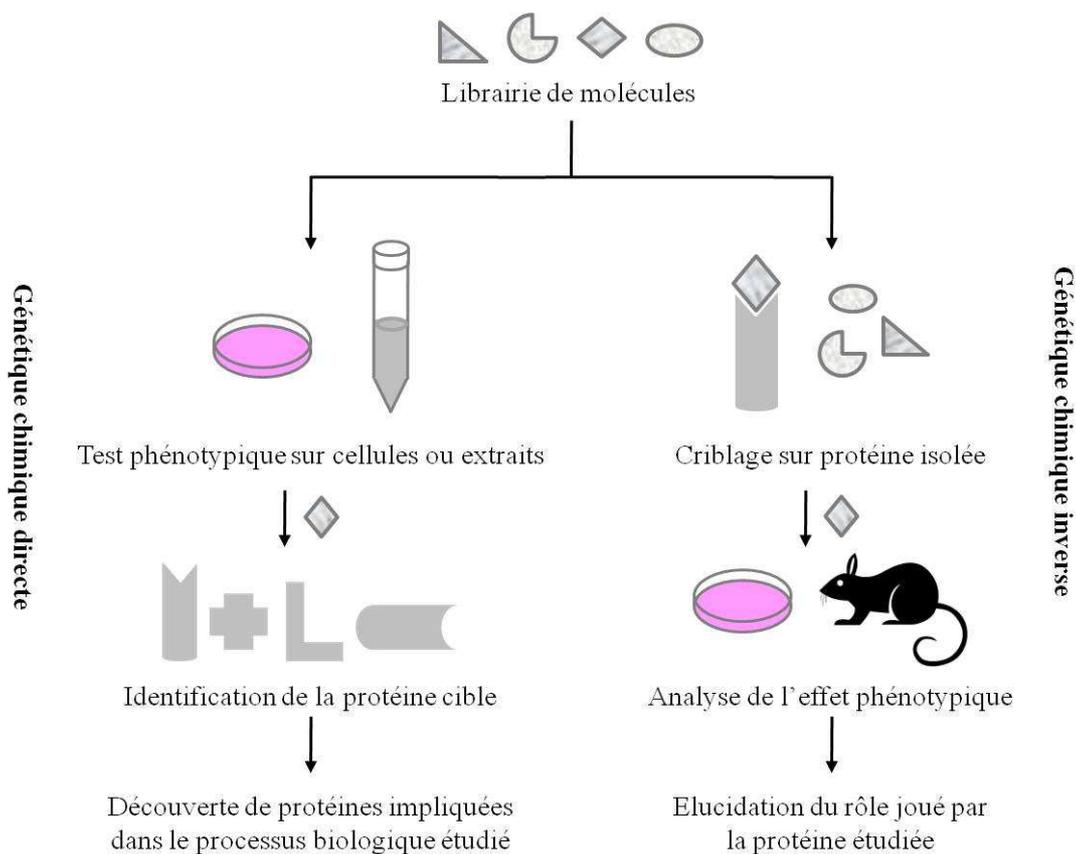


Figure 8. Représentation schématique des stratégies de génétique chimique

Afin d'identifier des acteurs de la régulation du symporteur sodium/iode, notre laboratoire a mis en place une stratégie de génétique chimique directe qui a conduit à l'identification de 10 molécules capables d'inhiber le transport d'iodures⁸⁸. Il s'agit donc maintenant d'isoler et d'identifier les protéines cibles de ces composés. L'identification des cibles biologiques d'un composé présente un grand nombre d'intérêts à la fois pour le milieu académique et pour l'industrie pharmaceutique : compréhension du mécanisme d'action de la molécule, compréhension du mécanisme biologique sur lequel le composé agit, anticipation des effets secondaires, découverte de potentiels thérapeutiques inattendus... Malgré les avancées technologiques, elle reste cependant un défi de taille avec de nombreux obstacles à surmonter et un grand nombre d'approches différentes ont été développées pour relever ce défi. Les techniques décrites ci-après font partie des plus couramment utilisées.

1.2.2. Identification des cibles biologiques d'un composé organique

1.2.2.a) Identification par déduction

Il arrive que le phénotype qui se développe en présence du composé évoque une situation déjà rencontrée dans d'autres études soit suite à l'utilisation d'un autre composé, soit à la suite de manipulations génétiques. Grâce à une étude approfondie du phénotype induit et par comparaison avec les données de la littérature, différentes protéines cibles candidates peuvent être envisagées. Il suffit alors de les tester une à une. C'est ainsi que la cible du Monastrol a été découverte. Ce composé s'est révélé capable de perturber la formation du fuseau mitotique sans agir pour autant sur la Tubuline⁸⁹. Un tel phénotype avait déjà été observé lors d'immunodépletions d'extraits d'œufs de *Xenopus* en kinésine Eg5 ou par inhibition de cette même kinésine par des anticorps⁹⁰. L'effet du Monastrol sur l'activité de cette protéine a donc été testé *in vitro* et il a ainsi pu être démontré que l'action du composé sur le fuseau mitotique était due à l'inhibition de la kinésine Eg5. Lorsqu'aucun élément ne permet de relier l'effet du

composé étudié à des données antérieures, d'autres méthodes non déductives doivent cependant être employées.

1.2.2.b) Méthodes génomiques et protéomiques

i. Mutations et modulations d'expression

Le but de ces méthodes est de trouver le gène dont la mutation ou l'inhibition d'expression par des siRNAs permet soit de contrer l'effet de la molécule d'intérêt, soit de recréer le phénotype observé. Parmi les exemples d'utilisation de telles méthodes, on peut citer l'étude menée par l'équipe de Xiaoming Li dans laquelle 49 composés ont été sélectionnés pour leur capacité à inhiber la croissance de la bactérie *Escherichia Coli*⁹¹. De nombreux mutants ont été générés afin de trouver les mutations permettant de contrer l'effet de ces composés. Dans la plupart des cas, la croissance des bactéries a été restaurée grâce à la surexpression d'une pompe d'efflux multi-drogues mais pour deux des composés testés, cette restauration a été obtenue suite à l'inhibition d'expression d'une dihydrofolate réductase. Suite à cette observation, des tests ont été réalisés *in vitro* et *in vivo*. Ils ont permis de démontrer que ces deux composés étaient des inhibiteurs compétitifs de cette protéine. Ce type d'étude ne reste cependant réalisable qu'à partir du moment où l'on travaille avec des organismes manipulables génétiquement.

ii. Profilages transcriptionnel et protéomique

La présence d'une molécule organique dans une cellule, un tissu ou un organisme vivant conduit souvent à des modifications des niveaux d'expression d'un certain nombre de gènes et/ou de protéines. Les profilages transcriptionnels et protéomiques consistent donc à comparer les profils d'expression obtenus en présence et absence du composé (au moyen de puces à ADN, de gels d'électrophorèse 2D ou de techniques protéomiques quantitatives) afin d'identifier la voie ciblée par la molécule d'intérêt. Le grand avantage de ces méthodes est de donner une vue d'ensemble des modifications induites par la molécule.

Dans le cas du profilage transcriptionnel, des bases de données ont été créées pour aider à la sélection de cibles potentielles⁹². Ces bases de données rassemblent les profils d'expression induits par des manipulations génétiques ou par des molécules dont la cible biologique est connue. Elles permettent ainsi la comparaison avec la réponse transcriptionnelle générée par une molécule nouvelle. En suivant ce type de procédure, l'équipe de Justin Lamb a identifié la cible protéique de la Gédunine. Ce composé présentait une signature d'expression génique hautement similaire à celle d'inhibiteurs de l'« Heat Shock Protein 90 » (Hsp90)⁹³. Les niveaux d'expression de protéines dont la maturation est connue pour dépendre de l'Hsp90 ont donc été mesurés en présence de Gédunine et ces mesures ont permis de confirmer que la Gédunine est un inhibiteur de l'Hsp90.

iii. Méthodes basées sur l'affinité du composé pour sa cible

Ces méthodes reposent sur la reconnaissance de la protéine cible par le composé d'intérêt. Nous décrirons ici les quatre méthodes les plus couramment utilisées dans la littérature (Figure 9)^{94,95}. Dans la technique de « triple hybride » (Figure 9.A), deux protéines hybrides sont exprimées dans chaque cellule. La première associe une protéine se liant à l'ADN (LexA) au site de liaison d'un récepteur au ligand connu, comme le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) par exemple. La deuxième consiste en une combinaison entre l'une des protéines à tester (Library Protein) et un domaine d'activation de la transcription (Activation Domain). La molécule d'intérêt (Test Ligand) associée au ligand du récepteur choisi (la Dexaméthasone pour le récepteur aux glucocorticoïdes) est ensuite ajoutée. Si la molécule

d'intérêt reconnaît la protéine test, le domaine d'activation transcriptionnelle se retrouve recruté au niveau de l'ADN et un gène rapporteur est transcrit. Cette méthode initialement développée dans des cellules de levure, comme la technique « double hybride » dont elle est dérivée, a également été adaptée aux cellules de mammifères.

La technique de présentation de protéines (Figure 9.B) consiste à construire une librairie d'ADNc dans des virus appelés phages. Chaque phage exprime alors une protéine test fusionnée aux protéines de sa capside (enveloppe protéique qui protège l'ADN localisé dans la tête du phage). En parallèle, la molécule d'intérêt est biotinylée puis fixée sur une colonne fonctionnalisée par de l'Avidine. La collection de phage est alors passée sur la colonne et les phages retenus sont élués par addition de Biotine. Ces phages sont amplifiés par infection de cultures bactériennes et sont réutilisés pour un nouveau cycle de sélection. L'identité de la protéine reconnue par la molécule d'intérêt est ensuite déterminée par séquençage de l'ADNc contenu dans les derniers phages sélectionnés.

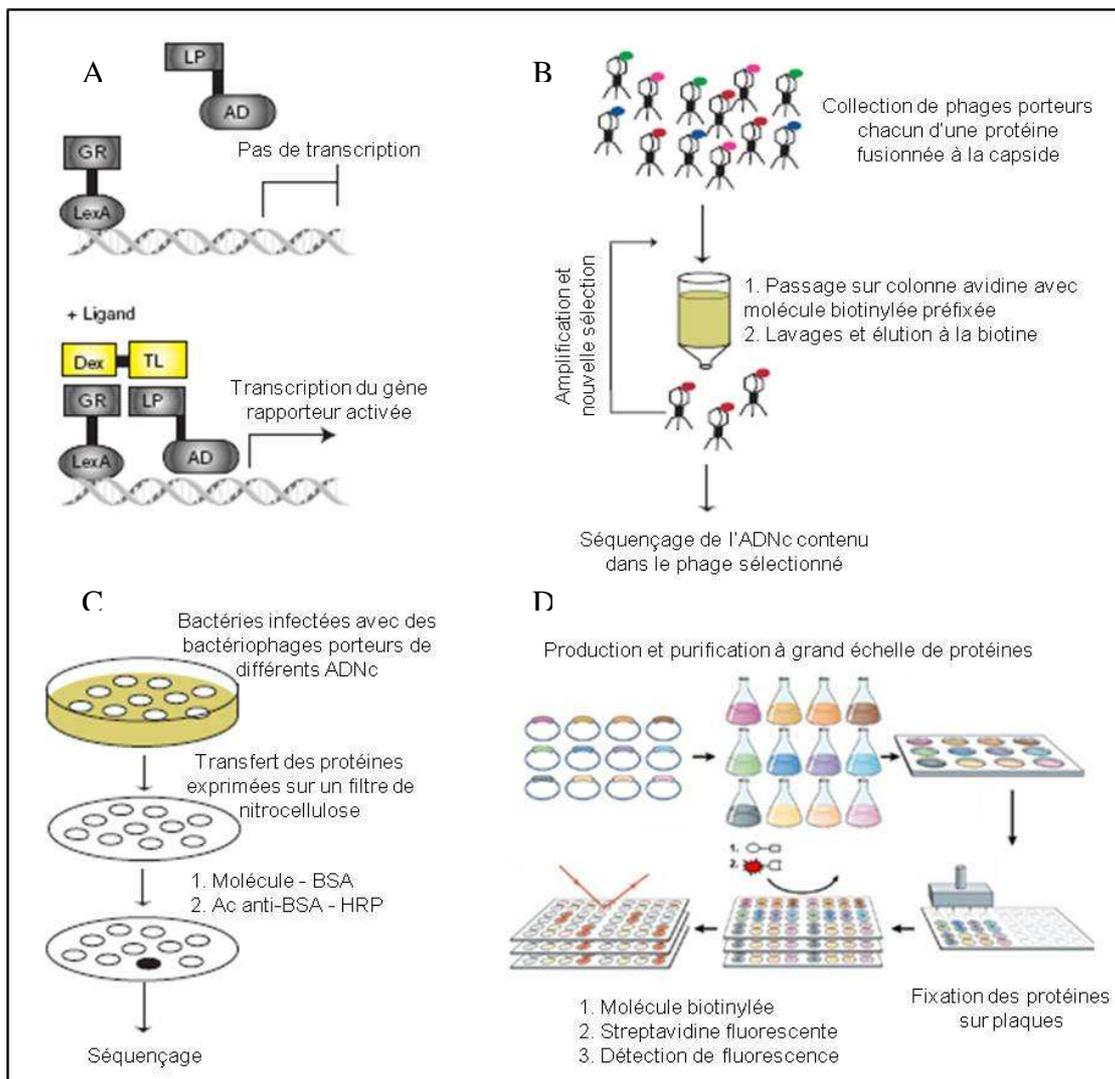


Figure 9. Représentation schématique des techniques génomiques basées sur l'affinité entre une molécule et sa protéine cible (d'après King⁹⁴ et Kung *et al.*⁹⁵)

- A) Technique « triple hybride », B) Technique de présentation de protéines, C) Drug Western, D) Test de liaison sur micropuce à protéines

Les phages peuvent également être employés lors de Drug Western (Figure 9.C). Dans ce cas, des cultures bactériennes sont réalisées et chacune d'entre elles est infectée par un phage porteur de l'un des ADNc à tester. Lors de l'infection, la machinerie des bactéries est réquisitionnée pour exprimer les protéines du phage, dont celle correspondant à l'ADNc

souhaité. Les cellules bactériennes sont ensuite lysées et les protéines ayant été exprimées sont transférées sur un filtre de nitrocellulose. L'incubation de ce filtre avec la molécule d'intérêt couplée à de l'albumine sérique bovine (BSA) puis avec un anticorps anti-BSA fusionné à de l'« horseradish peroxidase » (HRP) permet de localiser la colonie qui exprime la protéine cible. L'ADNc porté par le phage qui a infecté cette colonie est ensuite séquencé pour identifier la protéine reconnue par la molécule d'intérêt.

Les tests sur micropuces à protéines consistent quant à eux à produire et à purifier un grand nombre de protéines qui sont ensuite greffées sur un support solide (Figure 9.D). La molécule d'intérêt couplée à une molécule de Biotine est mise en contact avec l'ensemble de ces protéines puis une Streptavidine conjuguée à un fluorophore est ajoutée afin de visualiser la ou les protéine(s) reconnue(s) par la molécule. Certaines des micropuces utilisées peuvent contenir jusqu'au protéome entier de la levure, ce qui permet de tester l'interaction de la molécule avec un très grand nombre de protéines différentes en une seule expérience. La nécessité d'obtenir l'ensemble des protéines sous forme purifiée peut toutefois rendre la technique plus consommatrice en temps que les trois précédentes.

Ces méthodes d'affinité dites génomiques permettent de tester les différentes interactions possibles d'une molécule organique avec l'ensemble des protéines d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme. Elles sont rapides à mettre en œuvre (si l'on omet la préparation des micropuces à protéines), très sensibles, ce qui les rend particulièrement adaptées à l'identification de protéines faiblement exprimées, et permettent de faire directement un lien entre la protéine cible et la séquence ADN qui la code. Ces méthodes impliquent cependant pour les protéines des modifications qui ne sont pas toujours compatibles avec leur structuration. De plus, les interactions sont toutes étudiées protéine par protéine ce qui empêche de mettre en évidence des cibles correspondant à des complexes protéiques.

1.2.2.c) Méthodes biochimiques

Les méthodes biochimiques consistent, selon des stratégies diverses, à isoler la ou les protéine(s) cible(s) depuis un milieu biologique complexe en se servant de l'affinité de ces protéines pour la molécule étudiée. Ces approches sont en général plus accessibles à des non-biologistes que les méthodes génomiques. C'est pourquoi nous avons choisi de nous y intéresser plus particulièrement.

i. La chromatographie d'affinité

La méthode biochimique la plus classique pour isoler une protéine d'intérêt consiste à réaliser une chromatographie d'affinité à l'aide d'une résine sepharose ou agarose fonctionnalisée par la molécule d'intérêt⁹⁶. La résine portant le composé est incubée avec un lysat cellulaire puis des lavages sont effectués afin d'éliminer les protéines fixées de manière non-spécifique sur la résine (Figure 10). Les protéines retenues par la molécule supportée sont éluées et séparées sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Les bandes visualisées sur le gel sont excisées et digérées par de la trypsine afin d'obtenir des peptides qui sont ensuite analysés par spectrométrie de masse. Les spectres résultant de cette analyse sont enfin comparés à des données de digestion tryptique théorique présentes dans des bases de données afin d'identifier la ou les protéine(s) présente(s) dans les bandes excisées.

Ce type d'approche, mettant en jeu des interactions d'affinité réversibles entre un ligand et sa cible, a été utilisé avec succès dans différentes études. On peut citer par exemple le cas de l'immunosuppresseur FK506 dont le dérivé supporté a permis d'identifier la « FK506 Binding Protein 12 » (FKBP12), cette protéine n'étant retenue que si la résine est fonctionnalisée par le composé⁹⁷. Plus récemment, le travail réalisé par l'équipe de Stéphane Bach a permis de déterminer la sélectivité de la Roscovitine, un inhibiteur de kinases⁹⁸. La fixation de la

Roscovitine sur de l'agarose *via* un bras espaceur polyéthylène glycol et l'incubation de la résine obtenue avec des protéines de cerveau de porc a permis d'isoler à la fois des cibles déjà connues et une protéine inattendue, la Pyridoxal Kinase. L'interaction de la Roscovitine avec cette protéine a ensuite été confirmée par des expériences de compétition.

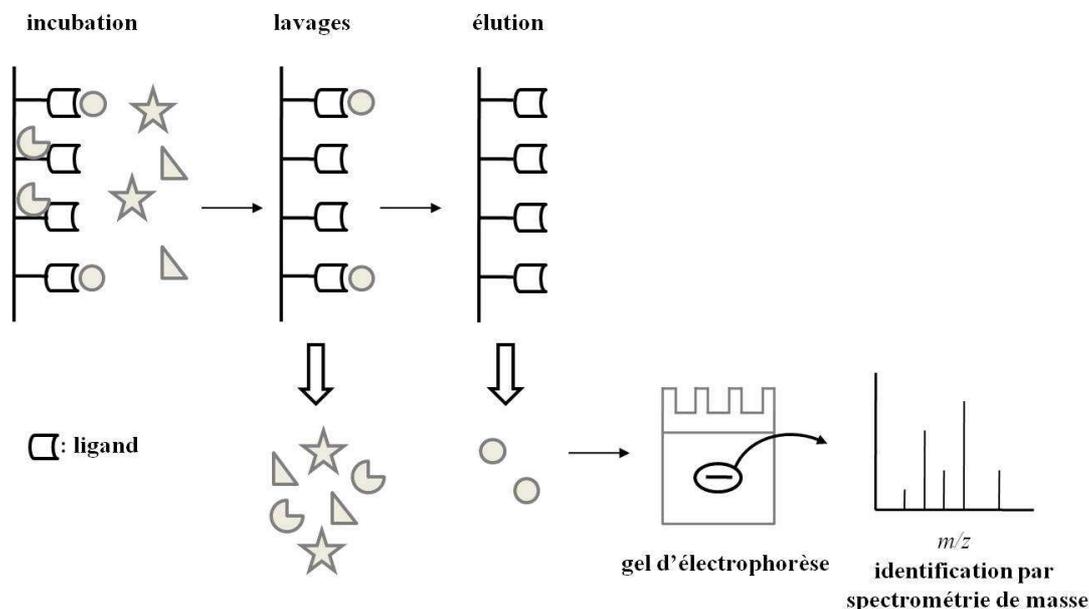


Figure 10. Identification d'une protéine cible par chromatographie d'affinité

Bien que très performante dans les résultats qu'elle permet d'obtenir, la chromatographie d'affinité présente un certain nombre de limitations. La première réside dans la fixation de la molécule sur la résine, fixation qui peut conduire à une diminution d'affinité du composé supporté vis-à-vis de ses cibles. Afin de réduire l'encombrement créé par la résine, la molécule est généralement fixée *via* un bras espaceur. Ce bras peut être flexible (dérivés du polyéthylène glycol) ou rigide (bras à base de polyproline par exemple⁹⁹). Dans tous les cas, coupler un bras espaceur à une molécule d'intérêt nécessite d'étudier au préalable la relation structure-activité de cette molécule⁹⁶. L'activité du composé supporté ne pouvant être testée, il est nécessaire en effet de s'assurer que le bras espaceur ne sera pas introduit *via* une fonction indispensable à l'activité de la molécule. Or, étudier la relation structure-activité d'un composé peut se révéler très coûteux en temps. Une autre stratégie de fixation a toutefois été proposée par l'équipe d'Osada¹⁰⁰. Dans cette approche, la fixation de la molécule sur la résine est réalisée sous irradiation lumineuse grâce à une trifluorométhylphényldiazirine placée à l'extrémité du bras espaceur déjà lié à la résine. Bien que le site de liaison soit inconnu, il semble que la résine ainsi obtenue ait permis d'isoler les protéines cibles de deux molécules déjà étudiées : la Cyclosporine A et l'immunosuppresseur FK-506.

Un autre problème inhérent à la chromatographie d'affinité provient de la fixation de protéines non-spécifiques sur la résine. Afin de réduire la quantité de protéines non spécifiques récupérées dans l'échantillon final, le bras espaceur peut être modifié pour que son hydrophilie soit augmentée⁹⁶. Si la molécule est suffisamment soluble en milieu aqueux, les protéines peuvent en outre être éluées avec un excès de molécule libre afin d'obtenir une élution plus spécifique qu'avec un tampon dénaturant.

L'évaluation de la spécificité de rétention des protéines sur la résine greffée nécessite un certain nombre de contrôles (Figure 11.A). Une expérience contrôle classique consiste à utiliser une résine sans composé⁹⁷ ou une résine fonctionnalisée par une molécule inactive structurellement très similaire au composé étudié (énantiomère⁹⁸ ou analogue structural¹⁰¹). Dans les deux cas, les protéines isolées par la résine contrôle sont décomptées de la liste des protéines obtenues avec la résine fonctionnalisée par le composé actif. Une deuxième

expérience contrôle fréquemment utilisée est l'expérience de compétition. Cette expérience consiste à préincuber le lysat avec un excès de molécule libre avant de passer le mélange sur la résine^{102,103}. Si la molécule libre et la molécule supportée possèdent la même affinité pour leur(s) cible(s), l'excès de molécule libre va empêcher les cibles de se fixer sur la colonne. Ainsi, toutes les protéines pour lesquelles un signal diminué sera observé en présence de la molécule libre pourront être considérées comme interagissant spécifiquement avec la résine fonctionnalisée.

Afin d'augmenter la sensibilité et la pertinence des expériences contrôles, une étude récente a proposé de coupler la chromatographie d'affinité à des techniques protéomiques quantitatives (Figure 11.B)¹⁰⁴. Pour ce faire, des lysats sont préparés à partir de deux échantillons cellulaires différents, l'un cultivé en présence d'arginines et de lysines marquées au ¹³C et à l'¹⁵N et l'autre cultivé dans des conditions classiques. Le lysat contenant les protéines marquées est préincubé avec un excès de molécule d'intérêt avant d'être incubé avec une résine fonctionnalisée par cette même molécule. L'autre lysat est directement incubé avec une deuxième résine, elle aussi fonctionnalisée par la molécule d'intérêt. Après lavages, les protéines retenues par chacune des résines sont éluées, combinées puis digérées. Les peptides obtenus sont ensuite analysés par LC-MS. Les peptides « lourds » et « légers » possédant la même séquence sont élués au même moment puisqu'ils possèdent les mêmes propriétés physico-chimiques. Ils peuvent par contre être distingués sur les spectres de masse selon l'expérience de chromatographie qui a permis de les sélectionner puisque leur masse est différente. Les protéines non spécifiques se fixent de la même manière sur la résine que l'on ait procédé ou non à une préincubation avec la molécule libre. Elles sont donc identifiées sur les spectres de masse par un rapport d'intensité entre peptides « jumeaux » égal à 1, tandis que les protéines spécifiques sont identifiées par un rapport différent de 1.

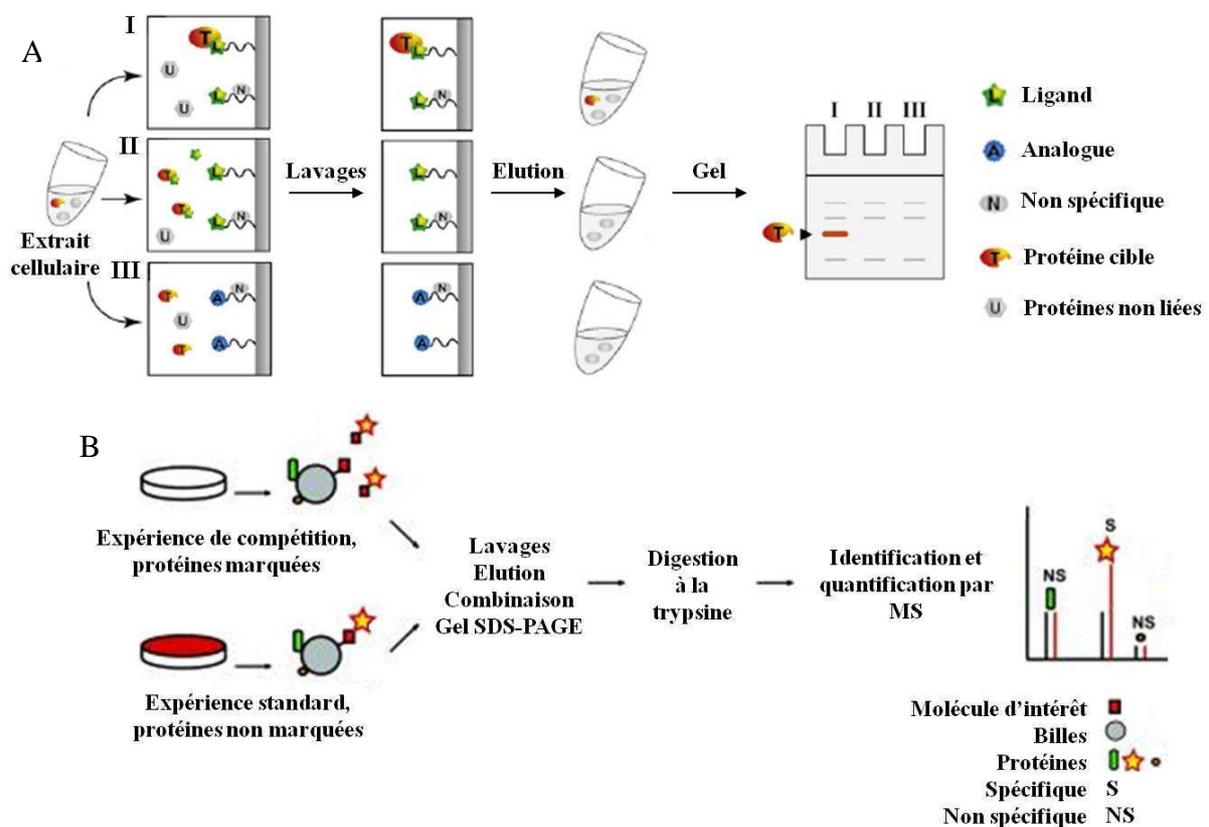


Figure 11. Méthodes pour distinguer les protéines cibles des protéines non spécifiques (d'après Sato *et al.*¹⁰⁵ et Ong *et al.*¹⁰⁴)

A) Expériences contrôles, II = expérience de compétition, III = expérience de l'analogue inactif
 B) Couplage de la chromatographie à une technique protéomique quantitative

La dernière limitation de la technique de chromatographie d'affinité réside dans la nécessité d'utiliser des molécules possédant une forte affinité pour leur protéine cible¹⁰⁵. Or la cible n'étant précisément pas connue, l'affinité de la molécule pour sa cible ne peut pas être déterminée. La concentration effective du composé (ou EC₅₀), déterminée lors de tests cellulaires, est alors souvent utilisée pour estimer cette affinité. On considère généralement que plus la molécule est efficace, plus il y a de chances pour que son affinité vis-à-vis de la protéine cible soit grande. L'efficacité d'un composé ne dépend cependant pas que de son affinité pour sa cible. D'autres paramètres tels que la solubilité du composé, sa capacité à traverser les membranes ou sa propension à être métabolisé par des enzymes entrent également en jeu. Un composé d'efficacité moyenne peut donc avoir une affinité suffisante pour que pour sa protéine cible puisse être isolée par chromatographie d'affinité et à l'inverse, il se peut qu'un composé très efficace ait une affinité insuffisante pour cela.

ii. Les sondes fonctionnalisées

Une variante de la technique présentée ci-dessus consiste à construire des sondes basées sur le couplage de la molécule d'intérêt avec une ou plusieurs étiquettes (molécule de Biotine, fluorophore ou isotope radioactif) permettant de visualiser le complexe molécule-protéine formé et/ou d'isoler ce complexe. Ces sondes présentent deux grands avantages par rapport à la chromatographie d'affinité : 1) elles permettent d'interagir avec la protéine cible au sein de cellules vivantes et 2) il est possible de déterminer leur activité avant de les utiliser. Pour que les étiquettes ne soient pas perdues lors des étapes de lyse, de lavages, d'électrophorèse ou de transfert sur membrane, il est toutefois souvent nécessaire de former une liaison covalente entre la sonde et la protéine cible. Après avoir discuté des avantages et inconvénients spécifiques à chacune des étiquettes évoquées ci-dessus, nous détaillerons donc comment cette liaison covalente peut être formée.

Sondes biotinylées

Le principal intérêt de la Biotine réside dans l'affinité extrêmement forte qu'a cette molécule pour les protéines Avidine (Kd ~ 10⁻¹⁰ M), Streptavidine et NeutrAvidine (Kd ~ 10⁻¹⁵ M). La Streptavidine et la NeutrAvidine correspondent à des versions non glycosylées et non chargées de l'Avidine ; elles ont moins tendance à se lier aux protéines de manière non spécifique et sont ainsi couramment utilisées bien qu'elles soient moins abordables économiquement que l'Avidine.

Les sondes issues de l'association covalente entre une molécule d'intérêt et une molécule de Biotine peuvent être employées de plusieurs manières différentes⁹⁶. De façon analogue aux chromatographies d'affinité classiques, elles peuvent être associées à la résine avant d'être incubées avec un lysat cellulaire. Alternativement, l'association de la sonde avec la résine peut être réalisée après que la protéine cible ait été marquée par la sonde en solution. De cette manière, l'interaction entre la molécule et sa cible peut avoir lieu sans être gênée par la présence de la résine. Les sondes biotinylées étant généralement capables de traverser les membranes cellulaires, elles peuvent en outre être utilisées dans un environnement cellulaire natif. Cette option est particulièrement intéressante si l'on considère que le processus de lyse peut perturber la conformation de certaines protéines et qu'une interaction détectée dans un lysat ne correspond donc pas toujours à une interaction ayant réellement lieu dans une cellule. L'avantage des sondes biotinylées par rapport aux sondes fluorescentes et radioactives est que les protéines marquées par ces sondes peuvent à la fois être visualisées à l'aide d'Avidine, de Streptavidine ou de NeutrAvidine conjuguées à un fluorophore et être isolées grâce à des résines fonctionnalisées avec l'une ou l'autre de ces trois protéines.

Dans la littérature, il existe différents exemples d'identifications réalisées au moyen de sondes biotinylées. Parmi ceux utilisant une sonde préfixée sur la résine, on peut citer les travaux réalisés avec la Withaferine A (**1**), un composé induisant l'agrégation des microfilaments d'actine et qui s'est avéré être lié de manière covalente à l'Annexine II¹⁰⁶, ou ceux portant sur le Bistramide A (**4**), un composé naturel marin aux propriétés antiprolifératives dont la sonde biotinylée (**5**) a permis d'isoler l'Actine alors qu'un intermédiaire de synthèse tronqué (**6**) n'y est pas parvenu¹⁰⁷ (Figure 12). Quant aux cibles identifiées par incubation de la sonde avec des cultures cellulaires, on peut noter l'exemple particulièrement intéressant de la Vimentine, une protéine qui s'est avérée être liée elle aussi de manière covalente à la Withaferine A. Cette cible a été découverte un an après l'Annexine II grâce à une sonde possédant simplement un bras espaceur plus long (**3**)¹⁰⁸ (Figure 12.A). Ce résultat montre à quel point la conception de la sonde et des expériences peut influencer sur l'identification de l'une ou l'autre des cibles d'une même molécule.

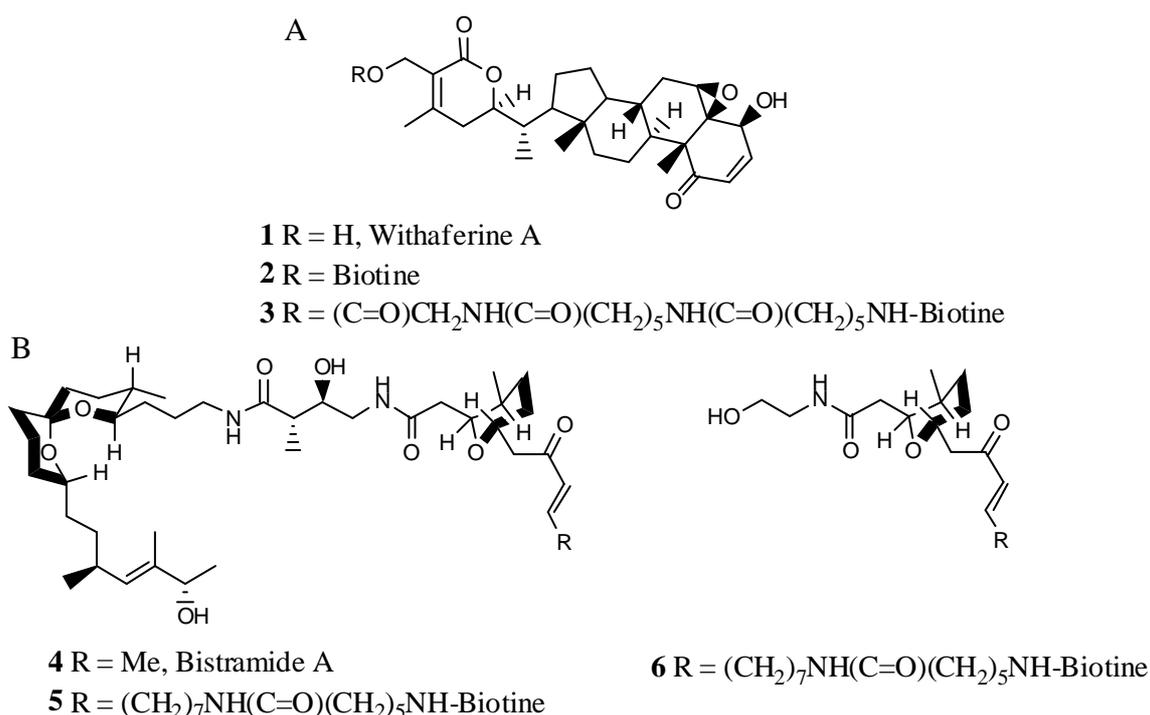


Figure 12. Exemple de sondes biotinylées
 (d'après Falsey *et al.*¹⁰⁶, Bargagna-Mohan *et al.*¹⁰⁸ et Statsuk *et al.*¹⁰⁷)

A) exemple de la Withaferine A ; **2** : sonde ayant isolé l'Annexine II, **3** : sonde ayant isolé la Vimentine
 B) exemple du Bistramide A ; **5** : sonde biotinylée, **6** : sonde biotinylée tronquée

L'utilisation de sondes biotinylées présente tout de même certains inconvénients. La présence d'une molécule de Biotine a tendance à diminuer la solubilité des composés tant en milieu aqueux que dans les solvants organiques, ce qui peut poser des problèmes à la fois lors de la synthèse de la sonde biotinylée et lors de son utilisation pour marquer des protéines en solution ou au sein de cellules⁹⁶.

Par ailleurs, la force des liaisons Biotine-Avidine, Biotine-Streptavidine et Biotine-NeutrAvidine étant très forte, l'élution des protéines retenues par la résine ne peut se faire que dans des conditions drastiques (milieu réducteur, haute température, présence de détergent...), ce qui conduit à la dénaturation des protéines et exclue la possibilité d'isoler des protéines fonctionnelles ou des complexes protéiques¹⁰⁹. Pour pallier ce problème, divers bras espaceurs conçus pour être clivables dans des conditions douces peuvent être insérés entre la molécule d'intérêt et la molécule de Biotine. Ces bras peuvent contenir une liaison disulfure¹¹⁰, un lien diazobenzène¹¹¹, un lien acylhydrazone¹¹², une fonction ester encombrée¹¹³, une séquence reconnue par une protéase^{99,114} ou être clivables sous irradiation lumineuse¹¹⁵. Dans une étude récente, visant à démontrer ce concept, une Gyrase B

fonctionnelle a été isolée à partir d'un lysat d'*Escherichia Coli* grâce à un bras espaceur biotinylé contenant un lien diazobenzène (7) couplé à un inhibiteur de la Gyrase B, la Novobiocine¹⁰⁹ (Figure 13). La plupart des liens clivables permettent en outre d'éluer sélectivement les protéines marquées par la sonde, limitant ainsi la quantité de protéines non-spécifiques co-éluées.

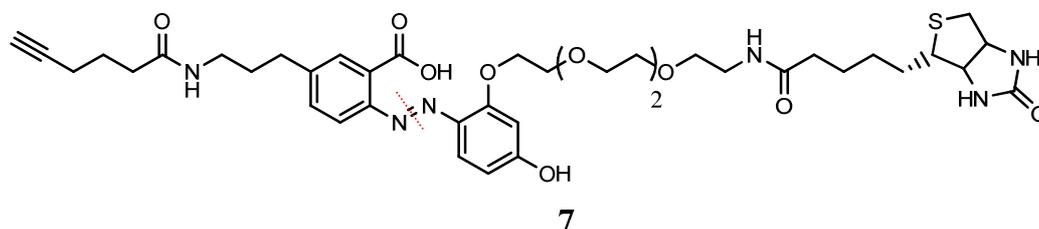


Figure 13. Exemple de bras clivable ayant permis d'isoler une protéine fonctionnelle (d'après Budin *et al.*¹⁰⁹)

Sondes fluorescentes et radioactives

Les fluorophores et les isotopes radioactifs permettent comme la Biotine de visualiser la formation du complexe molécule-protéine et donc de le localiser dans une cellule ou sur un gel SDS-PAGE (à condition pour ce dernier que la sonde soit liée de manière covalente à sa cible). Les procédures de détection de ces marqueurs ont l'avantage d'être plus rapides que celles utilisées dans le cas de la Biotine et dans les deux cas, les sondes peuvent être utilisées, après identification de la cible, pour des expériences d'imagerie *in vivo* afin de caractériser la fonction de la protéine identifiée¹¹⁶.

Le principal atout des isotopes radioactifs réside dans leur petite taille qui permet de marquer une molécule sans en altérer la structure (³H, ¹⁴C). Un exemple de sonde marquée au tritium a été rapporté par l'équipe de Craig M. Crews. Cette sonde a permis d'isoler la cible d'un produit naturel issu d'une herbe médicinale chinoise : le Triptolide¹¹⁷. La sonde a été incubée avec des cellules HeLa après quoi les cellules ont été lysées, les protéines séparées sur une colonne échangeuse d'anions et les fractions radioactives séparées sur un gel SDS-PAGE réalisé en conditions non dénaturantes. La coloration au bleu de Coomassie de ce gel a révélé une bande dont l'intensité de coloration était proportionnelle à l'intensité de radioactivité des différentes fractions. L'analyse en masse de cette bande a alors permis d'identifier la protéine liée de manière non covalente au Triptolide comme étant un canal calcique appelé PC2. La manipulation de molécules radioactives comporte cependant un certain nombre de contraintes, notamment en termes de sécurité et de gestion des déchets, ce qui n'est pas le cas des sondes fluorescentes.

Les sondes fluorescentes sont souvent utilisées dans une première étape pour visualiser la reconnaissance de protéines par la sonde, étudier l'activité cellulaire de la molécule d'intérêt ou avoir une idée du compartiment cellulaire dans lequel sont localisées les protéines cibles. Cette dernière information permet de ne réaliser les expériences de capture que sur les compartiments cellulaires intéressants, ce qui limite la quantité de protéines mises en contact avec la sonde et donc le nombre de liaisons non spécifiques potentielles¹⁰⁵. Comme ces sondes ne permettent pas à elles seules d'isoler la protéine reconnue, elles sont très souvent associées à une molécule de Biotine pour l'étape de capture, ce qui est souvent aussi le cas des sondes radioactives. L'étude menée par l'équipe de Benjamin F. Cravatt sur le composé (-)-FR182877 (8), dont la cible covalente s'est avérée être la Carboxylestérase-1, est un exemple d'une telle combinaison (Figure 14)¹¹⁸. L'ajout d'un fluorophore sur une molécule présente toutefois l'inconvénient, au contraire des sondes radioactives, de modifier de manière importante la structure de cette molécule.

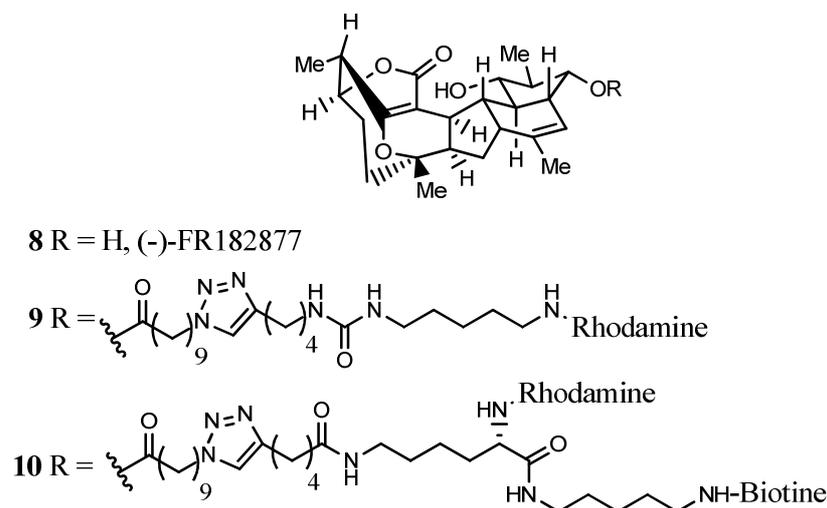


Figure 14. Sondes fluorescentes utilisées pour découvrir la cible protéique du composé (-)-FR182877 (d'après Adam *et al.*¹¹⁸)

La Biotine et le fluorophore peuvent être présents sur la sonde dès l'étape d'incubation avec les cellules mais ces étiquettes peuvent également être additionnées dans le lysat après que la cible ait été reconnue par la molécule d'intérêt dans le milieu cellulaire natif. Cette alternative permet d'incuber les cellules avec un composé minimal, très similaire au composé parent, et de n'ajouter qu'après lyse les fonctions nécessaires à la visualisation et à la purification de la protéine marquée¹¹⁶. Cette option a été rendue possible grâce à l'adaptation de deux réactions de ligation chimique : la réaction de cyclisation de Huisgen, cyclo-addition [2+3] entre un alcyne et un azoture catalysée par le cuivre (Figure 15.B)¹¹⁹, et la réaction de Staudinger permettant de former un amide à partir d'un azoture et d'une phosphine fonctionnalisée de manière appropriée (Figure 15.A)¹²⁰. Les réactifs de ces deux réactions sont parfaitement bio-orthogonaux, ce qui signifie qu'ils réagissent sélectivement entre eux même en présence des diverses fonctions chimiques dont sont constituées les biomolécules. D'autre part, ces réactions peuvent toutes deux être réalisées en solution aqueuse.

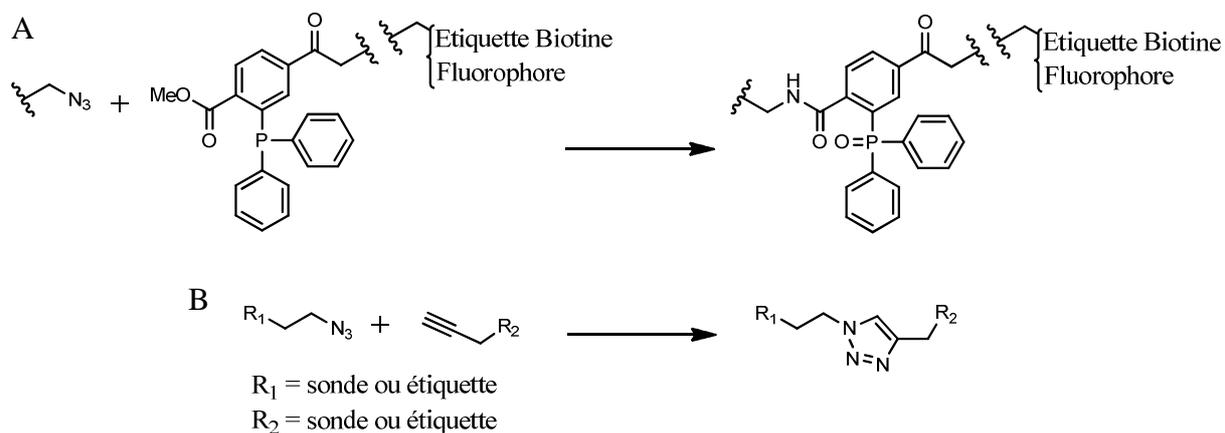


Figure 15. Réactions de ligation bio-orthogonales (d'après Sadaghiani *et al.*¹¹⁶)

A) Réaction modifiée de Staudinger

B) réaction « click »

Parmi les exemples utilisant ce type de stratégies, on peut citer l'identification des protéines cibles du 4-hydroxynonéal, un électrophile particulièrement toxique produit lors de stress oxydants¹²¹, ou celles d'une sonde à base de cyclohexadione conçue pour identifier les protéines dont les fonctions sulfhydriles sont modifiées en acide sulfénique après exposition des cellules à des agents oxydants doux¹²².

Sondes électrophiles

Comme nous l'avons vu précédemment, un grand nombre d'applications des sondes biotinylées, fluorescentes et radioactives nécessite qu'une liaison covalente soit formée entre la sonde et la ou les protéine(s) cible(s). Le premier moyen pour créer cette liaison covalente est d'utiliser une sonde comportant une fonction électrophile (époxyde^{123,124}, fluorophosphonate¹²⁵, carbonyle¹²¹...).

De nombreuses « Activity Based Probes » (ABPs) sont conçues sur ce principe. Les ABPs sont des sondes qui se fixent dans le site actif de protéines appartenant à une même famille enzymatique. Certaines familles d'enzymes sont caractérisées par la présence dans leur site actif d'acides aminés nucléophiles fortement conservés. Dans ce cas, le couplage d'une molécule reconnaissant spécifiquement le site actif des protéines d'une famille à une fonction électrophile permet de marquer de manière covalente le site actif de toutes les protéines de cette famille¹²⁶. Etant donné que ces sondes sont conçues afin de ne reconnaître les protéines que lorsqu'elles sont actives, elles sont souvent utilisées pour déterminer dans quelles conditions une famille d'enzymes est activée ou pour permettre le screening de nouvelles molécules capables d'inactiver ces enzymes (expériences de compétition).

Ce concept de protéines venant d'elles-mêmes se fixer de manière covalente à la sonde peut aussi être employé dans des études portant sur des molécules d'intérêt électrophiles dont on peut suspecter qu'elles se lient de manière covalente à leur(s) cible(s). L'étude des polyphénols de type catéchol en est un exemple¹²⁷. Les catéchols sont connus pour former en milieu oxydant une quinone qui réagit rapidement avec les fonctions sulfhydriles des protéines. Afin de déterminer à quelles protéines appartiennent les fonctions sulfhydriles modifiées par les polyphénols de type catéchol, une sonde biotinylée à base d'acide 3,4-dihydroxyphényl acétique (**11**) a été synthétisée et incubée avec des cellules en conditions oxydantes (Figure 16). Cette expérience a permis de démontrer que l'Actine fait partie des protéines marquées par ce type de polyphénols.

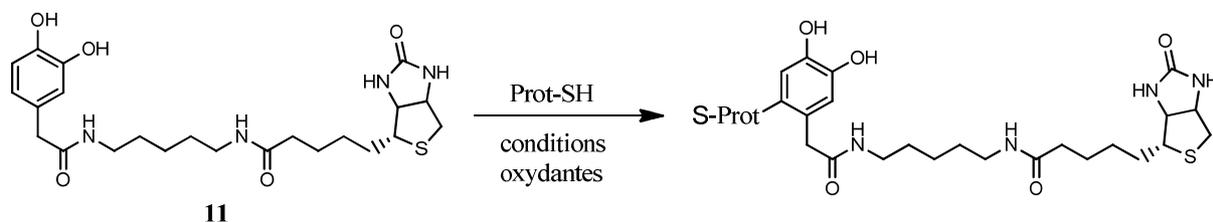


Figure 16. Sonde utilisée pour identifier les cibles de polyphénols de type catéchol (d'après Ishii *et al.*¹²⁷)

Pendant, lorsque les protéines de la famille enzymatique visée ne possèdent pas d'acide aminé nucléophile dans leur site actif ou quand le mécanisme d'action de la molécule d'intérêt et la fonction des protéines cibles sont totalement inconnus, les sondes électrophiles ne peuvent être utilisées. Une alternative intéressante consiste alors à ajouter à la sonde un groupement photoactivable.

Sondes photoactivables

Les fonctions photoactivables sont des fonctions qui génèrent, sous irradiation lumineuse, des espèces réactives, capables de former une liaison covalente avec les fonctions chimiques situées à proximité. Leur utilisation est particulièrement intéressante lorsqu'aucune information sur la protéine cible n'est disponible (protéine abondante ou non, protéine membranaire ou cytosolique, affinité de la protéine pour la molécule...) Les caractéristiques d'une sonde photoactivable idéale sont les suivantes¹²⁸ :

- une stabilité « raisonnable » à la lumière ambiante
- une longueur d'onde d'activation supérieure à 300 nm pour ne pas endommager les protéines qui absorbent dans l'ultraviolet
- un état excité dont la durée de vie est suffisamment courte pour que la liaison se forme avant que la protéine et son ligand ne se dissocient mais suffisamment longue pour que la liaison ait le temps de se former
- une photochimie conduisant à un seul type d'adduit covalent
- une forme activée capable de réagir tant avec les liaisons carbone-hydrogène qu'avec les liaisons hétéroatome-hydrogène.

Depuis la découverte du photomarquage d'affinité, différents groupements photoactivables ont été développés¹²⁹. Les groupements les plus couramment utilisés sont les aryl-azotures, les benzophénones et les trifluorométhylphényldiazirines (Figure 17).

Les azotures ont l'avantage d'être relativement aisés à préparer et de ne modifier que modestement la structure de la molécule d'intérêt. Sous irradiation (~300 nm), ils produisent des nitrènes (Figure 17.A) qui s'insèrent dans les liaisons C-H, N-H ou O-H des protéines. Bien que très souvent employés dans les expériences de photomarquage, les azotures présentent certains inconvénients :

- des longueurs d'onde inférieures à 300 nm, pouvant être néfastes aux protéines, sont souvent nécessaires pour obtenir une photodécomposition efficace
- ils sont généralement moins réactifs que les carbènes
- ils forment des liaisons N-N et N-O moins stables que les liaisons impliquant un carbone
- ils ont tendance à se réarranger en céténimines qui ne réagissent qu'avec les nucléophiles et qui peuvent donc conduire à un rendement de marquage négligeable si le site de liaison de la molécule ne contient pas d'acides aminés nucléophiles.

Lors d'une irradiation lumineuse, le carbonyle de la benzophénone accède à un état excité triplet (Figure 17.B) qui peut permettre la formation d'une liaison carbone-carbone très stable et la production d'une fonction alcool. Les carbonyles excités ont moins tendance à réagir avec les molécules d'eau que les nitrènes ou les carbènes et les longueurs d'onde nécessaires pour atteindre l'état triplet (~360 nm) sont plus biocompatibles que celles nécessaires pour former un nitrène. Cependant, la liaison C-C entre la sonde et la protéine ne peut se former que si le carbonyle de la benzophénone est placé en parallèle d'une liaison C-H. D'autre part, l'excitation du carbonyle est totalement réversible. Une bonne efficacité de marquage implique donc des temps d'irradiation relativement longs qui peuvent être délétères pour les protéines.

Les trifluorométhylphényldiazirines, quant à elles, réunissent la plupart des critères d'un groupement photoactivable idéal : elles produisent des carbènes très réactifs (Figure 17.C) qui forment rapidement des liaisons stables C-C mais également C-N et C-O, sont activables à des longueurs d'onde biocompatibles (~360 nm) et possèdent une bonne stabilité chimique avant la photolyse. Comme les nitrènes, elles peuvent former un produit secondaire, à savoir un isomère diazo, mais il s'avère que cet isomère peut à son tour former un carbène pour peu que l'irradiation soit un peu prolongée¹³⁰. Les trifluorométhylphényldiazirines ont pour principaux inconvénients une tendance à réagir avec l'eau, un encombrement plus important que celui des azotures et surtout une synthèse plus longue, ce qui explique qu'elles soient nettement moins utilisées.

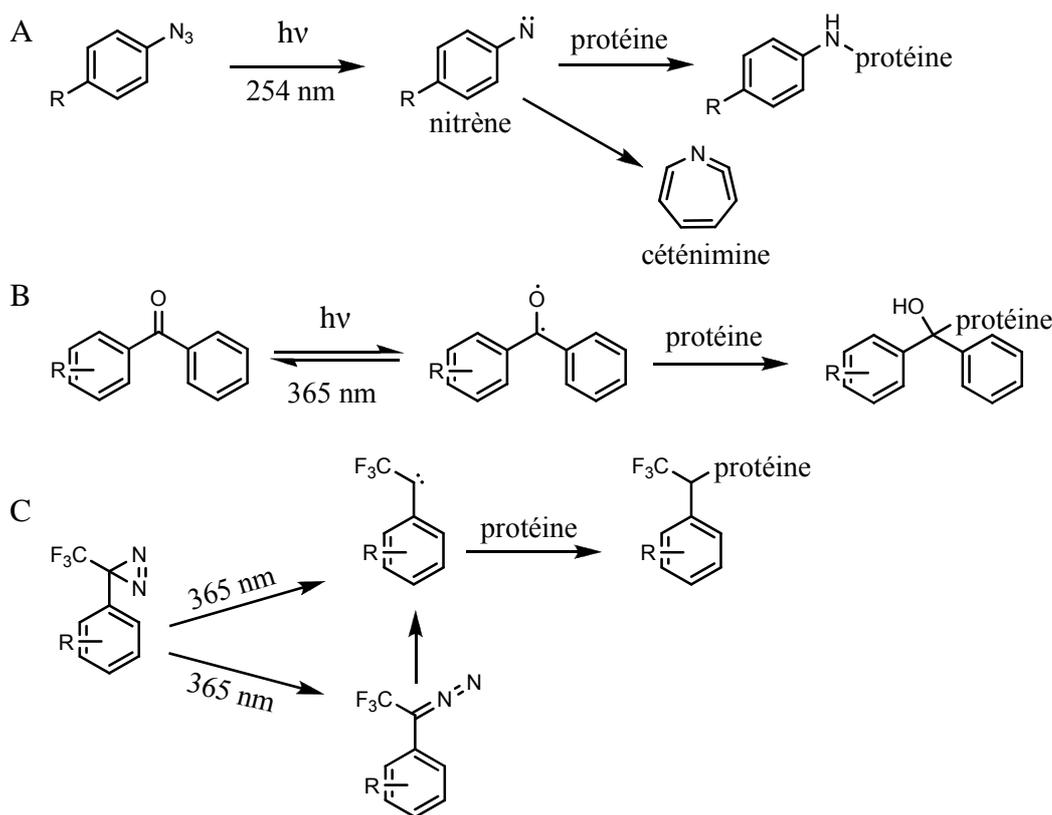


Figure 17. Principaux groupes photoréactifs employés en photomarquage d'affinité
 (d'après Leslie *et al.*⁹⁶, Hatanaka *et al.*¹²⁹ et Hashimoto *et al.*¹³⁰)
 A) aryl azotures, B) benzophénones, C) trifluorométhylphényldiazirines

Les sondes photoactivables, tout comme les sondes électrophiles, peuvent être utilisées en combinaison avec toutes les stratégies évoquées ci-dessus : utilisation d'étiquettes fluorescentes ou biotinylées, présence d'un isotope radioactif, utilisation de fonctions alcynes et azoture pour un marquage des protéines en deux temps ou présence de liens clivables. Certaines études ont même recours à plusieurs sondes différentes à la fois pour maximiser leurs chances de réussite. L'étude menée sur le Pladiénolide par l'équipe de Yoshihiko Kotake en est un exemple¹³¹.

Afin d'identifier la cible du Pladiénolide, les auteurs ont utilisé trois sondes différentes : une sonde tritiée, une sonde fluorescente et une sonde comportant à la fois une molécule de Biotine et une trifluorométhylphényldiazirine. La sonde tritiée a d'abord permis de localiser la cible dans le noyau des cellules et la sonde fluorescente de voir que la sonde était concentrée le long de structures granulaires riches en facteurs de transcription et d'épissage. Ces structures granulaires ont alors été séparées du reste de la cellule pour être incubées avec la sonde biotinylée photoactivable. La purification de la protéine photomarkuée à l'aide de billes fonctionnalisées par de la Streptavidine et une analyse LC-MS de l'éluat ont ensuite conduit à l'identification d'une sous-unité du « Splicing Factor 3b » (SF3b). Cette sous-unité s'est révélée être responsable de l'activité anti-tumorale du Pladiénolide.

1.2.3. Conclusion

La chémogénomique est une discipline complémentaire à la génétique dont le but est d'étudier les processus biologiques complexes au moyen de petites molécules. Elle peut être abordée de deux manières différentes selon que l'on cherche à découvrir les protéines impliquées dans un processus (génétique chimique directe) ou à attribuer une fonction à une protéine encore peu caractérisée (génétique chimique inverse). Dans le cadre de notre projet, nous nous sommes intéressés à la première de ces approches. Dix inhibiteurs du transport

d'iodures ayant été identifiés par notre laboratoire, nous nous sommes focalisés dans cette partie sur les différentes techniques qui existent afin d'identifier les protéines cibles d'une petite molécule organique, ce qui constitue classiquement la deuxième étape d'une stratégie de génétique chimique directe. Comme nous avons pu le voir ces techniques sont nombreuses et chacune d'entre elles a ses propres avantages et inconvénients. Le tout est finalement de choisir les techniques qui sont les mieux adaptées à la fois à la spécialité du laboratoire dans lequel le projet est mené et aux informations dont on dispose sur la molécule d'intérêt et/ou sur les protéines cibles potentielles.

Bibliographie

- ¹ Werner S.C., Ingbar S., *The Thyroid : a Fundamental and Clinical Text*, Eds Braverman L.E., Utiger R.D., Philadelphia : Lippincott-Raven, **1991**, 1-1362.
- ² Dunn J.T., Sources of dietary iodine in industrialized countries, in *Iodine Deficiency in Europe. A Continuing Concern*, Eds Delange F., Dunn J.T., Glinde D., Plenum Press, New York, **1993**, 17-21.
- ³ Leclere J., Orgiazzi J., Rousset B., Sclienger J.L., Werneau J.L., *La thyroïde 2^e édition*, Elsevier Press, Paris, **2001**, 11-22.
- ⁴ De la Vieja A., Dohán O., Levy O., Carrasco N., Molecular analysis of the sodium/iodide symporter : impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology, *Physiol. Rev.*, **2000**, *80*, 1083-1105.
- ⁵ Dai G., Levy O., Amzel L.M., Carrasco N., The mediator of thyroïdal iodide accumulation : the sodium/iodide symporter, in *Handbook of biological physics*, Elsevier Press, Amsterdam, **1996**, 15-22.
- ⁶ Alexander W.D., Wolff J., Thyroïdal iodide transport, *Endocrinology*, **1966**, *78*, 581-590.
- ⁷ Scott D.A., Wang R., Kreman T.M., Sheffield V.C., Karniski L.P., The pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein, *Nat. Genet.*, **1999**, *21*, 440-443.
- ⁸ Rodriguez A.M., Perron B., Lacroix L., Caillou B., Leblanc G., Schlumberger M., Bidart J.M., Pourcher T., Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2002**, *87*, 3500-3.
- ⁹ Miyachi S., Gopal E., Fei Y.J., Ganapathy V., Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na(+)-coupled transporter for short-chain fatty acids, *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 13293-96.
- ¹⁰ Ekholm R., Wollmann S.H., Site of iodination in the rat thyroid gland deduced from electron microscopic autoradiographs, *Endocrinology*, **1975**, *97*, 1432-44.
- ¹¹ Massart C., Corbineau E., Transporteurs d'iodures et fonction thyroïdienne, *Immuno-analyse & biologie spécialisée*, **2006**, *21*, 138-143.
- ¹² Verhaeghe E., Etude des mécanismes d'accumulation de l'iode chez l'algue brune *Laminaria digitata* et chez les mammifères, Université Paris XI, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage du CEA Saclay, **2007**, p. 187.
- ¹³ Dai G., Levy O., Carrasco N., Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter, *Nature*, **1996**, *379*, 458-460.
- ¹⁴ Paire A., Bernier-Valentin F., Selmi-Ruby S., Rousset B., Characterization of the rat thyroid iodide transporter using anti-peptide antibodies, *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 18245-18249.
- ¹⁵ Levy O., De la Vieja A., Ginter C.S., Riedel C., Dai G., Carrasco N., N-linked glycosylation of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS) : implications for its secondary structure model, *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 22657-22663.
- ¹⁶ De la Vieja A., Ginter C.S., Carrasco N., Topology of the sodium/iodide symporter, in *Proceedings of the AAPS Frontier Symposium : Membrane transporters and drug therapy*, Bethesda, **1999**, p. 49.
- ¹⁷ De la Vieja A., Ginter C.S., Carrasco N., Topology of the sodium iodide symporter, in *Program of the 12th international thyroid congress*, Kyoto, **2000**, p. 162.
- ¹⁸ Huc-Brandt S., Marcellin D., Graslin F., Averseng O., Bellanger L., Hivin P., Quemeneur E., Basquin C., Navarro V., Pourcher T., Darrouzet E., Characterisation of the purified human sodium/iodide symporter reveals that the protein is mainly present in a dimeric form and permits the detailed study of a native C-terminal fragment, *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, *1808*, 65-77.
- ¹⁹ Smanik P.A., Liu Q., Furminger T.L., Ryu K., Xing S., Mazzaferri E.L., Jhiang S.M., Cloning of the human sodium iodide symporter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1996**, *226*, 339-345.
- ²⁰ Jhiang S.M., Cho J.Y., Ryu K.Y., Deyoung B.R., Smanik P.A., McGaughy V.R., Fischer A.H., Mazzaferri E.L., An immunohistochemical study of Na⁺/I⁻ symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues, *Endocrinology*, **1998**, *139*, 4416-4419.
- ²¹ Bagchi N., Fawcett D.M., Role of sodium ion in active transport of iodide by cultured thyroid cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1973**, *318*, 235-251.
- ²² Weiss S.J., Philp N.J., Grollman E.F., Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid, *Endocrinology*, **1984**, *114*, 1090-1098.
- ²³ O'Neill B., Magnolato D., Semenza G., The electrogenic, Na⁺-dependent I⁻ transport system in plasma membrane vesicles from thyroid glands, *Biochim. Biophys. Acta*, **1987**, *896*, 263-274.
- ²⁴ Eskandari S., Loo D.D., Dai G., Levy O., Wright E.M., Carrasco N., Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry and specificity, *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 27230-27238.
- ²⁵ Jones P.A., Pendlington R.U., Earl L.K., Sharma R.K., Baratt M.D., *In vitro* investigations of the direct effects of complex anions on thyroïdal uptake : identification of novel inhibitors, *Toxicol. In Vitro*, **1996**, *10*, 149-160.
- ²⁶ Van Sande J., Massart C., Beauwens R., Schoutens A., Costagliola S., Dumont J.E., Wolff J., Anion selectivity by the sodium iodide symporter, *Endocrinology*, **2003**, *144*, 247-252.

- ²⁷ Dohán O., Portulano C., Basquin C., Reyna-Neyra A., Amzel L.M., Carrasco N., The Na⁺/I⁻ symporter (NIS) mediates electroneutral active transport of the environmental pollutant perchlorate, *PNAS*, **2007**, *104*, 20250-55.
- ²⁸ Dohán O., De la Vieja A., Paroder V., Riedel C., Artani M., Reed M., Ginter C.S., Carrasco N., The sodium/iodide symporter (NIS) : characterization, regulation and medical significance, *Endocrine Rev.*, **2003**, *24*, 48-77.
- ²⁹ Levy O., Ginter C.S., De la Vieja A., Levy D., Carrasco N., Identification of a structural requirement for thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS) function from analysis of a mutation that causes human congenital hypothyroidism, *FEBS Lett.*, **1998**, *429*, 36-40.
- ³⁰ De la Vieja A., Ginter C.S., Carrasco N., Several hydroxyl-containing amino acid residues in transmembrane segment IX are important for sodium/iodide symporter activity, *12th International Thyroid Congress*, Kyoto, **2000**, p. 162.
- ³¹ De la Vieja A., Reed M.D., Ginter C.S., Carrasco N., Amino acid residues in transmembrane segment IX of the Na⁺/I⁻ symporter play a role in its Na⁺ dependence and are critical for transport activity, *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 25290-25298.
- ³² Dohán O., Gavrielides M.V., Ginter C.S., Amzel L.M., Carrasco N., Na(+)/I(-) symporter activity requires a small and uncharged amino acid residue at position 395, *Mol. Endocrinol.*, **2002**, *16*, 1893-1902.
- ³³ De la Vieja A., Ginter C.S., Carrasco N., Molecular analysis of a congenital iodide transport defect : G543E impairs maturation and trafficking of the Na⁺/I⁻ symporter, *Mol. Endocrinol.*, **2005**, *19*, 2847-58.
- ³⁴ De la Vieja A., Ginter C.S., Carrasco N., The Q267E mutation in the sodium/iodide symporter (NIS) causes congenital iodide transport defect (ITD) by decreasing the NIS turnover number, *J. Cell. Sci.*, **2004**, *117*, 677-87.
- ³⁵ Reed M.D., De la Vieja A., Ginter C.S., Carrasco N., Molecular characterization of V59E NIS, a Na⁺/I⁻ symporter mutant that causes congenital I transport defect, *Endocrinology*, **2008**, *149*, 3077-3084.
- ³⁶ Li C.C., Ho T.Y., Kao C.H., Wu S.L., Lianq J.A., Hsiang C.Y., Conserved charged amino acid residues in the extracellular region of sodium/iodide symporter are critical for iodide transport activity, *J. Biomed. Sci.*, **2010**, *17*:89.
- ³⁷ Levy O., Dai G., Riedel C., Ginter C.S., Paul E.M., Lebowitz A.N., Carrasco N., Characterization of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter with an anti-COOH terminus antibody, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 5568-5573.
- ³⁸ Kogai T., Endo T., Saito T., Miyazaki A., Kawaguchi A., Onaya T., Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells, *Endocrinology*, **1997**, *138*, 2227-2232.
- ³⁹ Wolff F., Chaikoff I.L., Goldberg R.C., Meier J.R., The temporary nature of the inhibitory action of excess iodide on organic synthesis in the normal thyroid, *Endocrinology*, **1949**, *45*, 504-513.
- ⁴⁰ Dugrillon A., Iodolactones and iodoaldehydes : mediators of iodine in thyroid autoregulation, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, **1996**, *104*, Suppl 4, 41-45.
- ⁴¹ Eng P.H.K., Cardona G.R., Fang S.L., Previti M., Alex S., Carrasco N., Chin W.W., Braverman L.E., Escape from the Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein, *Endocrinology*, **1999**, *140*, 3404-3410.
- ⁴² Leoni S.G., Galante P.A., Ricarte-Filho J.C.M., Kimura E.T., Differential gene expression analysis of iodide-treated rat thyroid follicular cell line PCC13, *Genomics*, **2008**, *91*, 356-366.
- ⁴³ Suzuki K., Lavaroni S., Mori A., Ohta M., Saito J., Pietrarelli M., Singer D.S., Kimura S., Katoh R., Kawaoi A., Autoregulation of thyroid specific gene transcription by thyroglobulin, *PNAS*, **1998**, *95*, 8251-8256.
- ⁴⁴ Suzuki K., Kohn L.D., Differential regulation of apical and basal iodide transporters in the thyroid by thyroglobulin, *J. Endocrinol.*, **2006**, *189*, 247-255.
- ⁴⁵ Endo T., Kaneshige M., Nakazato M., Ohmori M., Harii N., Onaya T., Thyroid transcription factor-1 activates the promoter activity of rat thyroid Na⁺/I⁻ symporter gene, *Mol. Endocrinol.*, **1997**, *11*, 1747-1755.
- ⁴⁶ Ohmori M., Endo T., Harii N., Onaya T., A novel thyroid transcription factor is essential for thyrotropin-induced up-regulation of Na⁺/I⁻ symporter gene expression, *Mol. Endocrinol.*, **1998**, *12*, 727-736.
- ⁴⁷ Ohno M., Zannini M., Levy O., Carrasco N., di Lauro R., The paired-domain transcription factor Pax-8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription, *Mol. Cell. Biol.*, **1999**, *19*, 2051-2060.
- ⁴⁸ Riesco-Eizaguirre G., Santisteban P., A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications, *Eur. J. Endocrinol.*, **2006**, *155*, 495-512.
- ⁴⁹ Ryu K.Y., Tong Q., Jhiang S.M., Promoter characterization of the human Na⁺/I⁻ symporter, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1998**, *83*, 3247-3251.
- ⁵⁰ Venkataraman M.G., Yatin M., Ain K.B., Cloning of the human sodium-iodide symporter promoter and characterization in a differentiated human thyroid cell line, KAT-50, *Thyroid*, **1998**, *8*, 63-69.
- ⁵¹ Taki K., Kogai T., Kanamoto Y., Hershman J.M., Brent G.A., A thyroid-specific far-upstream enhancer in the human sodium/iodide symporter gene requires Pax-8 binding and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate

- response element like sequence binding proteins for full activity and is differentially regulated in normal and thyroid cancer cells, *Mol. Endocrinol.*, **2002**, *16*, 2266-2282.
- ⁵² Gonzalez G.A., Montminy M.R., Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133, *Cell*, **1989**, *59*, 675-680.
- ⁵³ Nguyen L.Q., Kopp P., Martinson F., Stanfield K., Roth S.I., Jameson J.L., A dominant negative CREB (cAMP response element-binding protein) isoform inhibits thyrocyte growth, thyroid-specific gene expression, differentiation, and function, *Mol. Endocrinol.*, **2000**, *14*, 1448-61.
- ⁵⁴ Pomerance M., Abdullah H.B., Kamerji S., Correze C., Blondeau J.P., Thyroid-stimulating hormone and cyclic AMP activate p38 mitogen-activated protein kinase cascade. Involvement of protein kinase A, rac-1, and reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 40539-46.
- ⁵⁵ Ferretti E., Tosi E., Po A., Scipioni A., Morisi R., Espinola M.S., Russo D., Durante C., Schlumberger M., Screpanti I., Filetti S., Gulino A., Notch signaling is involved in expression of thyrocyte differentiation markers and is down-regulated in thyroid tumors, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2008**, *93*, 4080-4087.
- ⁵⁶ Hou P., Bojdani E., Xing M., Induction of thyroid gene expression and radioiodine uptake in thyroid cancer cells by targeting major signaling pathways, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2010**, *95*, 820-828.
- ⁵⁷ Iacovelli L., Capobianco L., Salvatore L., Sallese M., D'Ancona G.M., De Blasi A., Thyrotropin activates mitogen-activated protein kinase pathway in FRTL-5 by a cAMP-dependent protein kinase A-independent mechanism, *Mol. Pharmacol.*, **2001**, *60*, 924-933.
- ⁵⁸ Vadysirisack D.D., Venkateswaran A., Zhang Z., Jhiang S.M., MEK signaling modulates sodium iodide symporter at multiple levels and in a paradoxical manner, *Endocr. Relat. Cancer*, **2007**, *14*, 421-432.
- ⁵⁹ Zaballos M.A., Garcia B., Santisteban P., Gbetagamma dimers released in response to thyrotropin activate phosphoinositide 3-kinase and regulate gene expression in thyroid cells, *Mol. Endocrinol.*, **2008**, *22*, 1183-1199.
- ⁶⁰ Garcia B., Santisteban P., PI3K is involved in the IGF-1 inhibition of TSH-induced sodium/iodide symporter gene expression, *Mol. Endocrinol.*, **2002**, *16*, 342-352.
- ⁶¹ Kogai T., Ohashi E., Jacobs M.S., Sajid-Crockett S., Fisher M.L., Kanamoto Y., Brent G.A., Retinoic acid stimulation of the sodium/iodide symporter in MCF-7 breast cancer cells is mediated by the insulin growth factor-I/phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2008**, *93*, 1884-1892.
- ⁶² Costamagna E., Garcia B., Santisteban P., The functional interaction between the paired domain transcription factor Pax8 and Smad3 is involved in transforming growth factor-beta repression of the sodium/iodide symporter gene, *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 3439-46.
- ⁶³ Bernier-Valentin F., Trouttet-Masson S., Rabilloud R., Selmi-Ruby S., Rousset B., Three dimensional organization of thyroid cells into follicle structures is a pivotal factor in the control of sodium/iodide symporter expression, *Endocrinology*, **2006**, *147*, 2035-2042.
- ⁶⁴ Fozzatti L., Vélez M.L., Lucero A.M., Nicola J.P., Mascanfroni I.D., Macció D.R., Pellizas C.G., Roth G.A., Masini-Repiso A.M., Endogenous thyrocyte-produced nitric oxide inhibits iodide uptake and thyroid-specific gene expression in FRTL-5 thyroid cells, *J. Endocrinol.*, **2007**, *192*, 627-637.
- ⁶⁵ Nicola J.P., Nazar M., Mascanfroni I.D., Pellizas C.G., Masini-Repiso A.M., NF- κ B p65 subunit mediates lipopolysaccharide-induced Na⁺/I⁻ symporter gene expression by involving functional interaction with the paired domain transcription factor Pax8, *Mol. Endocrinol.*, **2010**, *24*, 1846-1862.
- ⁶⁶ Kaminsky S.M., Levy O., Salvador C., Dai G., Carrasco N., Na⁺/I⁻ symporter activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non-I⁻-transporting cultured thyroid cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 3789-3793.
- ⁶⁷ Riedel C., Levy O., Carrasco N., Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 21458-21463.
- ⁶⁸ Vadysirisack D.D., Chen E.S.W., Zhang Z., Tsai M.D., Chang G.D., Jhiang S.M., Identification of *in vivo* phosphorylation sites and their functional significance in the sodium iodide symporter, *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 36820-36828.
- ⁶⁹ Spitzweg C., Joba W., Eisenmenger W., Heufelder A.E., Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary DNA from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1998**, *83*, 1746-1751.
- ⁷⁰ Park S.M., Chatterjee V.K.K., Genetics of congenital hypothyroidism, *J. Med. Genet.*, **2005**, *42*, 379-389.
- ⁷¹ Lecat-Guillet N., Identification d'inhibiteurs du symporteur sodium-iodure par criblage à haut-débit, Université Paris XI, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage du CEA Saclay, **2006**, p. 10-11.
- ⁷² Michels A.W., Eisenbarth G.S., Immunologic endocrine disorders, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2010**, *125*, S226-37.
- ⁷³ Endo T., Kogai T., Nakazato M., Saito T., Kaneshige M., Onaya T., Autoantibody against Na⁺/I⁻ symporter in the sera of patients with autoimmune thyroid disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1996**, *224*, 92-95.
- ⁷⁴ Ajjan R.A., Kemp E.H., Waterman E.A., Watson P.F., Endo T., Onaya T., Weetman A.P., A Detection of binding and blocking auto-antibodies to the human sodium-iodide symporter in patients with autoimmune thyroid disease, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2000**, *85*, 2020-2027.

- ⁷⁵ Tonacchera M., Agretti P., Ceccarini G., Lenza R., Refetoff S., Santini F., Pinchera A., Chiovato L., Vitti P., Autoantibodies from patients with autoimmune thyroid disease do not interfere with the activity of the human iodide symporter gene stably transfected in CHO cells, *Eur. J. Endocrinol.*, **2001**, *144*, 611-618.
- ⁷⁶ Ron E., Thyroid cancer incidence among people living in areas contaminated by radiation from the Chernobyl accident, *Health Phys.*, **2007**, *93*, 502-511.
- ⁷⁷ Russo D., Manole D., Arturi F., Suarez H.G., Schlumberger M., Filetti S., Derwahl M., Absence of sodium/iodide symporter gene mutations in differentiated human thyroid carcinomas, *Thyroid*, **2001**, *11*, 37-39.
- ⁷⁸ Riesco-Eizaguirre G., Gutiérrez-Martínez P., García-Cabezas M.A., Nistal M., Santisteban P., The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane, *Endocr. Relat. Cancer*, **2006**, *13*, 257-269.
- ⁷⁹ Pourcher T., Lindenthal S., Basquin C., Ferhat O., Marsault R., Carrier P., Koulibaly M., Bussièrre F., Darcourt J., Le transporteur d'iode (NIS) : nouvelles perspectives en oncologie nucléaire, *Médecine Nucléaire*, **2005**, *29*, 237-243.
- ⁸⁰ Spitzweg C., Dietz A.B., O'Connor M.K., Bergert E.R., Tindall D.J., Young C.Y., Morris J.C., *In vivo* sodium iodide symporter gene therapy of prostate cancer, *Gene Ther.*, **2001**, *8*, 1524-1531.
- ⁸¹ Faivre J., Clerc J., Gerolami R., Herve J., Longuet M., Liu B., Long-term radioiodine retention of liver cancer after sodium iodide symporter gene transfer in wistar rats, *Cancer Res.*, **2004**, *64*, 8045-51.
- ⁸² Dwyer R.M., Schatz S.M., Bergert E.R., Myers R.M., Harvey M.E., Classic K.L., Blanco M.C., Frisk C.S., Marler R.J., Davis B.J., O'Connor M.K., Russell S.J., Morris J.C., A preclinical large animal model of adenovirus-mediated expression of the sodium-iodide symporter for radioiodide imaging and therapy of locally recurrent prostate cancer, *Mol. Ther.*, **2005**, *12*, 835-841.
- ⁸³ Hibert M., Les collections de molécules pour le criblage : exemple de la chimiothèque nationale, in *Chémogénomique, des petites molécules pour explorer le vivant*, Eds Lafanéchère L., Maréchal E., Roy S., EDP Sciences, Collection Grenoble Sciences, **2007**, 23-25.
- ⁸⁴ Lafanéchère L., Le criblage phénotypique sur cellules et les stratégies de génétique chimique directe, in *Chémogénomique, des petites molécules pour explorer le vivant*, Eds Lafanéchère L., Maréchal E., Roy S., EDP Sciences, Collection Grenoble Sciences, **2007**, 91-107.
- ⁸⁵ Puri W.A., Bogyo M., Using small molecules to dissect mechanisms of microbial pathogenesis, *ACS Chem. Biol.*, **2009**, *4*, 603-616.
- ⁸⁶ Vane J.R., Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs, *Nat. New Biol.*, **1971**, *231*, 232-235.
- ⁸⁷ Knight Z.A., Gonzalez B., Feldman M.E., Zunder E.R., Goldenberg D.D., Williams O., A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110 α in insulin signaling, *Cell*, **2006**, *125*, 733-747.
- ⁸⁸ Lecat-Guillet N., Merer G., Lopez R., Pourcher T., Rousseau B., Ambroise Y., Small molecule inhibitor of the sodium iodide symporter function, *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 889-95.
- ⁸⁹ Mayer T.U., Kapoor T.M., Haggarty S.J., King R.W., Schreiber S.L., Mitchison S.J., Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen, *Science*, **1999**, *286*, 971-974.
- ⁹⁰ Sawin K.E., LeGuellec K., Philippe M., Mitchison T.J., Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor, *Nature*, **1992**, *359*, 540-543.
- ⁹¹ Li X., Zolli-Juran M., Cechetto J.D., Daigle D.M., Wright G.D., Brown E.D., Multicopy suppressors for novel antibacterial compounds reveal targets and drug efflux susceptibility, *Chem. Biol.*, **2004**, *11*, 1423-1430.
- ⁹² Butcher R.A., Schreiber S.L., Using genome-wide transcriptional profiling to elucidate small-molecule mechanism, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2005**, *9*, 25-30.
- ⁹³ Lamb J., Crawford E.D., Peck D., Modell J.W., Blat I.C., Wrobel M.J., Lerner J., Brunet J.P., Subramanian A., Ross K.N., Reich M., Hieronymus H., Wei G., Armstrong S.A., Haggarty S.J., Clemons P.A., Wei R., Carr S.A., Lander E.S., Golub T.R., The connectivity map : using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease, *Science*, **2006**, *313*, 1929-1935.
- ⁹⁴ King R.W., Chemistry or biology : which comes first after the genome is sequenced ?, *Chem. Biol.*, **1999**, *6*, R327-R333.
- ⁹⁵ Kung L.A., Snyder M., Proteom chips for whole organisms assays, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2006**, *7*, 617-622.
- ⁹⁶ Leslie B.J., Hergenrother P.J., Identification of the cellular targets of bioactive small organic molecules using affinity reagents, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 1347-1360.
- ⁹⁷ Harding M.W., Galat A., Uehling D.E., Schreiber S.L., A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase, *Nature*, **1989**, *341*, 758-760.
- ⁹⁸ Bach S., Knockaert M., Reinhardt J., Lozach O., Schmitt S., Baratte B., Koken M., Coburn S.P., Tang L., Jiang T., Liang D.C., Galons H., Dierick J.F., Pinna L.A., Meggio F., Totzke F., Schächtele C., Lerman A.S., Carnero A., Wan Y., Gray N., Meijer L., Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase, *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 31208-19.

- ⁹⁹ Sato S.I., Kwon Y., Kamisuki S., Srivastava N., Mao Q., Kawasoe Y., Uesugi M., Polyproline-rod approach to isolating protein targets of bioactive small molecules : isolation of a new target of indomethacin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 873-880.
- ¹⁰⁰ Kanoh N., Honda K., Simizu S., Muroi M., Osada H., Photo-cross-linked small-molecule affinity matrix for facilitating forward and reverse chemical genetics, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 3559-3562.
- ¹⁰¹ Wang G., Shang L., Burgett A.W., Harran P.G., Wang X., Diazonamide toxins reveal an unexpected function for ornithine delta-amino transferase in mitotic cell division, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 2068-2073.
- ¹⁰² Zhang Q., Major M.B., Takanashi S., Camp N.D., Nishiya N., Peters E.C., Ginsberg M.H., Jian X., Randazzo P.A., Schultz P.G., Moon R.T., Ding S., Small-molecule synergist of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, *PNAS*, **2007**, *104*, 7444-7448.
- ¹⁰³ Taunton J., Hassig C.A., Schreiber S.L., A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p, *Science*, **1996**, *272*, 408-411.
- ¹⁰⁴ Ong S.E., Schenone M., Margolin A.A., Li X., Do K., Doud M.K., Mani D.R., Kuai L., Wang X., Wood J.L., Tolliday N.J., Koehler A.N., Marcaurelle L.A., Golub T.R., Gould R.J., Schreiber S.L., Carr S.A., Identifying the proteins to which small molecule probes and drugs bind in cells, *PNAS*, **2009**, *106*, 4617-4622.
- ¹⁰⁵ Sato S.I., Murata A., Shirakawa T., Uesugi M., Biochemical target isolation for novices : affinity-based strategies, *Chem. Biol.*, **2010**, *17*, 616-623.
- ¹⁰⁶ Falsey R.R., Marron M.T., Gunaherath G.M.K.B., Shirahatti N., Mahadevan D., Gunatilaka A.A.L., Whitesell L., Actin microfilament aggregation induced by withaferin A is mediated by annexin II, *Nat. Chem. Biol.*, **2006**, *2*, 33-38.
- ¹⁰⁷ Statsuk A.V., Bai R., Baryza J.L., Verma V.A., Hamel E., Wender P.A., Kozmin S.A., Actin is the primary cellular receptor of bistramide A, *Nat. Chem. Biol.*, **2005**, *1*, 383-388.
- ¹⁰⁸ Bargagna-Mohan P., Hamza A., Kim Y.E., Khuan Ho Y., Mor-Vaknin N., Wendschlag N., Liu J., Evans R.M., Markovitz D.M., Zhan C.G., Kim K.B., Mohan R., The tumor inhibitor and antiangiogenic agent Withaferin A targets the intermediate filament protein vimentin, *Chem. Biol.*, **2007**, *14*, 623-634.
- ¹⁰⁹ Budin G., Moune-Dimala M., Leriche G., Saliou J.M., Papillon J., Sanglier-Cianféron S., Van Dorsselaer A., Lamour V., Brino L., Wagner A., Nondenaturing chemical proteomics for protein complex isolation and identification, *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 2359-2361.
- ¹¹⁰ Gartner C.A., Elias J.E., Bakalarski C.E., Gygi S.P., Catch-and-release reagents for broadscale quantitative proteomics analyses, *J. Prot. Res.*, **2007**, *6*, 1482-1491.
- ¹¹¹ Fonović M., Verhelst S.H.L., Sorum M.T., Bogoy M., Proteomics evaluation of chemically cleavable activity-based probes, *Mol. Cell. Prot.*, **2007**, *6*, 1761-1770.
- ¹¹² Park K.D., Liu R., Kohn H., Useful tools for biomolecule isolation, detection, and identification : acylhydrazone-based cleavable linkers, *Chem. Biol.*, **2009**, *16*, 763-772.
- ¹¹³ Geurink P.P., Florea B.I., Li N., Witte M.D., Verasdonck J., Kuo C.L., van der Marel G.A., Overkleeft H.S., A cleavable linker based on the levulinoyl ester for activity-based protein profiling, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 6802-6805.
- ¹¹⁴ Weerapana E., Speers A.E., Cravatt B.F., Tandem orthogonal proteolysis-activity-based protein profiling (TOP-ABPP) – a general method for mapping sites of probe modification in proteomes, *Nat. Protoc.*, **2007**, *2*, 1414-1425.
- ¹¹⁵ Kim H.Y.H., Tallman K.A., Liebler D.C., Porter N.A., An azido-biotin reagent for use in the isolation of protein adducts of lipid-derived electrophiles by Streptavidine catch and photorelease, *Mol. Cell. Prot.*, **2009**, *8*, 2080-2089.
- ¹¹⁶ Sadaghiani A.M., Verhelst S.H.L., Bogoy M., Tagging and detection strategies for activity based proteomics, *Curr. Op. Chem. Biol.*, **2007**, *11*, 20-28.
- ¹¹⁷ Leuenroth S.J., Okuhara D., Shotwell J.D., Markowitz G.S., Yu Z., Somlo S., Crews C.M., Triptolide is a traditional Chinese medicine-derived inhibitor of polycystic kidney disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 4389-4394.
- ¹¹⁸ Adam G.C., Vanderwal C.D., Sorensen E.J., Cravatt B.F., (-)-FR182877 is a potent and selective inhibitor of carboxylesterase-1, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 5480-5484.
- ¹¹⁹ Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B., A stepwise Huisgen cycloaddition process : copper(I)-catalyzed regioselective 'ligation' of azides and terminal alkynes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2596-2599.
- ¹²⁰ Saxon E., Bertozzi C.R., Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction, *Science*, **2000**, *287*, 2007-2010.
- ¹²¹ Vila A., Tallman K.A., Jacobs A.T., Liebler D.C., Porter N.A., Marnett L.J., Identification of protein targets of 4-hydroxynonenal using click chemistry for ex vivo biotinylation of azido and alkynyl derivatives, *Chem. Res. Toxicol.*, **2008**, *21*, 432-444.
- ¹²² Reddie K.G., Seo Y.H., Muse III W.B., Leonard S.E., Carroll K.S., A chemical approach for detecting sulfenic acid-modified proteins in living cells, *Mol. Biosyst.*, **2008**, *4*, 521-531.

- ¹²³ Greenbaum D., Baruch A., Hayrapetian L., Darula Z., Burlingame A., Medzihradszky K.F., Bogyo M., Chemical approaches for functionally probing the proteome, *Mol. Cell. Prot.*, **2002**, *1*, 60-68.
- ¹²⁴ Kwok B.H., Koh B., Ndubuisi M.I., Elofsson M., Crews C.M., The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits IkappaB kinase, *Chem. Biol.*, **2001**, *8*, 759-766.
- ¹²⁵ Kidd D., Liu Y., Cravatt B.F., Profiling serine hydrolase activities in complex proteomes, *Biochemistry*, **2001**, *40*, 4005-15.
- ¹²⁶ Cravatt B.F., Wright A.T., Kozarich J.W., Activity-based protein profiling : from enzyme chemistry to proteomic chemistry, *Annu. Rev. Biochem.*, **2008**, *77*, 383-414.
- ¹²⁷ Ishii T., Ishikawa M., Miyoshi N., Yasunaga M., Akagawa M., Uchida K., Nakamura Y., Catechol type polyphenol is a potential modifier of protein sulfhydryls : development and application of a new probe for understanding the dietary polyphenol actions, *Chem. Res. Toxicol.*, **2009**, *10*, 1689-98.
- ¹²⁸ Dormán G., Prestwich G.D., Using photolabile ligands in drug discovery and development, *Trends Biotechnol.*, **2000**, *18*, 64-77.
- ¹²⁹ Hatanaka Y., Sadakane Y., Photoaffinity labelling in drug discovery and developments : chemical gateway for entering proteomic frontier, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2002**, *2*, 271-288.
- ¹³⁰ Hashimoto M., Hatanaka Y., Recent progress in diazirine-based photoaffinity labelling, *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, *2008*, 2513-2523.
- ¹³¹ Kotake Y., Sagane K., Owa T., Mimori-Kiyosue Y., Shimizu H., Uesugi M., Ishihama Y., Iwata M., Mizui Y., Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide, *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, *9*, 570-574.

Chapitre 2 : Objectif, intérêts et stratégie envisagée

2.1. Objectif et intérêts

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre 1, le transport d'iode est un processus biologique catalysé par le symporteur sodium/iode, une protéine dont les mécanismes de régulation post-traductionnelle restent largement méconnus. Comprendre l'ensemble des mécanismes qui modulent la capacité d'une cellule à transporter de l'iode permettrait pourtant d'améliorer le traitement d'un grand nombre de patients, qu'ils soient atteints de maladies bénignes de la thyroïde ou de cancers, et de compléter les moyens existant pour prévenir l'accumulation d'iode radioactif en cas d'accidents nucléaires. Dans ce but, notre laboratoire a mis en place une stratégie de génétique chimique directe dont la première étape a été d'identifier des petites molécules capables d'inhiber l'accumulation d'iodures.

Grâce au criblage de la chimiothèque commerciale Diverset, Chembridge réalisé par le Dr. Nathalie Lecat-Guillet et après un certain nombre de tests complémentaires, 10 inhibiteurs du transport d'iode ont pu être identifiés (Tableau 1)^{1,2}. L'objectif de ma thèse est d'identifier les cibles protéiques de ces molécules. Des études d'électrophysiologie ont montré que 7 de ces inhibiteurs avaient une action rapide (< 10 s) sur le transport alors que les 3 composés restant avaient un effet retardé (5 à 30 min)^{2,3}. Certains de ces composés pourraient ainsi agir sur le NIS lui-même ou empêcher son interaction avec de proches partenaires tandis que d'autres agiraient sur des processus plus en amont tels que la maturation, l'adressage à la membrane ou l'oligomérisation du symporteur. Identifier les protéines cibles de ces inhibiteurs nous permettrait donc d'obtenir soit des outils pharmacologiques pour étudier le fonctionnement du NIS, soit des informations sur les protéines impliquées dans sa régulation post-traductionnelle.

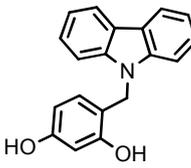
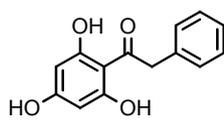
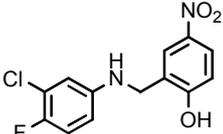
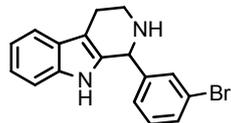
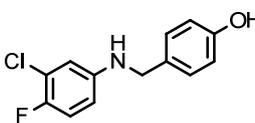
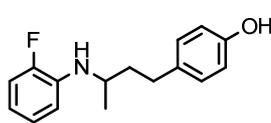
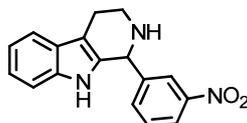
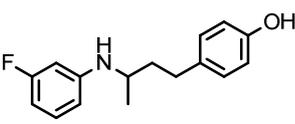
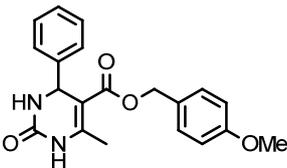
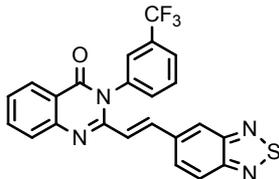
Inhibition immédiate			Inhibition retardée
 ITB₃ 0,3 μM	 ITB₄ 1 μM	 ITB₅ 0,04 μM	 ITB₁ 0,4 μM
 ITB₆ 1,3 μM	 ITB₇ 0,6 μM	 ITB₂ 0,3 μM	
 ITB₈ 0,3 μM	 ITB₉ 0,4 μM	 ITB₁₀ 2 μM	

Tableau 1. Structure des 10 inhibiteurs du transport d'iodures^{2,3}

Les IC₅₀ obtenues sur cellules FRTL-5 par le Dr. Lecat-Guillet sont indiquées pour chaque molécule.

2.2. Stratégie envisagée

Pour augmenter nos chances de succès dans ce projet, nous avons décidé de sélectionner une molécule de chacune des deux catégories citées ci-dessus. **ITB₅** et **ITB₂** (Figure 18) ont été choisies car elles sont les molécules les plus efficaces de leur catégorie et parmi les plus simples à synthétiser (1 étape dans chaque cas). Ces deux molécules agissant différemment, elles devaient nous permettre par la même occasion d'identifier deux cibles distinctes.

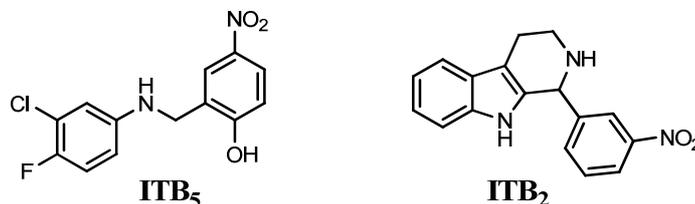


Figure 18. Inhibiteurs sélectionnés pour la recherche de leur(s) cible(s)

Notre laboratoire étant spécialisé en chimie organique, c'est à des techniques d'identification biochimiques que nous avons eu recours. Puisque nous n'avions aucune idée de l'affinité de ces molécules pour leur cible, que l'on ne connaissait pas leur mode de liaison et que la capture de protéines peu abondantes et/ou membranaires n'était pas à exclure, l'introduction d'un groupement photoactivable nous a paru nécessaire. Bien que sa synthèse soit un peu longue, c'est sur une trifluorométhylphényldiazirine que notre choix s'est porté. Etant donné ses bonnes propriétés de photoactivation (longueur d'onde ~ 360 nm, temps d'irradiation courts, formation d'adduits stables), nous avons estimé que cela valait la peine de prendre le temps de la synthétiser.

Comme nous l'avons précisé ci-dessus, il était tout à fait possible que les molécules sélectionnées, et en particulier **ITB₅**, interagissent avec des protéines membranaires. Ces protéines sont connues pour avoir besoin d'un environnement membranaire pour conserver leur conformation originale. Pour ne pas prendre le risque que nos molécules ne puissent plus reconnaître leur cible une fois les cellules lysées, nous avons décidé de concevoir des sondes permettant de travailler sur cellules entières. La possibilité de fixer les molécules **ITB₅** et **ITB₂** sur un support solide afin de réaliser des chromatographies d'affinité a donc été rapidement écartée. Comme nous souhaitions éviter l'utilisation de sondes radioactives, pour des raisons tant environnementales que sécuritaires, et vu que nous désirions utiliser une seule et même sonde pour visualiser les protéines marquées et extraire ces protéines depuis un milieu biologique complexe, la synthèse de sondes biotinylées nous a semblé être la meilleure solution.

En se basant sur ces choix, nous avons défini la stratégie d'identification de protéines cibles détaillée ci-dessous (Figure 19) :

➤ 1^{ère} étape : synthèse de sondes photoactivables et biotinylées

La relation structure-activité des composés **ITB₅** et **ITB₂** sera étudiée pour déterminer quels groupements peuvent être modifiés sans que l'activité de ces molécules en soit affectée. Le couplage des inhibiteurs à une trifluorométhylphényldiazirine et à une molécule de Biotine sera ensuite réalisé sur la base de cette étude SAR.

➤ 2^e étape : photomarquage des protéines cibles

Une fois l'activité biologique des sondes vérifiée, des cellules de thyroïde de rat Fisher (FRTL-5) seront incubées avec ces sondes puis irradiées à 365 nm afin de former une liaison covalente entre les sondes et leurs cibles protéiques. L'essentiel du travail sera ici d'optimiser les conditions de photomarquage de sorte à obtenir un photomarquage spécifique.

➤ 3^e étape : isolement des protéines marquées

Le marquage effectué, les cellules seront lysées et les protéines marquées seront extraites des lysats au moyen de billes fonctionnalisées par de la Streptavidine.

➤ 4^e étape : identification des protéines marquées par spectrométrie de masse

Les protéines isolées dans l'étape 3 seront séparées sur gel SDS-PAGE. Les bandes contenant la ou les protéine(s) marquée(s) spécifiquement (identifiées au moyen d'expériences contrôles) seront excisées et les protéines digérées à la trypsine. Les peptides ainsi obtenus seront analysés par spectrométrie de masse et les spectres comparés à des données de digestion trypsique théorique, la comparaison devant permettre d'identifier les protéines présentes dans les bandes sélectionnées.

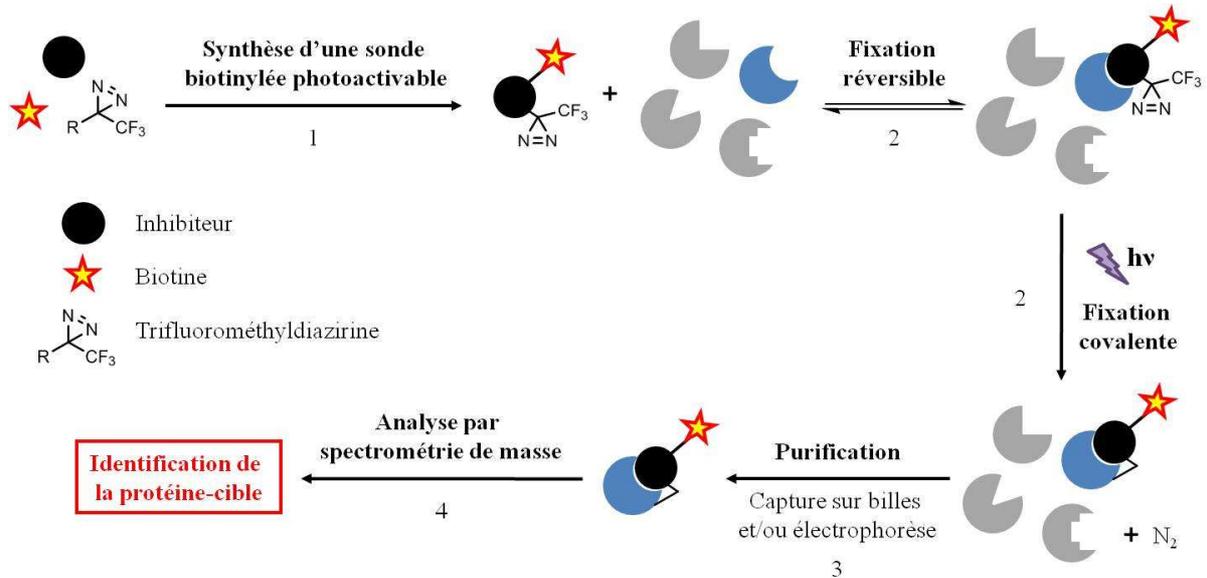


Figure 19. Stratégie d'identification de protéine cible par photomarquage d'affinité (d'après Verhaeghe E.⁴)

Bibliographie

- ¹ Lecat-Guillet N., Identification d'inhibiteurs du symporteur sodium-iode par criblage à haut-débit, Université Paris XI, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, CEA Saclay, **2006**, p. 76.
- ² Lecat-Guillet N., Merer G., Lopez R., Pourcher T., Rousseau B., Ambroise Y., Small-molecule inhibitors of sodium iodide symporter function, *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 889-895.
- ³ Lindenthal S., Lecat-Guillet N., Ondo-Mendez A., Ambroise Y., Rousseau B., Pourcher T., Characterization of small-molecule inhibitors of the sodium iodide symporter, *J. Endocrinol.*, **2009**, *200*, 357-65.
- ⁴ Verhaeghe E., Etude des mécanismes d'accumulation de l'iode chez l'algue brune *Laminaria digitata* et chez les mammifères, Université Paris XI, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage du CEA Saclay, **2007**, p. 182.

Chapitre 3 : A la recherche de la protéine cible de l'inhibiteur ITB₅

3.1. Etude de la relation structure-activité de la molécule

La première étape du projet a été de concevoir une sonde capable d'isoler la protéine cible d'ITB₅. Pour les raisons exposées dans le chapitre 2, cette sonde devait comporter, outre l'inhibiteur ITB₅, une trifluorométhylphényldiazirine et une molécule de Biotine. Elle devait aussi conserver une bonne activité inhibitrice (IC₅₀ de l'ordre du micromolaire minimum). Pour ce faire, nous avons d'abord étudié la relation structure-activité d'ITB₅ et déterminé quels groupements pouvaient être modifiés sans que l'activité de la molécule ne soit affectée. Le but étant de pouvoir ensuite utiliser ces groupements fonctionnels pour introduire le groupement photoactivable et la Biotine. L'étude a également été menée pour déterminer si des variations structurales simples pouvaient conduire à des molécules plus actives qu'ITB₅.

Cette étude structure-activité impliquait de synthétiser un grand nombre d'analogues structuraux. L'activité inhibitrice de ces analogues sur le transport d'iodures devait ensuite être testée sur des cellules FRTL-5¹ et être comparée à l'activité du composé ITB₅. Souhaitant éviter l'utilisation d'iodure radioactif, habituellement utilisé pour tester ce type d'activité, nous avons commencé notre étude par la mise au point d'une méthode de mesure du transport d'iodures à la fois non radioactive et adaptée à la mesure d'IC₅₀.

3.1.a) Mise au point d'un test biologique non radioactif

i. Sélection d'une méthode de dosage de l'iodure adaptable à la mesure d'IC₅₀

La capture d'iodure radioactif par les cellules thyroïdiennes, et en particulier celle d'¹²⁵I, est la méthode classiquement utilisée pour étudier le transport d'iodure. C'est elle qui a permis la sélection des 10 inhibiteurs cités précédemment, après que le Dr. Nathalie Lecat-Guillet l'ait optimisée au cours de sa thèse et adaptée au criblage de milliers de composés². Pour des raisons de coût et de sécurité et pour rendre les manipulations plus aisées, il nous a semblé important de modifier la méthode de criblage du Dr. Lecat-Guillet de sorte que l'activité de nos analogues puisse être déterminée sans recourir à de l'iodure radioactif.

Une autre méthode souvent utilisée pour étudier les phénomènes de transport ionique à travers la membrane plasmique est la technique de « patch-clamp »³. Bien que très utile pour obtenir des données biochimiques précises sur les flux transmembranaires, cette technique était à la fois trop complexe et trop coûteuse pour que nous puissions l'utiliser lors de tests à haut débit. Une autre méthode, basée sur l'utilisation de protéines fluorescentes sensibles aux halogènes, a été plus récemment décrite⁴. Elle présente un certain nombre d'avantages sur le test de capture d'¹²⁵I, dont celui de pouvoir visualiser en temps réel les flux d'iodures à travers les membranes de cellules vivantes. Elle nécessite cependant de mettre en place des calibrations très précises, coûteuses en temps, et de générer des lignées cellulaires exprimant une protéine fluorescente exogène, ce qui peut altérer les fonctions cellulaires.

Nous nous sommes alors tournés vers une méthode simple, peu coûteuse, souvent utilisée pour doser les iodures dans les urines et permettant de mesurer de très faibles concentrations en iodure (seuil de détection : 10-20 µg/µL)⁵. Cette méthode est basée sur l'observation, faite pour la première fois par Sandell et Kolthoff, que des microquantités d'iodure peuvent être détectées grâce à leur effet catalytique sur la réaction de réduction du cérium (IV) par de l'arsenic (III) (Figure 20)⁶.

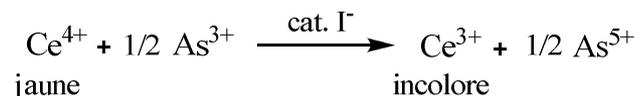


Figure 20. Réaction de réduction du cérium (IV) par l'arsenic (III) catalysée par l'iodure

Le cérium (IV) absorbant à 420 nm alors que le cérium (III) est incolore, la réaction peut être suivie par spectrophotométrie. De plus, la vitesse de réaction est proportionnelle à la quantité d'iodure présente dans l'échantillon (Figure 21.A). Ainsi, la quantité d'iodure captée par des cellules FRTL-5 en présence d'un composé peut être déterminée par simple lecture de l'absorbance à 420 nm et en se référant à une droite d'étalonnage (Figure 21.B). C'est par conséquent la méthode que nous avons choisie pour déterminer les IC₅₀ de nos inhibiteurs.

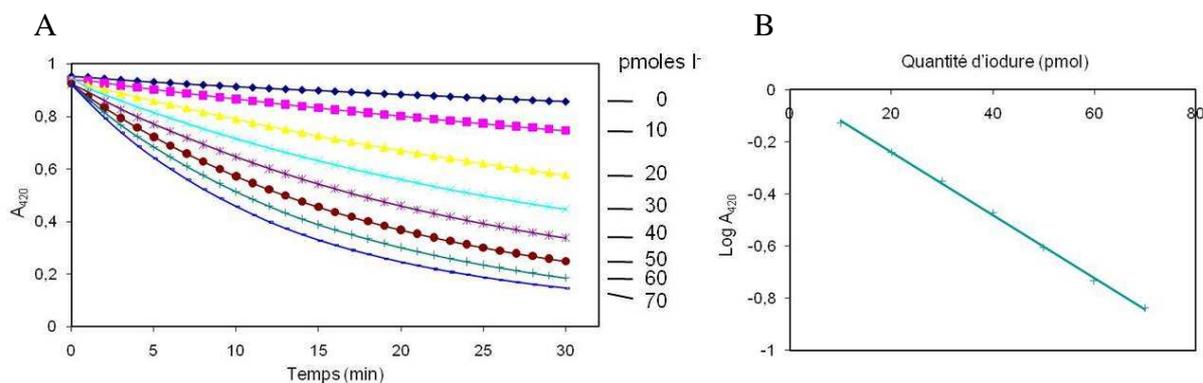


Figure 21. Tracé de droites d'étalonnage lors d'un dosage As/Ce.

- A) Diminution de l'absorbance à 420 nm (A₄₂₀) sur 30 min en présence de différentes quantités d'I⁻
 B) Droite de régression $\log A_{420} = f(\text{quantité d'I}^-)$ tracée à un temps t donné

ii. Optimisation du protocole de dosage

Objectifs

La procédure classique pour doser l'iodure dans un échantillon biologique grâce à la réaction dite de Sandell et Kolthoff consiste à ajouter successivement une solution de Ce (IV) et une solution d'As (III), à attendre entre 10 et 60 min avant de mesurer l'absorbance de la solution à 420 nm et à comparer la valeur obtenue avec des droites étalons. Comme nous l'avons évoqué précédemment, cette procédure a été essentiellement développée pour doser l'iodure dans des échantillons d'urine. Le protocole devait donc être légèrement modifié pour être adapté au dosage d'ions iodures captés par des cellules thyroïdiennes. Différentes expériences ont ainsi été menées par l'une de nos stagiaires en Master 2, Lucie Pillette, afin d'optimiser la relation linéaire entre le logarithme de l'absorbance à 420 nm et des quantités d'iodures comprises entre 0 et 70 pmol. Ces expériences ont toutes été réalisées en absence de cellules. Le but était d'obtenir des droites avec :

- le meilleur coefficient de régression possible
- une pente aussi importante que possible pour réduire l'erreur sur la détermination des quantités d'iodure
- une ordonnée à l'origine égale à 0

Les résultats devaient par ailleurs être parfaitement reproductibles. De nombreuses conditions ont été testées pour atteindre ces objectifs mais je ne présenterai ici que les expériences les plus significatives.

Température, temps de réaction, concentrations en cérium et en arsenic

Parmi les paramètres susceptibles d'influer sur la courbe d'étalonnage, il y a la température, le temps de réaction et la concentration des solutions d'arsenic et de cérium. Tous les dosages ont été réalisés à température ambiante afin de simplifier le protocole. Pour les deux autres paramètres, diverses conditions ont été testées afin de sélectionner celles qui donneraient les meilleures droites de régression.

Le temps de réaction a été le premier paramètre testé. A cette fin, 100 μL de solutions étalons d'iodure de concentration comprise entre 0 et 700 nM ont été placés en monoplicat dans trois microplaques 96 puits. 100 μL d'une solution de Ce (IV) à 21 mM et 100 μL d'une solution d'As (III) à 48 mM ont été ajoutés à ces solutions. L'absorbance à 420 nm a ensuite été mesurée à $t = 10$ min pour la première microplaque, à $t = 20$ min pour la deuxième et à $t = 30$ min pour la troisième. La droite de régression $\log A_{420} = f(\text{quantité d'I})$ a été tracée pour chacune de ces conditions (Figure 22.A). D'après les droites de régression obtenues, plus le temps de réaction augmente, plus la pente de la droite augmente. Nous avons donc décidé de réaliser nos mesures d'absorbance après un temps de réaction de 30 min.

Les expériences concernant les concentrations en cérium et en arsenic ont été réalisées à partir de solutions mères à 42 et 96 mM, respectivement. Ces solutions ont été diluées par 2, 3 ou 4 afin d'obtenir des concentrations de 21, 14 et 10,5 mM pour le cérium et des concentrations de 48, 32 et 24 mM pour l'arsenic. Pour chacune de ces dilutions, 100 μL de solutions étalons de NaI ont été incubés 30 min avec 100 μL de Ce (IV) et 100 μL d'As (III). La Figure 22.B montre les 3 droites qui ont été obtenues après mesure de l'absorbance à 420 nm. Ces 3 droites sont quasiment identiques. Les concentrations en cérium et en arsenic n'influencent donc pas grandement la cinétique de la réaction. Compte-tenu de ce résultat, nous avons choisi de travailler avec les concentrations les plus faibles, à savoir 10,5 mM pour le cérium et 24 mM pour l'arsenic.

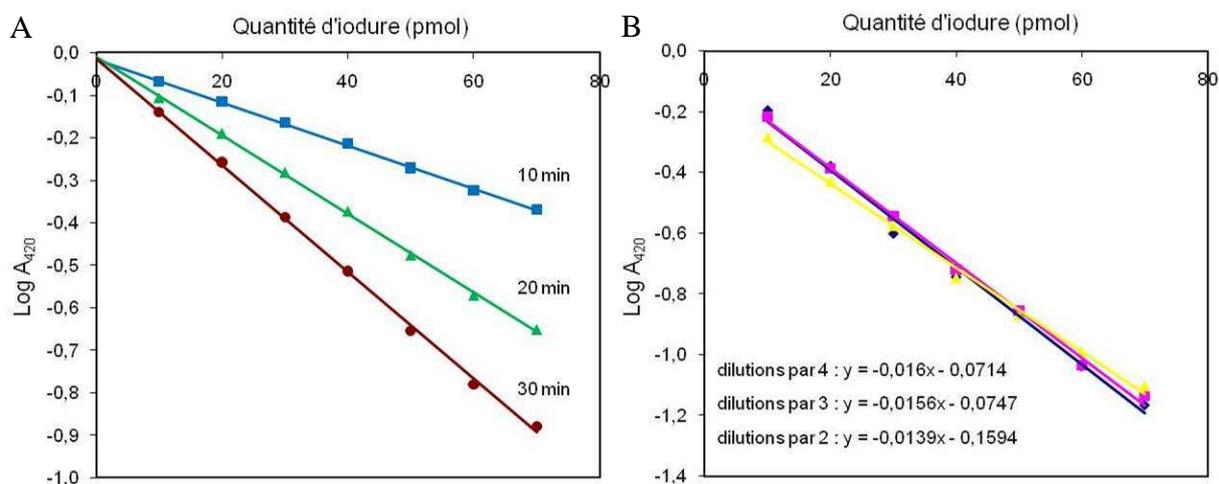


Figure 22. Paramètres influant sur la droite d'étalonnage

A) Influence du temps de réaction

B) Influence des concentrations en cérium et en arsenic

Présence de détergents

Des détergents étant susceptibles d'être utilisés pour lyser les cellules avant de procéder au dosage des iodures, l'influence de deux d'entre eux sur la qualité des courbes d'étalonnage a été testée (Figure 23). Il s'est avéré que la présence de CHAPS (1 %) ou de SDS (0,2 et 1 %) dans les solutions étalons conduit à des droites de pente et de coefficient de régression plus faibles. Il a donc été décidé que les cellules seraient lysées par simple choc osmotique en ajoutant de l'eau.

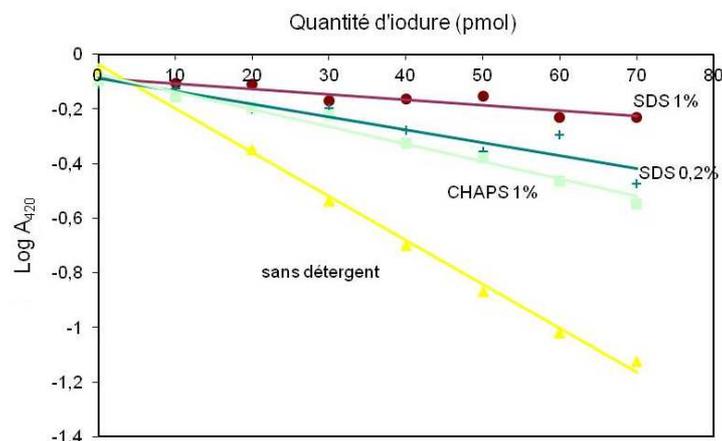


Figure 23. Influence de détergents sur la droite d'étalonnage

Reproductibilité de la méthode

La méthode de dosage ainsi optimisée s'est révélée tout à fait reproductible, à condition que le cérium et l'arsenic soient ajoutés aux solutions étalons dans une courte période de temps. En effet, lorsque les solutions étalons de NaI ont été placées dans 12 colonnes d'une microplaque, que 100 μ L de Ce (IV) à 10,5 mM puis 100 μ L d'As (III) à 24 mM ont été ajoutés rapidement et de manière parfaitement homogène grâce à un distributeur automatique (le Multidrop 384) et que l'absorbance à 420 nm a été mesurée à $t = 30$ min, 12 droites de régression parfaitement superposées ont été obtenues (Figure 24). Les coefficients de régression de ces droites sont tous supérieurs à 0,992 et les ordonnées à l'origine inférieures à 0,047. Lorsque l'arsenic est ajouté une heure après le cérium, la reproductibilité obtenue est nettement moins bonne (non montré).

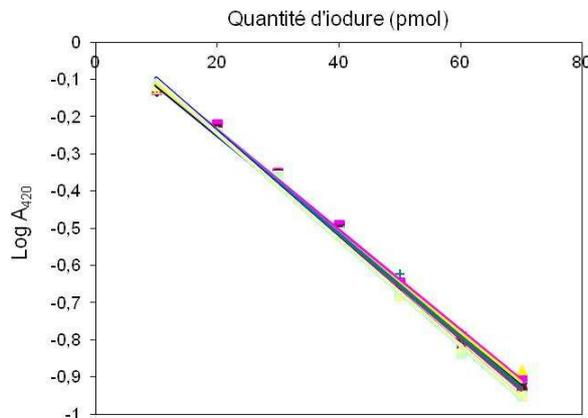


Figure 24. Superposition de 12 droites de régression obtenues dans des conditions identiques

Influence de solvants organiques sur la reproductibilité

Lorsque cette thèse a été débutée, plusieurs mois après le départ de Lucie Pillette, de nouvelles solutions étalons de NaI ont été préparées. Lorsque ces solutions ont été testées à la main sur 6 colonnes d'une microplaque, 6 droites parfaitement superposées ont été obtenues. Mais lorsque nous avons voulu vérifier la reproductibilité du dosage sur une quantité d'expériences plus importante en se servant du Multidrop 384, un phénomène étrange a été observé. Si les données d'absorbance correspondant aux 2 dernières colonnes de la microplaque permettaient de tracer des droites proches de la droite attendue, celles correspondant aux 10 autres colonnes donnaient des droites dont la pente diminuait au fur et à mesure qu'on se rapprochait de la colonne n°1 (Figure 25).

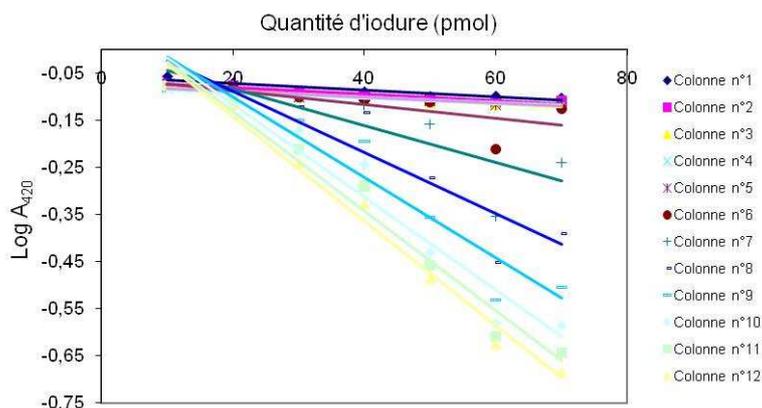


Figure 25. Phénomène de décalage observé dans une microplaque

Le problème venant manifestement du Multidrop 384 et non des solutions, nous avons supposé que les tubulures servant à distribuer les solutions avaient été polluées suite aux expériences d'autres équipes. Elles ont donc été nettoyées avec une solution contenant 0,5 % d'EDTA et 1 % de SDS puis rincées avec de l'eau et de l'éthanol. Une deuxième expérience réalisée immédiatement après ces lavages n'a cependant abouti qu'à un décalage encore plus accentué. Comme les tubulures venaient d'être rincées à l'éthanol, nous avons fait l'hypothèse que les déviations observées provenaient de la présence de ce solvant. Si l'éthanol interférait avec le dosage des iodures, le déplacement progressif des droites de régression vers la droite attendue pouvait en effet être expliqué par le fait que la solution de cérium entraîne l'éthanol présent dans les tubulures au fur et à mesure de sa distribution et que les échantillons sont par conséquent incubés avec des quantités décroissantes d'éthanol de la colonne 1 à la colonne 12. Confirmant cette hypothèse, 12 expériences identiques, réalisées après un important nettoyage à l'eau du Multidrop 384, ont permis d'obtenir à nouveau 12 droites de régression parfaitement superposées.

Suite à cette observation, nous avons testé l'influence non seulement de l'éthanol mais également d'autres solvants sur le dosage d'une solution d'iodure de sodium de concentration connue. Pour ce faire, 100 μL de solutions contenant 500 nM de NaI et entre 1×10^5 et 0,01 ppm de solvant (éthanol, méthanol, acétonitrile, acétone ou DMSO) ont été préparés dans 5 colonnes d'une microplaque 96 puits. Les solutions étalons de NaI (de 0 à 700 nM) ont quant à elles été placées dans une 6^e colonne. Les solutions de cérium et d'arsenic ont été distribuées au moyen du Multidrop 384 (rincé uniquement à l'eau) puis l'absorbance à 420 nm a été mesurée à $t = 30$ min. Le Tableau 2 montre les concentrations en iodure qui ont été déterminées en se servant de la droite de régression $\log A_{420} = f(\text{quantité d'I})$.

Quantité de solvant dans les 100 μL (ppm)	[I-] (nM) présence d'EtOH	[I-] (nM) présence de MeOH	[I-] (nM) présence de MeCN	[I-] (nM) présence de DMSO	[I-] (nM) présence d'acétone
100 000	330	297	112	-161	-53
10 000	405	454	275	178	77
1000	468	525	416	379	108
100	504	544	496	469	366
10	520	539	510	491	506
1	531	555	477	517	527
0,1	530	529	507	506	553
0,01	533	530	501	484	546

Tableau 2. Influence de différents solvants sur la mesure d'une concentration d'iodure connue
Les cases grisées indiquent les quantités de solvant à partir desquelles le dosage est faussé

Les résultats obtenus montrent que le dosage est affecté par l'ensemble des solvants testés. Le Multidrop 384 ne peut donc être nettoyé qu'avec de l'eau. La quantité de solvant à partir de laquelle la mesure est faussée diffère cependant selon les solvants : 10 000 ppm pour l'éthanol et le méthanol, 1000 ppm pour l'acétonitrile et le DMSO et 100 ppm pour l'acétone.

Influence de l'ordre d'addition du cérium et de l'arsenic

La reproductibilité de la méthode ayant à nouveau été démontrée, une dernière expérience d'optimisation a pu être réalisée. Celle-ci a consisté à inverser les distributions de cérium et d'arsenic pour voir si cela avait une influence sur les droites de régression. Les résultats obtenus lorsque le cérium est distribué en premier et l'arsenic en deuxième se sont révélés légèrement meilleurs (coefficient de régression supérieur, ordonnée à l'origine plus proche de 0). Nous avons donc décidé que les solutions de cérium et d'arsenic seraient toujours distribuées dans cet ordre.

Conclusion

Les différentes expériences d'optimisation que nous venons de décrire nous ont permis de définir un protocole de dosage précis pour déterminer la quantité d'iodure captée par des cellules FRTL-5 ensemencées dans des microplaques 96 puits. Les différentes étapes de ce protocole sont les suivantes :

- nettoyer les tubulures du Multidrop 384 avec de l'eau
- lyser les cellules en distribuant 100 µL d'eau
- placer les solutions étalons de NaI dans les colonnes 1 et 12, ce duplicata permettant de vérifier qu'il n'y a pas de déviation dans la microplaque
- ajouter 100 µL d'une solution de Ce (IV) à 10,5 mM à l'ensemble des solutions
- rincer les tubulures du Multidrop 384 avec de l'eau
- ajouter 100 µL d'une solution d'As (III) à 24 mM à l'ensemble des solutions
- lire l'absorbance à 420 nm après 30 min de réaction à température ambiante
- tracer les droites de régression $\log A_{420} = f(\text{quantité d'I})$ grâce aux solutions étalons
- utiliser la droite moyenne pour déterminer la quantité d'iodure captée par les cellules

iii. Mise au point d'un test cellulaire robuste

Définition du facteur Z'

La qualité et la robustesse d'un test biologique peuvent être déterminées par le calcul d'un facteur statistique appelé Z'⁷. Ce facteur se calcule suivant l'équation indiquée ci-dessous :

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_+ + 3\sigma_-)}{|\mu_+ - \mu_-|} \left\{ \begin{array}{l} - \mu_+ : \text{moyenne du signal positif} \\ - \mu_- : \text{moyenne du signal négatif} \\ - \sigma_+ : \text{écart-type du signal positif} \\ - \sigma_- : \text{écart-type du signal négatif} \end{array} \right.$$

Le facteur Z' rend compte à la fois de la variabilité des mesures et de l'écart, appelé fenêtre active, entre un contrôle positif et un contrôle négatif choisis de manière appropriée (Figure 26). Dans le cadre de notre test, le contrôle positif a été défini comme étant la quantité d'iodure entrée dans les cellules en absence de composé et le contrôle négatif comme la quantité d'iodure entrée en présence de 500 µM de perchlorate de sodium, un inhibiteur compétitif puissant du transport d'iodure. Plus la fenêtre active est grande et plus il est facile de distinguer les molécules selon qu'elles soient actives ou inactives, ce qui réduit les risques de sélectionner des « faux-positifs ».

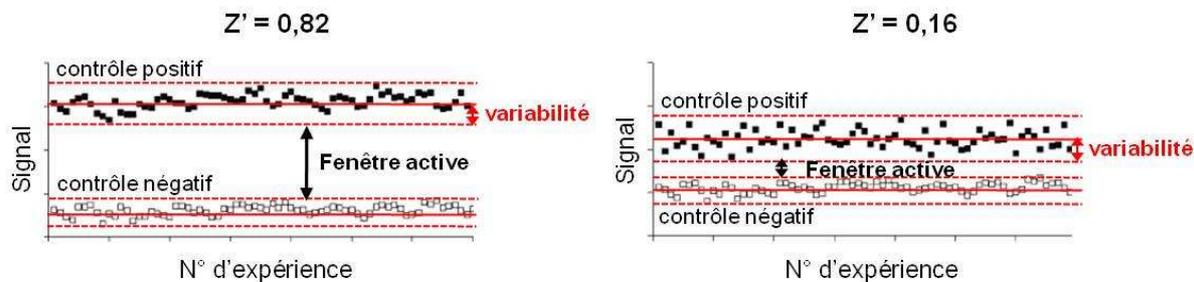


Figure 26. Illustration graphique du facteur Z'

La valeur du Z' peut être comprise entre 1 et $-\infty$. Plus cette valeur est proche de 1, plus la variabilité des mesures est faible et plus la fenêtre active est grande (Figure 26). On considère généralement qu'un Z' compris entre 0,5 et 1 permet d'envisager l'utilisation du test en criblage à haut débit et que les molécules pourront n'être testées qu'une seule fois. Entre 0 et 0,5, le test peut être utilisé mais un duplicata devra être envisagé. En dessous de 0, la variabilité des mesures est trop importante et le rapport signal sur bruit trop faible : le test ne peut pas être utilisé.

Principe du test cellulaire

Le test cellulaire envisagé est similaire au test radioactif mis au point par le Dr. Lecat-Guillet⁸. Lors de ce test, les cellules sontensemencées dans les puits d'une microplaque 96 puits stérile (Figure 27). Après quelques jours de culture, le milieu est remplacé par un tampon HBSS/Hépès grâce à un laveur de plaques automatique (Power Washer 384) et les cellules sont incubées avec une solution d'iodure de sodium en présence ou non d'un composé X. Une fois l'incubation terminée, le surnageant est éliminé, les cellules sont lysées par choc osmotique puis la quantité d'iodure captée par les cellules est déterminée (grâce au dosage As/Ce détaillé ci-dessus).

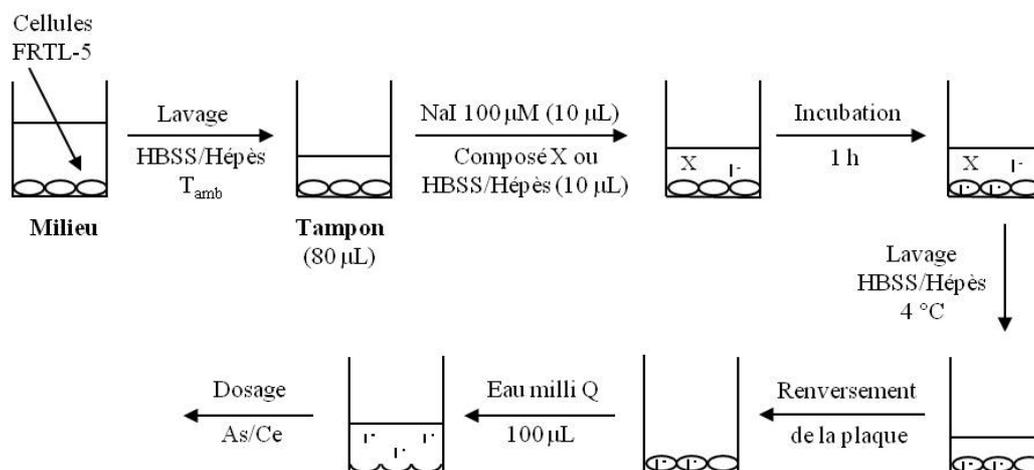


Figure 27. Représentation schématique du test cellulaire dans un puit de microplaque 96 puits

Le temps d'incubation dépend de la lignée cellulaire utilisée. Il avait été choisi lors de la thèse du Dr. Lecat-Guillet pour correspondre au temps nécessaire à l'atteinte d'un équilibre entre influx et efflux d'iodure à travers la membrane plasmique, soit 45 min pour des cellules FRTL-5. Attendre que cet équilibre soit atteint avant de doser l'iodure accumulé dans les cellules permet d'obtenir un signal stable qui limite la variabilité inter-puits et inter-plaques. Lors de nos expériences, nous avons augmenté ce temps d'incubation à 1 h. Nous avons par ailleurs décidé de conserver une concentration de 10 μM en iodure de sodium, valeur fixée par le Dr. Lecat-Guillet d'après les concentrations utilisées dans la littérature, et d'utiliser les programmes de lavage mis au point à l'époque de sorte à pouvoir remplacer une solution par

une autre sans décrocher de cellules. Après avoir testé différentes conditions de culture cellulaire, le Dr. Lecat-Guillet avait constaté, dans le cadre du test de capture d' ^{125}I , que le meilleur facteur Z' correspondait à des microplaquesensemencées 3 jours avant le test à raison de 40 000 cellules par puit. Nous nous sommes basés sur ces résultats et avons ainsi réalisé nos tests de capture d'iode à J+3 avec des microplaquesensemencées à raison de 50 000 cellules par puit. Cette condition n'avait pas été testée par le Dr. Lecat-Guillet mais ses résultats semblaient montrer que plus le nombre de cellules est important, plus le facteur Z' est proche de 1. C'est pourquoi nous avons légèrement augmenté la quantité de cellulesensemencées.

Détermination du facteur Z'

Le facteur Z' a été déterminé sur deux séries de mesures réalisées à une semaine d'intervalle. La 1^{ère} série a été réalisée sur 2 microplaques 96 puits et la 2^e sur 5 microplaques. Comme nous l'avons indiqué plus haut, déterminer le facteur Z' d'un test consiste à mesurer un grand nombre de fois la valeur d'un contrôle positif et celle d'un contrôle négatif et à calculer pour chacune de ces valeurs une moyenne et un écart-type.

A cette fin, les microplaques ont étéensemencées trois jours avant le test puis ont été divisées en deux parties. Dans les colonnes 5 à 11 correspondant au contrôle positif, les cellules ont été incubées 1 h avec 10 μM d'iode de sodium. Dans les colonnes 2 à 4 correspondant au contrôle négatif, elles ont été incubées avec 10 μM d'iode de sodium et 500 μM de perchlorate. Afin d'augmenter la reproductibilité des expériences, les solutions ont été ajoutées aux cellules au moyen d'un appareil de pipetage manuel, le Liquidator 96, permettant de distribuer avec précision et une seule fois un volume donné de solution dans les 96 puits d'une microplaque. Une fois l'incubation terminée, les surnageants ont été éliminés, les cellules lysées et les quantités d'iode captées par les cellules déterminées grâce au dosage As/Ce. L'ensemble des concentrations d'iode obtenu est présenté Figure 28.

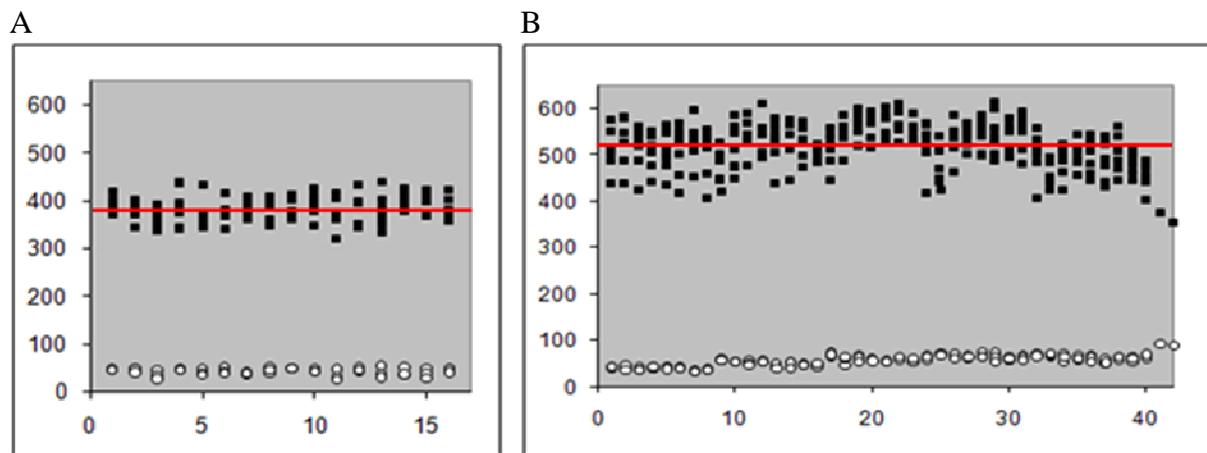


Figure 28. Concentrations d'iode mesurées après incubation des cellules avec 10 μM de NaI en présence (○) ou absence (■) de 500 μM de ClO_4^- . Chaque point correspond à un puit.

A) résultats obtenus sur 2 microplaques 96 puits, B) résultats obtenus sur 5 microplaques 96 puits (les droites rouges indiquent la moyenne du contrôle positif pour chacune des deux séries de mesure)

Le facteur Z' a été calculé pour chacune de ces séries de mesure selon la formule indiquée précédemment. Nous avons ainsi obtenu une valeur de 0,63 pour les deux premières plaques et de 0,71 pour les cinq autres. Ces valeurs indiquent que le test cellulaire de capture d'iode que nous avons mis au point est robuste et qu'il peut être utilisé dans le cadre de criblages à haut débit. Pour augmenter la fiabilité de nos résultats, nous avons tout de même décidé que les IC_{50} de nos composés seraient déterminées en effectuant 2 tests indépendants.

iv. Evaluation de la fiabilité du test

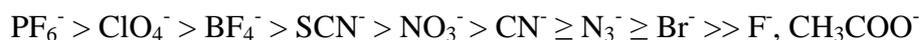
Afin de vérifier la fiabilité de notre test cellulaire, les valeurs d'IC₅₀ d'une série d'anions ont été déterminées et comparées aux valeurs obtenues par le Dr. Lecat-Guillet avec le test de capture radioactif. Ces anions sont connus pour inhiber plus ou moins fortement le transport d'iodures (ClO₄⁻, BF₄⁻, SCN⁻, PF₆⁻, N₃⁻, CN⁻, Br⁻, NO₃⁻) ou pour être complètement inactifs (F⁻, CH₃COO⁻).

Les IC₅₀ ont été déterminées en mesurant les quantités d'iodure captées par des cellules FRTL-5 en présence de concentrations d'anions comprises entre 8×10^{-3} et $0,37 \times 10^{-12}$ M. La courbe dose-réponse $[I] = f(\log[\text{composé}])$ a été tracée pour chaque anion et les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées par une méthode de régression non linéaire. La moyenne des valeurs obtenues lors de 3 ou 4 expériences, ainsi que l'écart-type calculé sur ces valeurs, sont indiqués dans le Tableau 3.

Anion	IC ₅₀ (μM)	
	As/Ce	Capture d' ¹²⁵ I
NaClO ₄	0,10 ± 0,027	0,14 ± 0,007
NaBF ₄	1,2 ± 0,14	0,75 ± 0,032
NaSCN	12 ± 1,3	14 ± 0,4
KPF ₆	0,015 ± 0,004	0,009 ± 0,01
NaN ₃	2200 ± 480	1200 ± 80
KCN	1900 ± 770	1700 ± 250
NaBr	3300 ± 1100	1400 ± 160
NaF	Inactif	Inactif
CH ₃ COONa	Inactif	Inactif
NaNO ₃	800 ± 65	250 ± 19

Tableau 3. Comparaison des valeurs d'IC₅₀ déterminées pour différents anions à l'aide du test de capture d'iodure radioactif ou du test As/Ce

Les valeurs d'IC₅₀ déterminées par les deux méthodes se sont révélées tout à fait comparables et en très bon accord avec les données de la littérature. Ces données classent en effet les anions testés dans l'ordre d'activité suivant :



Ces données montrent que le test As/Ce permet de déterminer l'IC₅₀ d'inhibiteurs du transport d'iodure. Il était donc possible d'utiliser ce test à la place du test radioactif pour déterminer l'activité d'analogues d'**ITB₅**.

Une expérience menée en parallèle sur le perchlorate et sur l'inhibiteur **ITB₅** (IC₅₀ = 40 ± 17 nM selon le test de capture radioactif) a permis de confirmer sur un plus grand nombre de valeurs la reproductibilité des IC₅₀ déterminées par le test As/Ce. Dans cette expérience, les cellules ont été incubées avec des concentrations de perchlorate et d'**ITB₅** comprises entre 2×10^{-4} et $1,6 \times 10^{-13}$ M. La solution mère d'**ITB₅** ayant été préparée à 20 mM dans du DMSO, ces concentrations permettaient à la fois de ne pas exposer les cellules à plus de 1 % de DMSO et de conserver une gamme de concentration importante. Les IC₅₀ de ces deux composés ont été déterminées 10 fois, soit sur une même microplaque, soit sur 10 microplaques testées à des jours différents. Nous avons ainsi obtenu des valeurs de 55 ± 16 nM (1 plaque) et 63 ± 12 nM (10 plaques) pour **ITB₅** et 100 ± 27 nM (1 plaque) et 126 ± 45 nM (10 plaques) pour le perchlorate. Ces résultats indiquent que le test As/Ce est à la fois précis et reproductible.

v. Conclusion

Le test As/Ce que nous avons mis au point permet de déterminer rapidement et simplement la quantité d'iodures captée par des cellules FRTL-5 en présence ou absence de composés, sans avoir à recourir à de l'iodure radioactif. Ce test est sensible, suffisamment robuste pour pouvoir être utilisé dans le cadre d'un criblage à haut débit et permet de déterminer l'IC₅₀ d'inhibiteurs du transport d'iodure avec une bonne reproductibilité, une bonne fiabilité et une bonne précision. Sa mise au point a fait l'objet d'une publication dans *Analytical Biochemistry*⁹ (voir Annexes). Cette méthode a été utilisée pour déterminer l'activité de tous les composés qui ont été synthétisés au cours du projet.

3.1.b) Synthèse d'analogues

Afin d'étudier la relation structure-activité d'ITB₅, 180 analogues ont été synthétisés par synthèse parallèle (Lucie Pillette) et 4 analogues ont été synthétisés de manière individuelle (Lucie Pillette et Elodie Verhaeghe). Mon rôle a consisté à tester ces 184 composés grâce au test As/Ce décrit plus haut.

i. Obtention d'analogues par synthèse parallèle

Les 180 premiers composés ont été obtenus par une réaction d'amination réductrice similaire à celle qui permet de synthétiser le composé ITB₅ lui-même (Schéma 1.A). Cette réaction a été optimisée de sorte à générer rapidement une série de composés A_xB_y (Schéma 1.B) possédant un degré de pureté suffisant (> 90 %) pour pouvoir être testés sur cellules.

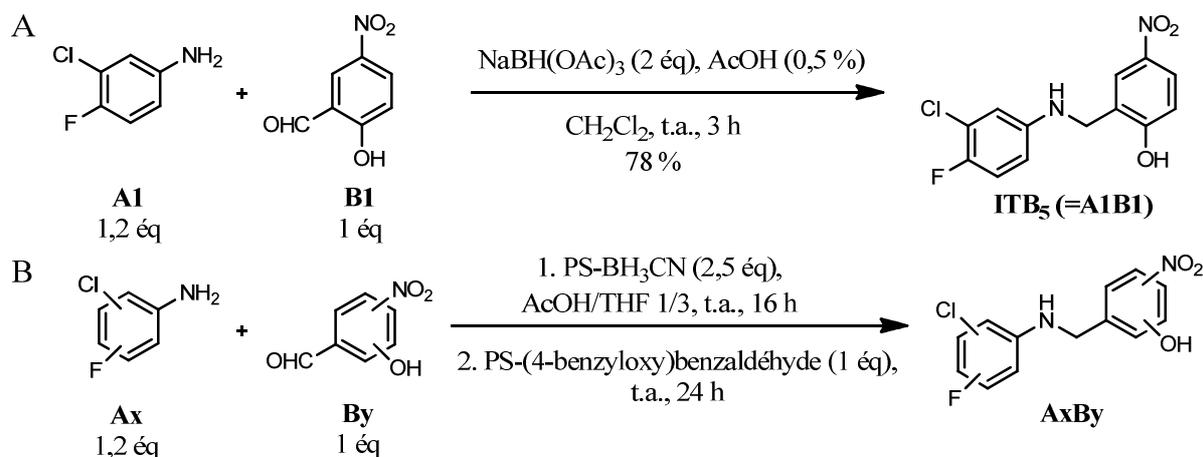


Schéma 1. Aminations réductrices ayant permis de synthétiser ITB₅ et ses analogues

A) Synthèse d'ITB₅, B) Synthèse parallèle de la librairie A_xB_y (180 composés)

La réaction optimisée a consisté à combiner individuellement 12 aldéhydes aromatiques B_y avec 15 anilines A_x (Tableau 4) en utilisant un léger excès d'aniline pour éviter une polyalkylation et en présence de cyanoborohydrure supporté (PS-BH₃CN). Après 16 h de réaction, l'excès d'aniline n'ayant pas réagi est éliminé grâce à l'ajout d'une résine électrophile (PS-(4-benzyloxy)-benzaldéhyde) et après 24 h d'agitation supplémentaires, le mélange réactionnel est filtré. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite et la pureté des produits déterminée par HPLC analytique et par RMN ¹H. Dans la majorité des cas, l'utilisation de réactifs supportés a permis d'obtenir des produits purs à plus de 90 % sans autre purification qu'une filtration. Dans quelques cas néanmoins, une purification supplémentaire par chromatographie sur colonne a été nécessaire (61 composés sur 180).

Les anilines **Ax** et les aldéhydes **By** engagés dans cette réaction ont été sélectionnés de sorte à obtenir des composés présentant un maximum de substitutions différentes des cycles aromatiques par les atomes de chlore et de fluor d'une part et par les groupements nitro et hydroxyle d'autre part. La comparaison de l'activité de ces composés avec celle d'**ITB₅** devait permettre de savoir à quel point l'activité d'**ITB₅** est affectée lorsque le positionnement de ces groupements est modifié ou lorsque ces groupements sont supprimés.

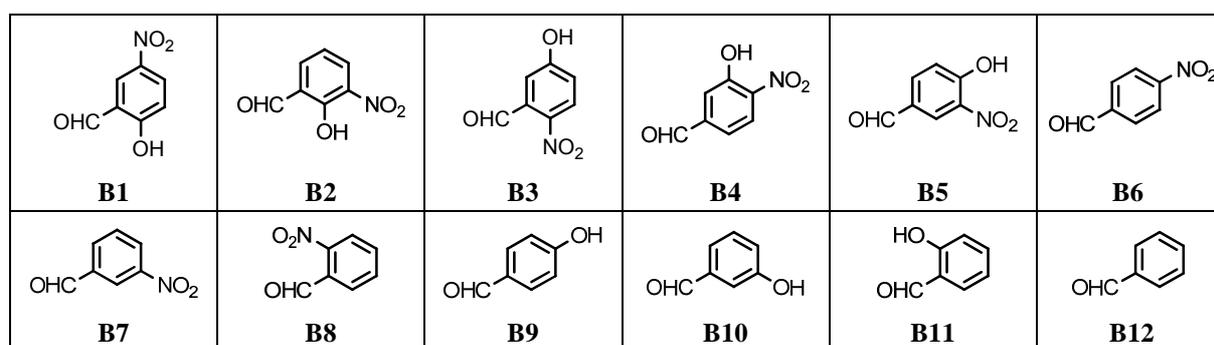
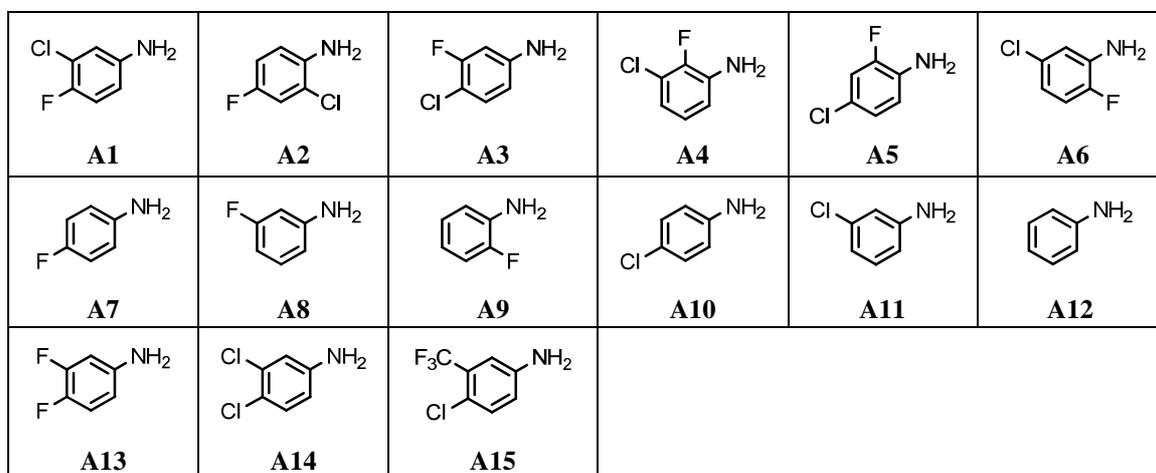


Tableau 4. Anilines **Ax** et aldéhydes aromatiques **By** sélectionnés pour synthétiser la librairie **AxBy**

ii. Synthèses individuelles

Quatre composés comportant une variation structurale simple ont été synthétisés de manière individuelle. Ces variations devaient permettre de savoir si le bras espaceur entre les deux cycles aromatiques pouvait être modifié et si les groupements nitro et hydroxyle pouvaient être modifiés chimiquement tout en conservant leur position initiale. Le composé **12** a été synthétisé par couplage peptidique à partir de l'aniline **A1** et de l'analogue carboxylique de **B1** en utilisant comme agent de couplage du *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (Schéma 2). Il a ainsi été obtenu avec un rendement de 48 % après chromatographie. L'introduction d'une fonction amide entre les deux cycles aromatiques a été réalisée afin de rigidifier le bras espaceur et de modifier fortement la basicité de l'atome d'azote.

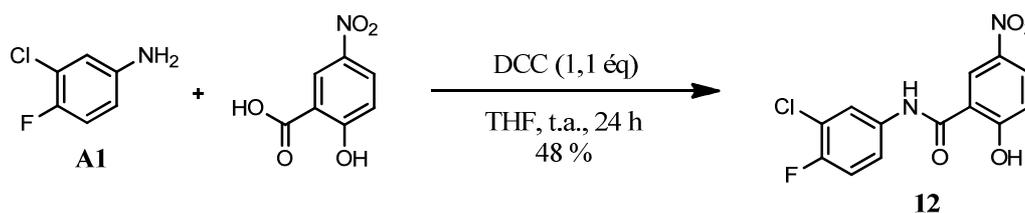


Schéma 2. Synthèse du composé **12**

Le composé **13** a été synthétisé de la même manière que les composés de la librairie **AxB_y** à partir de 3-chloro-4-fluorobenzaldéhyde et de 2-hydroxy-5-nitroaniline (Schéma 3). Il a été obtenu avec un rendement quantitatif. Tester ce composé permettait de savoir si la position de l'amine aromatique centrale était importante pour l'activité biologique du composé.

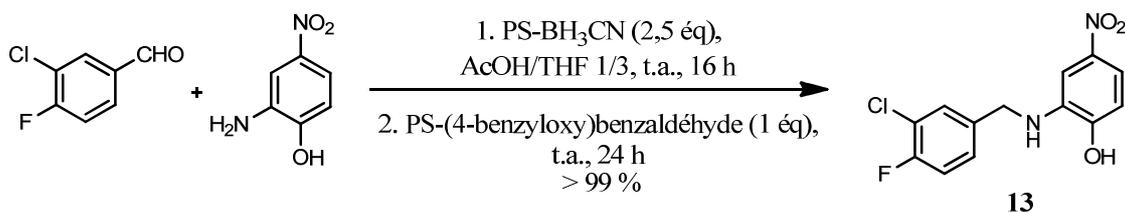


Schéma 3. Synthèse du composé 13

La 3^e synthèse a consisté à alkylter la fonction phénol du composé **ITB₅** au moyen de méthanesulfonate de méthyle (Schéma 4). Cette alkylation a été réalisée dans de l'acétonitrile à 60 °C en présence de carbonate de césium, selon le protocole décrit par Lee *et al.*¹⁰. Dans ces conditions, le composé **14** a été obtenu avec un rendement de 59 % après chromatographie. Le produit alkylé devait nous indiquer si la présence et la capacité à être protonée de la fonction phénol étaient importantes pour l'activité d'**ITB₅** et si l'augmentation d'encombrement stérique au niveau de cette fonction pouvait avoir une influence sur cette activité.

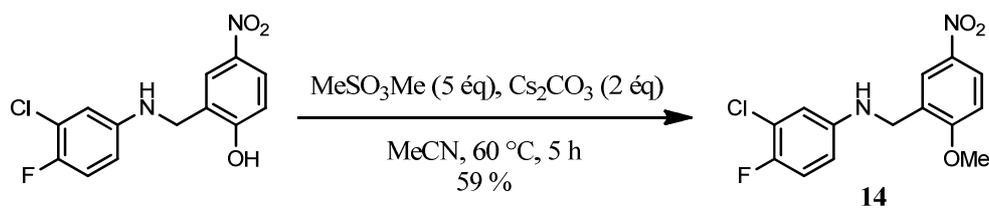


Schéma 4. Synthèse du composé 14

Le composé **15** n'a pas été produit en même temps que les autres composés. Ce composé a été synthétisé par le Dr. Elodie Verhaeghe lors de la thèse qu'elle a effectuée au laboratoire et nous avons décidé de l'ajouter à notre étude pour avoir un complément d'information sur le groupement nitro. Les conditions réactionnelles indiquées ici (Schéma 5) sont celles que le Dr. Verhaeghe avait mises au point à partir de protocoles de la littérature afin de minimiser l'obtention de produits de débenzylation ou de déhalogénéation¹¹. Ces conditions lui avaient permis d'obtenir le composé **15** avec un rendement de 65 % après chromatographie. L'aniline obtenue était particulièrement intéressante pour notre étude structure-activité. Elle devait en effet nous indiquer si la fonction nitro pouvait être utilisée pour greffer sur **ITB₅** les groupements nécessaires à l'obtention d'une sonde photoactivable.

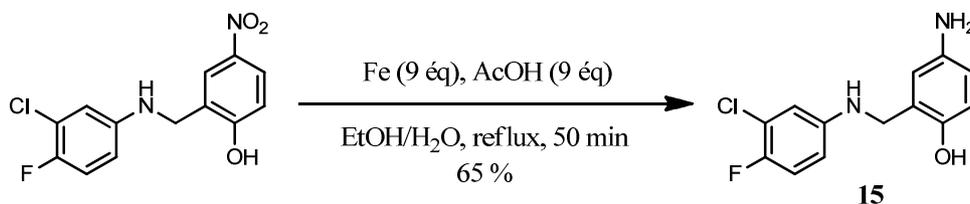


Schéma 5. Synthèse du composé 15

3.1.c) Evaluation de l'activité biologique des 184 analogues

i. Déroulement du criblage

L'ensemble du criblage, réalisé en duplicata, s'est déroulé sur 4 semaines, 2 semaines étant nécessaires pour chaque série de tests. 6 microplaques ont été testées par jour, à raison de 2 jours de test par semaine et de 8 composés par microplaque.

Les cellules sont ensemencées dans des microplaques 3 jours avant les journées de test. Ces journées commencent avec la préparation, à partir de solutions mères de composés à 20 mM dans le DMSO, de plaques jumelles 10× dont le plan est indiqué Figure 29. 2 colonnes ont été systématiquement réservées à la détermination des IC₅₀ d'ITB₅ et du perchlorate, deux composés de référence servant d'expériences contrôles.

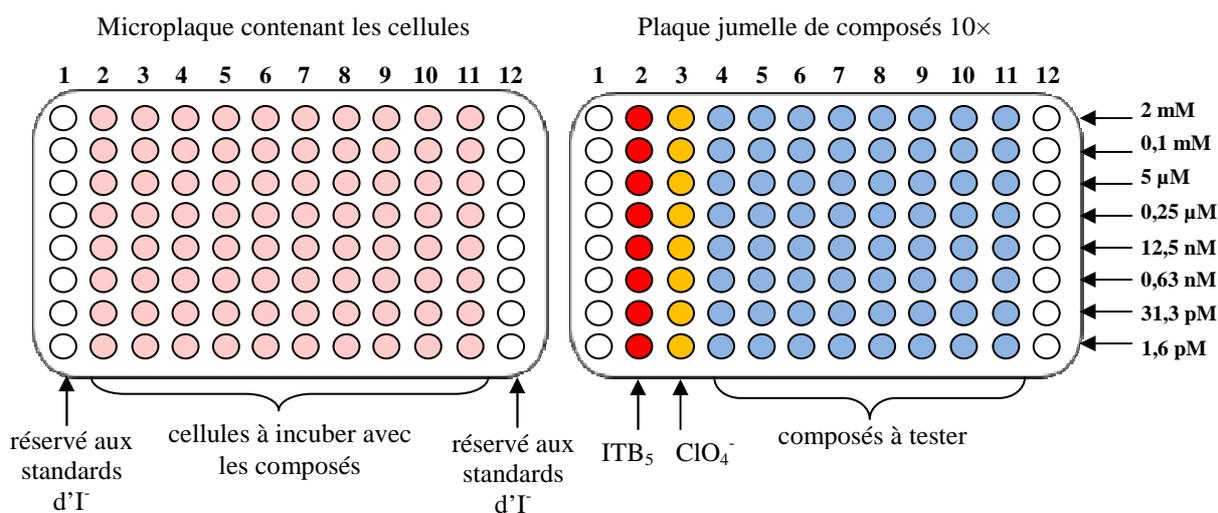


Figure 29. Plan des microplaques et des plaques jumelles de composés

Les 6 microplaques d'une journée de test sont traitées avec un décalage de 5 min. Chacune d'entre elles est d'abord lavée de sorte à remplacer le milieu de culture par 80 μL de tampon HBSS/Hépès. 10 μL de composés (10 \times) sont alors ajoutés depuis l'une des plaques jumelles puis 10 μL de NaI à 100 μM à l'aide du Liquidator 96. Après une incubation d'1 h, les microplaques sont lavées, les surnageants éliminés et 100 μL d'eau ajoutés au Multidrop 384 dans les colonnes 2 à 11 de sorte à lyser les cellules.

Afin de déterminer les quantités d'iodure captées par les cellules, des solutions étalons d'iodure de sodium allant de 0 à 700 nM sont ensuite placées dans les colonnes 1 et 12 des 6 microplaques. 100 μL de Ce (IV) à 10,5 mM sont distribués au Multidrop 384 dans l'ensemble des plaques puis 100 μL d'As (III) à 24 mM avec un intervalle d'1 min entre chaque plaque. Après 30 min d'incubation à l'abri de la lumière, les valeurs d'absorbance à 420 nm sont lues avec le même décalage temporel (1 min) grâce au spectrophotomètre SpectraMax Plus 384. Ces valeurs sont converties en concentrations d'iodure grâce aux droites d'étalonnage puis une courbe dose-réponse $[I] = f(\log[\text{composé}])$ est tracée pour chacun des composés. Les valeurs d'IC₅₀ sont enfin déterminées par une méthode de régression non linéaire utilisant un classeur Excel conçu au laboratoire.

ii. Résultats et analyse SAR

Les valeurs d'IC₅₀ obtenues lors de la 1^{ère} série de tests sont résumées dans le Tableau 5 selon qu'elles soient inférieures à 0,1 μM (auquel cas les valeurs exactes sont indiquées), comprises entre 0,1 et 0,5 μM (gris clair) ou supérieures à 0,5 μM (gris foncé). La deuxième série de tests a donné des résultats très semblables à la première, excepté pour cinq composés

qui ont du être testés une troisième fois. En conservant pour ces cinq composés les deux valeurs d'IC₅₀ les plus proches, nous avons finalement obtenu des valeurs qui diffèrent au maximum d'un facteur, ce qui est tout à fait acceptable pour un test cellulaire. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication dans ChemMedChem¹² (voir Annexes).

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
A1	0,03	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A2	0,04	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A3	0,05	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A4	0,02	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A5	0,02	■	■	0,08	■	0,04	■	■	■	■	■	■
A6	0,06	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A9	0,05	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A10	0,07	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A11	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A12	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A13	0,09	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A14	0,06	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A15	0,07	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

12	13	14	15
■	■	0,02	■

Tableau 5. Valeurs d'IC₅₀ obtenues pour les analogues d'ITB₅ lors de la 1^{ère} série de test
 IC₅₀ < 0,1 μM : valeurs exactes indiquées ; 0,1 μM ≤ IC₅₀ ≤ 0,5 μM : ■ ; IC₅₀ > 0,5 μM : ■ .

Sur les 184 composés testés, 14 présentent une activité comparable à celle du composé ITB₅, avec des IC₅₀ comprises entre 20 et 90 nM. Ces molécules se sont par ailleurs révélées être les plus actives de la série. Il est intéressant de noter que sur ces 14 composés, 11 ont été synthétisés à partir de l'aldéhyde B1, indiquant à la fois que les groupements nitro et hydroxyle sont importants pour l'activité de la molécule et que la configuration idéale pour ces deux groupements est celle présente dans le composé initial. Cette observation a été confirmée par deux autres constatations :

1. l'activité de la molécule est affectée de manière significative lorsque les positions occupées par les groupements nitro et hydroxyle varient (IC₅₀ des composés AxB2, AxB4 et AxB5 diminuées d'un facteur ≥ 10 par rapport à l'IC₅₀ d'ITB₅ dans 82 % des cas) et en particulier lorsque ces groupements sont intervertis (IC₅₀ des composés AxB3 comprises entre 0,4 et 10 μM),
2. les composés AxB12 ne comportant aucun de ces deux groupements possèdent tous une IC₅₀ ≥ 1 μM.

Il semblerait néanmoins que de ces deux groupements fonctionnels ce soit le groupement nitro qui ait le plus d'importance pour l'activité de la molécule. En effet, lorsque le cycle droit des composés n'est substitué que par un groupement hydroxyle (AxB9 à AxB11), 82 % des IC₅₀ obtenues sont supérieures à 0,5 μM alors que ce n'est le cas que de 24 % des composés dont le cycle droit n'est substitué que par un groupement nitro (AxB6 à AxB8).

Les deux halogènes semblent également importants pour l'activité de la molécule puisque leur suppression (composés **A12By**) conduit à une importante diminution d'activité. En comparant les séries **A1**, **A3**, **A13** et **A14**, on constate cependant que, contrairement aux groupements hydroxyles et nitro, les atomes de chlore et de fluor peuvent être intervertis sans que l'activité ne soit grandement modifiée (diminution d'un facteur 3 maximum). On peut par ailleurs remarquer que le positionnement de l'atome de fluor en ortho par rapport à la fonction aniline permet d'augmenter légèrement l'activité du composé initial (IC₅₀ des composés **A4B1** et **A5B1** égale à 20 nM) et compense en partie l'absence d'un deuxième halogène, l'IC₅₀ du composé **A9B1** (50 nM) étant la meilleure obtenue pour les composés monohalogénés (**A7B1** à **A11B1**).

Les modifications portant sur la chaîne aminométhyle ont clairement montré l'impossibilité d'utiliser la fonction aniline pour attacher un quelconque groupement fonctionnel au composé **ITB₅**. L'inversion de la chaîne (composé **13**) et le remplacement de l'amine par un amide (composé **12**) ont en effet conduit à une division de l'activité par des facteurs de 25 et de 50, respectivement. L'utilisation du groupement nitro est tout aussi inenvisageable puisque la réduction du groupement nitro en amine (composé **15**) produit un composé dont l'IC₅₀ n'est plus que de 1 µM. Ce résultat était à prévoir puisque la comparaison des composés **AxB9**, **AxB10** et **AxB11** d'une part et des composés **AxB6**, **AxB7** et **AxB8** d'autre part avait déjà montré l'importance de ce groupement pour l'activité de la molécule.

Un résultat particulièrement intéressant a par contre été obtenu avec le composé **14**, correspondant au composé **ITB₅** alkylé au niveau de la fonction phénol. Une activité 2 fois plus importante que celle du composé non-alkylé (20 nM au lieu de 40 nM) a en effet pu être observée. Il semblerait donc que la présence d'un oxygène à cette position soit importante mais que l'hydrogène puisse être remplacé par une chaîne alkyle.

3.1.d) Conclusion

La synthèse de 184 analogues d'**ITB₅** et l'évaluation de leur activité biologique ont permis d'obtenir de précieuses informations quant à l'influence relative des groupements fonctionnels d'**ITB₅** sur son activité. D'après ces informations, la configuration idéale pour le cycle droit de la molécule est celle trouvée dans la molécule initiale (groupement **B1**). Cette configuration a donc été conservée. L'IC₅₀ obtenue pour le composé **14** a montré que la fonction phénol peut être alkylée sans que l'activité de la molécule ne soit modifiée. Cette fonction est donc celle que nous avons choisie pour coupler un groupement photoactivable et une molécule de Biotine au composé **ITB₅**. La chaîne aminométhyle ne pouvant être modifiée sans que l'activité ne soit diminuée au minimum d'un facteur 25, cette partie de la molécule devait rester inchangée. Quant à la partie gauche de la molécule, nous avons observé que des activités similaires étaient obtenues lorsque la nature et la position des halogènes étaient modifiées. Différentes configurations auraient donc pu être choisies. Nous avons finalement conservé celle présente dans **ITB₅** (groupement **A1**) car un certain nombre de données biologiques était déjà disponible avec le composé **A1B1** (= **ITB₅**) pour comparaison. L'ensemble de ces résultats nous a conduits à envisager la synthèse d'une sonde dont la structure est basée sur la structure du composé **14** (**ITB₅**-alkylé).

3.2. Synthèse d'une sonde biotinylée photoactivable et évaluation de son activité

3.2.a) Conception de la sonde et stratégie de synthèse

La sonde que nous souhaitons synthétiser est présentée Figure 30. Elle est constituée de la molécule **ITB₅**, appât permettant la reconnaissance spécifique de la protéine cible par la sonde, d'un groupement photoactivable permettant de créer une liaison covalente avec cette protéine et d'une molécule de Biotine devant servir à la fois à analyser les résultats du photomarquage et à isoler la protéine marquée. La synthèse envisagée consistait à introduire, par alkylation de la fonction phénol, une amine primaire. Cette amine permettait en effet de lier le composé **ITB₅** à la fois au groupement photoactivable par amination réductrice et à un bras biotinylé par couplage peptidique.

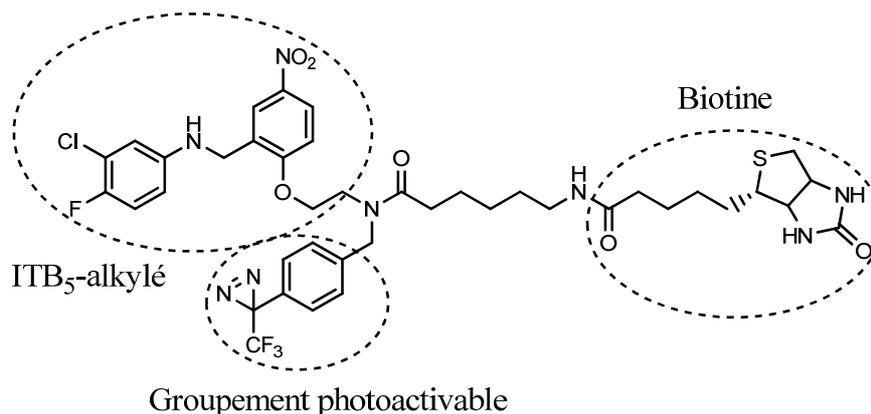


Figure 30. Sonde **ITB₅-P₁** à synthétiser

La chaîne alkyle séparant le groupement photoactivable et **ITB₅** a volontairement été choisie pour être courte. En effet, si le groupement photoactivable doit être éloigné de l'inhibiteur pour ne pas provoquer de gêne stérique, il doit aussi être proche du site reconnu par la molécule pour que le photomarquage soit efficace. Cette nécessité de rechercher un juste équilibre entre activité biologique et efficacité de photomarquage est illustrée par l'étude du lespedezate de sodium menée par l'équipe de Fujii¹³. Dans cette étude, les composés pour lesquels le groupement photoactivable a été éloigné du pharmacophore ont une bonne activité mais ne conduisent à aucun photomarquage alors que les sondes comportant un pharmacophore et un groupement photoactivable proches permettent de photomarquer efficacement une protéine malgré une activité moindre.

La molécule de Biotine, quant à elle, a été éloignée de l'inhibiteur au moyen d'un bras espaceur comportant 6 atomes de carbone et 1 atome d'azote. Cet éloignement permet d'éviter que la Biotine n'empêche la reconnaissance entre l'inhibiteur et sa cible et facilite l'interaction de la Biotine avec de la Streptavidine supportée lors des étapes de purification. Nous nous sommes toutefois restreints à 7 atomes pour ne pas rendre difficile la traversée des membranes biologiques.

Le schéma de rétrosynthèse de la sonde **ITB₅-P₁** est indiqué ci-dessous (Figure 31). Le caractère convergeant de la synthèse envisagée permet de réaliser en parallèle l'alkylation d'**ITB₅** (composé **26**), la production du bras biotinylé (composé **24**) et la synthèse du groupement photoactivable (composé **22**), ces 3 éléments étant ensuite assemblés, comme nous l'avons indiqué précédemment, par amination réductrice et par couplage peptidique.

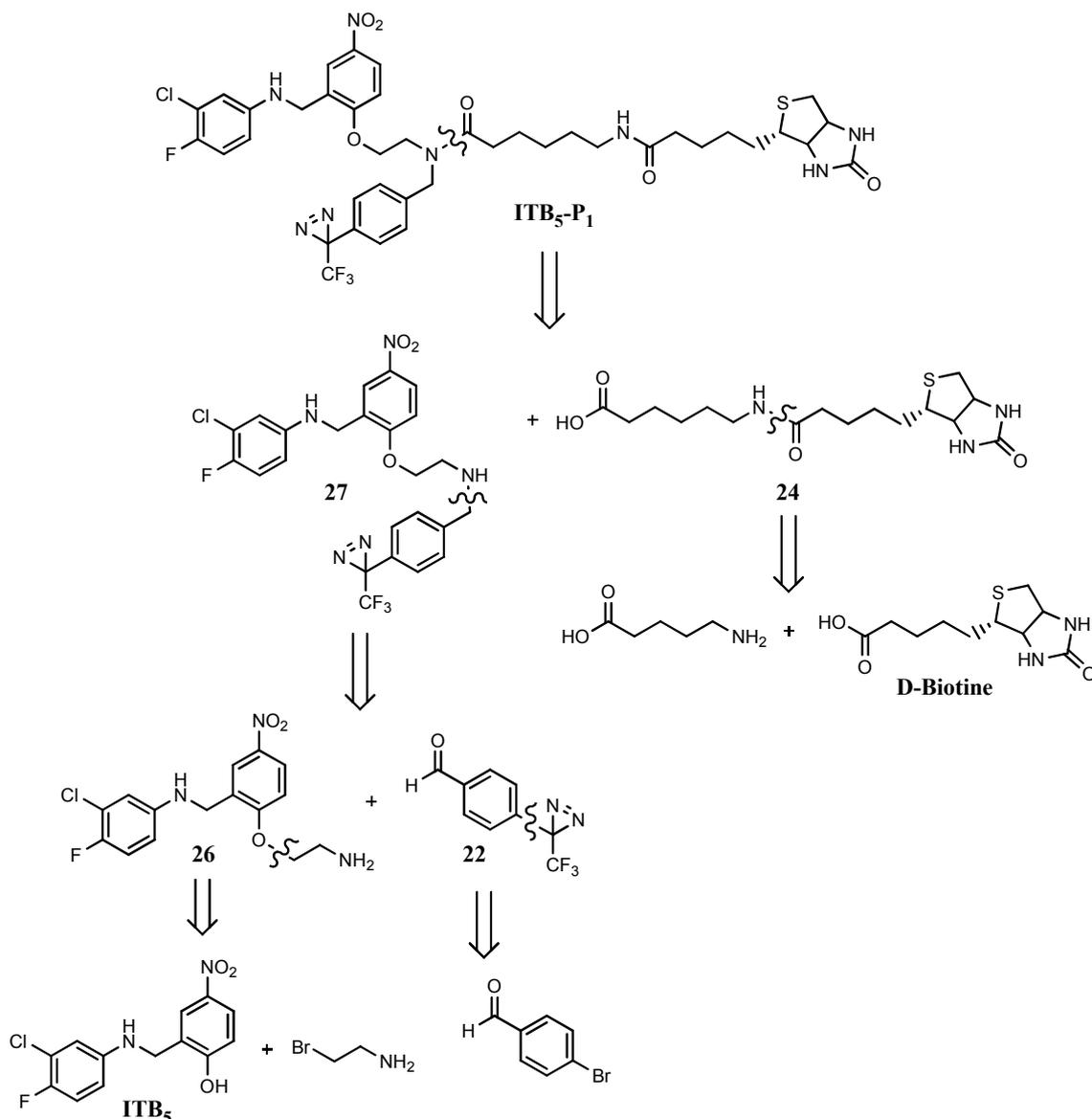


Figure 31. Analyse rétro-synthétique de la sonde ITB₅-P₁

La Biotine réduit la solubilité des composés dans les solvants organiques, ce qui peut poser un certain nombre de problèmes tant au cours des réactions que lors de la purification des composés. L'ajout du bras biotinylé (composé **24**) a donc été envisagé en dernière étape. Ce bras est obtenu par couplage peptidique entre une molécule de D-Biotine et de l'acide 6-aminocaproïque (produits commerciaux). Le composé **27** peut être synthétisé par amination réductrice à partir du composé **26** et d'une trifluorométhylphényldiazirine substituée en para par une fonction aldéhyde (composé **22**). Le composé **26** peut être obtenu par réaction du composé **ITB₅** avec de la 2-bromoéthylamine (produit commercial). Quant au composé **22**, il est synthétisé en 7 étapes à partir du parabromobenzaldéhyde (produit commercial) en s'appuyant sur la synthèse décrite par Delfino *et al.*¹⁴.

3.2.b) Synthèse du groupement photoactivable **22**

Comme indiqué ci-dessus, la trifluorométhylphényldiazirine a été synthétisée d'après le protocole décrit par Delfino *et al.*¹⁴ en 1993 (Schéma 6). Des modifications ont cependant été apportées afin d'améliorer certains rendements et de simplifier quelques protocoles.

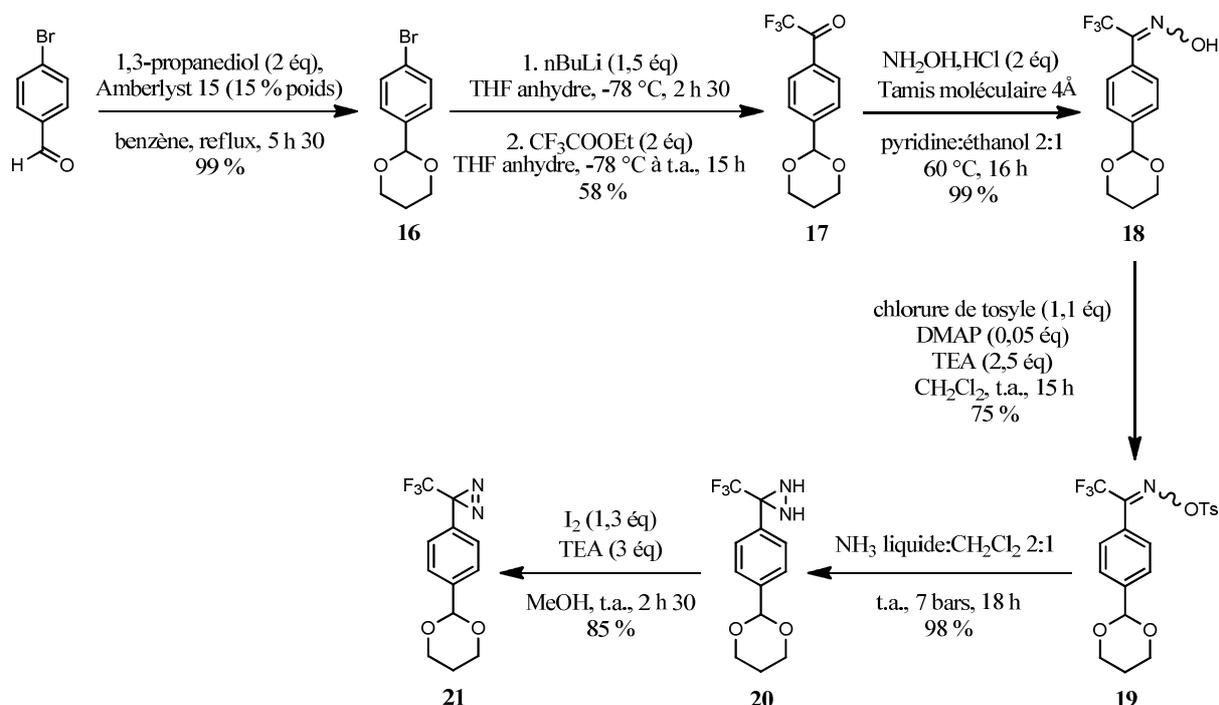


Schéma 6. Synthèse du groupement photoactivable protégé 21

La première étape de cette synthèse a consisté à protéger la fonction aldéhyde du parabromobenzaldéhyde par un acétal cyclique (**16**). Cette protection a été réalisée en faisant réagir, dans du benzène à reflux, le parabromobenzaldéhyde avec un léger excès de 1,3-propanediol en présence d'une résine acide, l'Amberlyst 15. Pour optimiser la conversion, l'eau formée au cours de la réaction a été éliminée à l'aide d'un montage Dean-Stark. Le composé **16** a ainsi été obtenu avec un rendement de 99 %. Une fois l'aldéhyde protégé, une lithiation à -78 °C suivie de l'addition de trifluoroacétate d'éthyle a permis d'introduire le groupement trifluorométhylcétone. Le composé **17** a été obtenu sous forme hydratée (observée en LC-MS) comme décrit par Delfino *et al.* Les conditions indiquées sur le schéma 6 ont permis d'obtenir ce composé avec un rendement de 58 %.

Le composé **17** a été traité par de l'hydroxylamine dans un mélange pyridine/éthanol 2/1 en présence de tamis moléculaire 4 Å pour obtenir l'oxime **18** (rendement de 99 %). Celui-ci a été tosylé (composé **19**) à l'aide de chlorure de tosylate en présence d'une quantité catalytique de diméthylaminopyridine et d'un excès de triéthylamine permettant de piéger l'acide chlorhydrique formé (rendement de 75 %). La diaziridine **20** a ensuite été obtenue avec un rendement de 98 % en faisant réagir le produit **19** avec de l'ammoniac liquide sous pression. La trifluorométhylphényldiazirine **21** a enfin été obtenue par oxydation de la diaziridine grâce à de l'iode moléculaire en présence de triéthylamine. Après chromatographie, le composé **21** a été obtenu avec un rendement de 85 %. Le rendement global sur les 6 étapes a été de 36 % ce qui représente une nette amélioration par rapport à la synthèse décrite par Delfino *et al.* dans laquelle le rendement global n'est que de 12 %.

Afin d'obtenir le produit **21** sous forme d'aldéhyde, deux essais d'hydrolyse ont été réalisés en parallèle : le premier avec 6 équivalents d'HCl et le deuxième avec 1 équivalent en masse d'Amberlyst 15 dans un mélange THF/eau 95/5. Les proportions molaires observées par RMN ^1H , après une première évaporation de solvant, une extraction liquide-liquide et une deuxième évaporation, sont indiquées ci-dessous (Schéma 7). Les proportions acétal/aldéhyde ont été calculées en utilisant les intégrations des singulets correspondant d'une part au proton présent entre les deux atomes d'oxygène du cycle à 6 de l'acétal et d'autre part au proton du groupement aldéhyde.

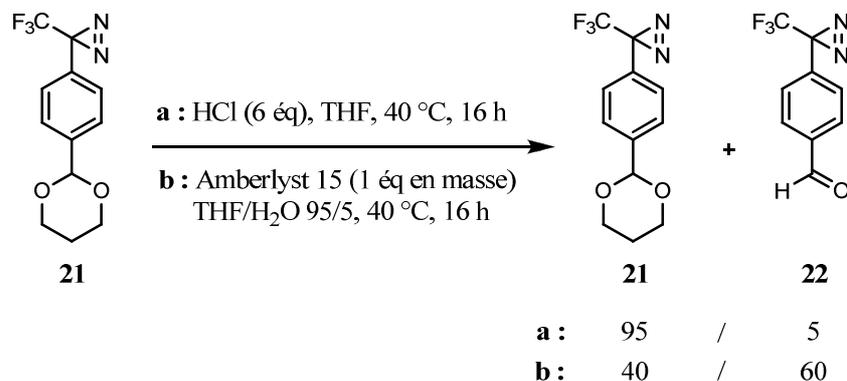


Schéma 7. Tentatives de déprotection de l'acétal par hydrolyse acide

D'après les proportions acétal/aldéhyde obtenues, à savoir 95/5 pour l'HCl et 40/60 pour l'Amberlyst 15, la résine acide permet de déprotéger une quantité d'acétal plus importante. Néanmoins, lorsque nous avons souhaité reproduire la réaction sur de plus grande quantités d'acétal selon la condition b, d'autres proportions ont été obtenues. Après une étude détaillée des différences expérimentales entre ces deux expériences, il s'est avéré que la variation des proportions acétal/aldéhyde était essentiellement liée aux conditions d'évaporation utilisées (température, pression), l'aldéhyde possédant un caractère volatil assez prononcé. Confirmant cette hypothèse, 4 expériences supplémentaires réalisées dans des conditions d'évaporation « douces » (diminution progressive de la pression, $P \geq 150$ mbar, température ambiante) nous ont permis d'obtenir des proportions **21/22** comprises entre 50/50 et 30/70. Nous ne sommes pas parvenus à aller au-delà de ces proportions. Il a donc été décidé que ce mélange serait engagé tel quel dans la réaction d'amination réductrice avec le composé **26**.

3.2.c) Synthèse du bras biotinylé **24**

Le bras biotinylé a été synthétisé grâce à un couplage peptidique en 2 étapes inspiré de protocoles décrits par Bayer et Wilchek^{15,16} (Schéma 8). Dans une première étape, la molécule de D-Biotine a été activée par du *N*-hydroxysuccinimide en présence de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide. Après filtration du mélange réactionnel et évaporation du solvant, le produit **23** a été obtenu avec un rendement quantitatif. Dans une deuxième étape, le produit **23** a été couplé avec de l'acide 6-aminocaproïque en présence de triéthylamine dans le DMF. Le produit de couplage précipitant au fur et à mesure de sa formation, le composé **24** a été obtenu par simple filtration avec une pureté supérieure à 95 % et un rendement de 62 %.

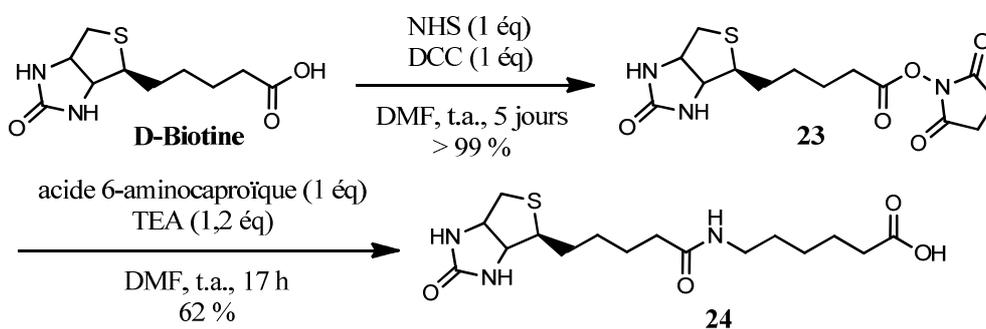


Schéma 8. Synthèse du bras biotinylé **24**

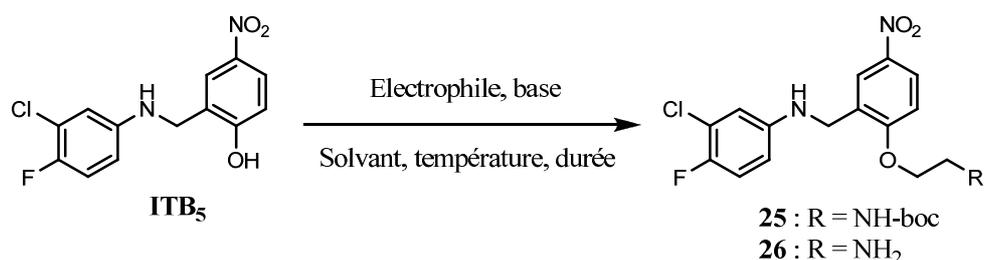
3.2.d) Synthèse de la sonde **ITB₅-P₁**

*i. Introduction d'une fonction amine sur **ITB₅** par alkylation*

L'alkylation du composé **ITB₅** a été envisagée selon le protocole décrit par Lee *et al.*¹⁰, protocole déjà utilisé précédemment pour alkyler **ITB₅** avec du méthanesulfonate de méthyle

(composé **14**). L'introduction d'une fonction amine a donc été tentée dans un premier temps avec de l'hydrobromure de 2-bromoéthylamine à 95 °C et en présence de carbonate de césium (Tableau 6, entrée 1). Ces conditions n'ont cependant pas permis d'observer la formation du produit alkylé souhaité.

Deux autres bases ont été testées, à savoir l'hydroxyde de potassium et l'hydroxyde de lithium, mais l'analyse LC-MS des bruts réactionnels obtenus à température ambiante comme à 80 °C n'a pas davantage mis en évidence la formation du produit attendu (Tableau 6, entrées 2 et 3, respectivement). Il n'était donc pas possible d'alkyler **ITB₅** avec de la 2-bromoéthylamine sans que ce réactif n'ait été préalablement protégé. La réaction a alors été reproduite mais en utilisant cette fois de la 2-bromoéthylamine protégée par un groupement *tert*-butoxycarbonyle (groupement Boc). Après 4 h à température ambiante, une alkylation partielle a été observée (Tableau 6, entrée 4). Après 4 h à 95 °C, une transformation totale a été obtenue (Tableau 6, entrée 5).



Entrée	Base	Électrophile (5 éq)	Solvant	Température (durée)	Résultats
1	Cs ₂ CO ₃ (2 éq)	Br-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂ , HBr	Acétonitrile	95 °C (24 h)	Pas de produit d'alkylation
2	KOH (3 éq)	Br-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂ , HBr	THF	t.a. (3 h) + 80 °C (15 h)	Pas de produit d'alkylation
3	LiOH, H ₂ O (6,5 éq)	Br-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂ , HBr	THF	t.a. (17 h) + 80 °C (5 h)	Pas de produit d'alkylation
4	Cs ₂ CO ₃ (2 éq)	Br-CH ₂ -CH ₂ -NH-Boc	Acétonitrile	t.a. (4 h)	ITB₅ : 89 % (HPLC) 25 : 11 % (HPLC)
5	Cs ₂ CO ₃ (2 éq)	Br-CH ₂ -CH ₂ -NH-Boc	Acétonitrile	95 °C (4 h)	Produit 25 uniquement

Tableau 6. Récapitulatif des conditions expérimentales testées pour alkyler ITB₅

Les conditions décrites dans l'entrée 5 du Tableau 6 ont permis d'obtenir le composé **25** avec un rendement de 83 % après chromatographie.

L'amine **26** a ensuite été obtenue par déprotection du groupement Boc à 0 °C dans une solution d'acide chlorhydrique à 4 M dans le dioxane (Schéma 9) et après lavages avec une solution de bicarbonate de sodium à 5 % (rendement de 80 %).

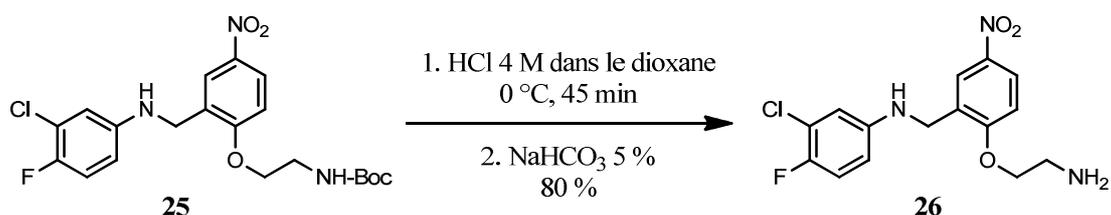


Schéma 9. Réaction de déprotection ayant permis d'obtenir l'amine 26 souhaitée

ii. Ajout du groupement photoactivable par amination réductrice

Comme nous l'avons vu précédemment, le groupement photoactivable sous forme d'aldéhyde (composé **22**) est volatil. Pour éviter de perdre de l'aldéhyde au cours de traitements de purification, nous avons tenté dans un premier temps de déprotéger l'acétal **21** et de réaliser l'amination réductrice entre l'aldéhyde **22** et l'amine **26** en une seule et même étape.

L'acétal **21** et l'amine **26** ont ainsi été rassemblés et mis en présence d'HCl (10 éq) et de triacétoxyborohydrure de sodium (2 éq) (Schéma 10). Après 15 h à température ambiante, la RMN ^1H n'a cependant indiqué la présence que d'amine, d'acétal et d'une très faible quantité d'aldéhyde. L'absence de réaction entre l'amine **26** et le peu d'aldéhyde **22** formé peut être en partie expliquée par la protonation de l'amine dans le milieu fortement acide utilisé, cette protonation réduisant grandement la nucléophilie de l'atome d'azote. L'amination réductrice devait donc être tentée en l'absence d'acide ou en présence de quantités d'acide réduites. La présence d'eau pouvant par ailleurs défavoriser la formation de l'imine, il a été décidé que le mélange acétal/aldéhyde serait finalement traité avant d'être mis en présence de l'amine **26**.

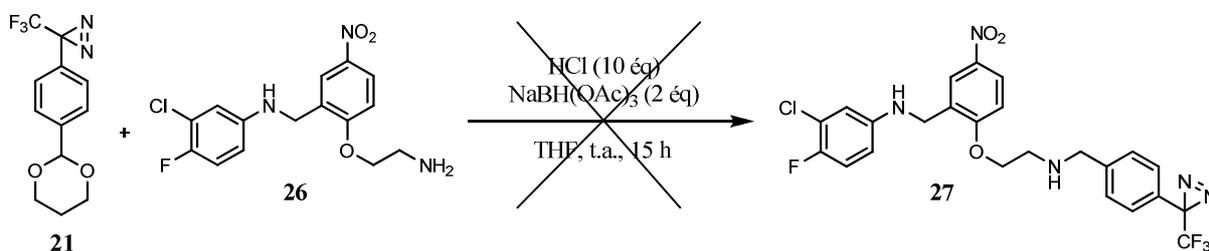


Schéma 10. Tentative de déprotection de l'acétal et de réaction avec l'amine **26** en une seule étape

L'acétal **21** a donc d'abord été déprotégé dans du THF en présence d'Amberlyst 15 et d'eau (Schéma 11). La résine acide a été éliminée par filtration, le 1,3-propanediol par des lavages à l'eau, l'eau résiduelle par séchage sur du Na_2SO_4 anhydre et le solvant par évaporation dans les conditions « douces » décrites p.69. Une fois les proportions d'aldéhyde et d'acétal déterminées par RMN ^1H , le mélange a été ajouté à une solution d'amine **26** (1,2 éq/l'aldéhyde) et de triacétoxyborohydrure de sodium (2 éq/l'aldéhyde). Le produit **27** a ainsi été obtenu, après purification sur colonne, avec un rendement de 63 % pour l'amination réductrice seule et un rendement de 32 % pour l'ensemble des deux réactions.

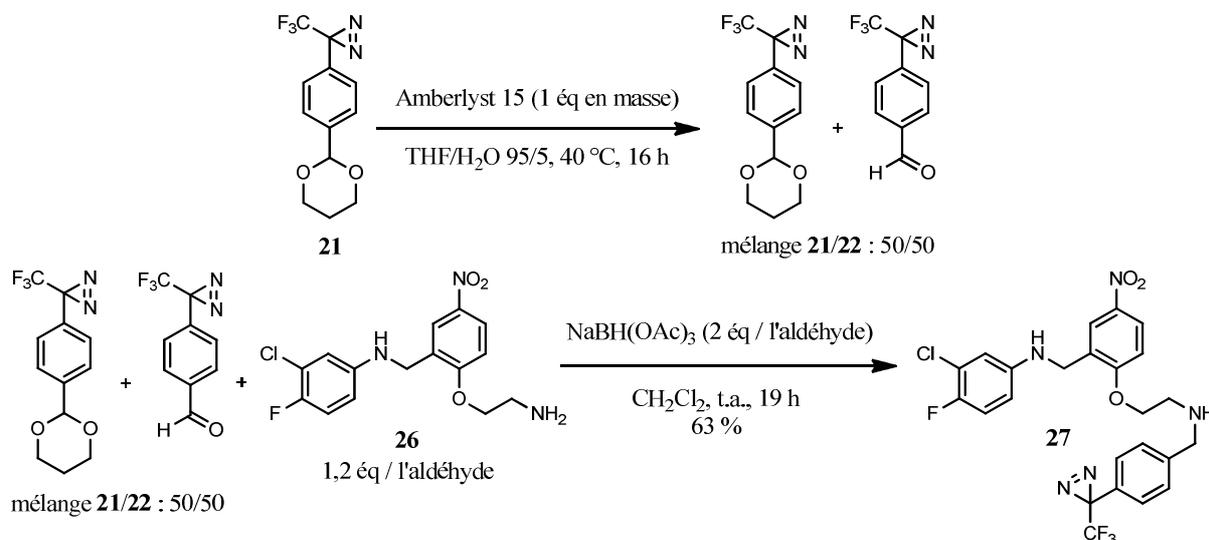


Schéma 11. Synthèse du produit **27**

iii. Ajout du bras biotinylé par couplage peptidique

La dernière étape de la synthèse consistait à additionner au composé **27** le bras biotinylé **24** par couplage peptidique. Un premier essai a été réalisé dans des conditions classiques (DCC dans du THF). Ces conditions n'ont cependant pas permis d'observer la formation de l'amide souhaité (Tableau 7, entrée 1).

Cette absence de réaction peut être expliquée soit par l'utilisation d'un agent de couplage inapproprié, soit par la mauvaise solubilité de l'acide biotinylé dans le THF. Deux essais ont alors été réalisés dans du DMSO avec deux autres agents de couplage : l'hydrochlorure de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC,HCl) et l'hexafluorophosphate de *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium (HATU). Des prélèvements ont été réalisés après 2 h de réaction pour analyse par CLHP-MS. La formation d'**ITB₅-P₁** a été observée dans chaque cas mais des proportions différentes d'amine et d'amide ont été obtenues selon l'agent de couplage utilisé (Tableau 7, entrées 2 et 3).

Entrée	Agent de couplage	Solvant	Temps de réaction	Résultats CLHP-MS (Brut réactionnel)
1	DCC	THF	18 h	Pas de réaction
2	EDC,HCl	DMSO	2 h	27 : 87 % ITB₅-P₁ : 13 %
3	HATU	DMSO	2 h	27 : 61 % ITB₅-P₁ : 39 %

Tableau 7. Proportions d'amine **27 et de sonde **ITB₅-P₁** obtenues selon l'agent de couplage et le temps de réaction**

D'après ces données, l'HATU permet d'obtenir de meilleures proportions d'amide. C'est donc avec cet agent de couplage que l'amine **27** a finalement été couplée à l'acide **24** dans du DMSO (Schéma 12). Un temps de réaction de 40 h et l'ajout de *N,N*-diisopropyléthylamine ont permis d'obtenir la sonde **ITB₅-P₁** avec un rendement de 55 % après chromatographie.

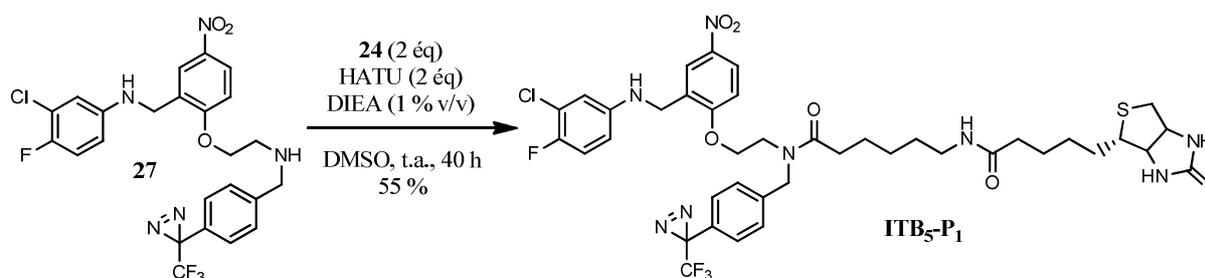


Schéma 12. Couplage peptidique ayant permis d'obtenir la sonde **ITB₅-P₁**

3.2.e) Evaluation de l'activité de la sonde et de ses intermédiaires réactionnels

L'étape suivante a consisté à vérifier si les modifications apportées au composé **ITB₅** ne conduisaient pas à une perte d'activité trop importante. La capacité de la sonde **ITB₅-P₁** à inhiber le transport d'iodure a donc été déterminée grâce au test cellulaire ayant déjà permis de tester les analogues d'**ITB₅** (voir paragraphe 3.1.c) *i*). Le test étant simple à mettre en œuvre, nous avons également testé l'activité de tous les intermédiaires de synthèse. Comme précédemment, les IC₅₀ du perchlorate et d'**ITB₅** ont servi de contrôle positif dans chacune des microplaques et chaque IC₅₀ a été déterminée deux fois avec une semaine d'intervalle entre les deux séries de mesure.

Nous avons obtenu des IC_{50} de 0,07 et 0,1 μM pour le perchlorate et de 0,04 et 0,02 μM pour **ITB₅**. Ces valeurs sont parfaitement cohérentes avec les données de la littérature et avec les résultats obtenus lors de la mise au point du test cellulaire. Les résultats obtenus pour la sonde **ITB₅-P₁** et ses intermédiaires de synthèse sont indiqués et comparés à ceux d'**ITB₅** dans le Tableau 8.

Molécule	IC_{50} (μM) 1 ^{ère} série	IC_{50} (μM) 2 ^e série
ITB₅ 	0,04	0,02
25 	0,3	1
26 	2	1
27 	0,5	0,9
ITB₅-P₁ 	0,9	0,9

Tableau 8. Valeurs d' IC_{50} obtenues sur cellules FRTL-5 pour **ITB₅, la sonde **ITB₅-P₁** et les intermédiaires réactionnels de la sonde**

Les résultats obtenus montrent que les composés **25**, **27** et **ITB₅-P₁** ont une activité 7 à 50 fois inférieure à celle d'**ITB₅** tandis que le composé **26** présente une activité entre 25 et 100 fois plus faible que celle de l'inhibiteur de départ.

D'après ces résultats, l'alkylation d'**ITB₅** par une *N*-boc-2-bromoéthylamine a plus d'influence sur l'activité du composé que l'alkylation par un simple méthyl (composé **14**, IC_{50} = 20 nM). Il est difficile d'expliquer ce résultat sans avoir davantage d'informations sur le devenir d'**ITB₅** au sein d'un milieu cellulaire. Une première explication possible est que l'encombrement stérique ait conduit à une diminution d'affinité pour la cible. L'introduction de la fonction carbamate ne modifie cependant pas que la taille de la molécule. Un certain nombre de caractéristiques physico-chimiques, tels que l'hydrophilie ou la répartition des charges, sont également affectées. Or, si ces caractéristiques peuvent influencer l'affinité du composé pour sa cible, elles peuvent aussi agir sur d'autres paramètres tels que la traversée des membranes par exemple. De nombreuses explications sont donc possibles.

La diminution d'activité légèrement plus importante observée pour le composé **26** est certainement attribuable à la protonation de l'amine primaire dans les milieux biologiques

utilisés. Les molécules chargées sont en effet connues pour traverser moins facilement les membranes (à moins d'être prises en charge par un transporteur). La présence d'un ammonium peut donc avoir limité la quantité d'inhibiteur atteignant effectivement la protéine cible, d'où la nécessité d'utiliser davantage de produit pour obtenir un même effet.

Les résultats que nous avons obtenus pour la sonde **ITB₅-P₁** ($IC_{50} = 0,9 \mu M$) montrent que ce composé est bien actif et que son activité, bien que diminuée d'un facteur 20 à 45 par rapport à **ITB₅**, reste suffisante pour des expériences de photomarquage d'affinité.

3.3. Photomarquage de la protéine cible

Les expériences de photomarquage ont consisté à incuber puis à irradier à 365 nm des cellules FRTL-5 en présence de la sonde **ITB₅-P₁** (Figure 32). Cette irradiation permet de créer une liaison covalente entre la sonde et la protéine cible d'**ITB₅**, cela revenant à étiqueter la protéine avec une molécule de Biotine pour qu'elle puisse être visualisée en Western-blot à l'aide de Streptavidine-HRP. Afin de distinguer la protéine marquée spécifiquement par la sonde, des expériences contrôles ont également été réalisées en absence d'irradiation, en absence de sonde et en présence de compétiteur (**ITB₅**). Lorsqu'une sonde conduit au marquage spécifique d'une protéine, la bande correspondante n'est en effet pas visualisée dans ces dernières conditions (Figure 32).

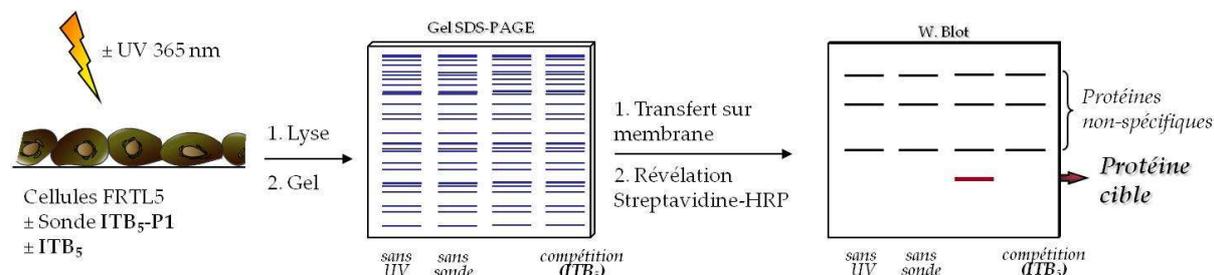


Figure 32. Représentation schématique des expériences de photomarquage

3.3.a) Optimisations préliminaires

Une première série d'expériences a consisté à optimiser les conditions de culture cellulaire, de lyse, d'électrophorèse et de Western-blot pour pouvoir détecter la protéine photomarkée par la sonde **ITB₅-P₁**.

i. Culture cellulaire et protocole de lyse

Les cellules destinées aux expériences de photomarquage ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri, ces boîtes s'étant avérées être le support de culture le mieux adapté à la lampe UV dont nous disposons. Nos premières expériences ont consisté à déterminer les conditions de culture et de lyse permettant d'obtenir un maximum de protéines par boîte de Pétri. Si la protéine cible était peu abondante, travailler avec de grandes quantités de protéines augmentait les chances de la détecter et obtenir cette quantité de protéines à partir d'un minimum de boîtes permettait de gagner un temps précieux lors des opérations de culture cellulaire et de photomarquage.

Dans une première expérience, des boîtes de Pétri ont étéensemencées avec 2, 4 ou 8 millions de cellules. A J+4, les cellules présentes dans chacune des boîtes ont été récupérées puis lysées grâce à une incubation de 30 min, à 4 °C, dans 100 µL d'un tampon de lyse à base de sodium dodécylsulfate (SDS) et de Triton (Protocole de lyse n°1). La deuxième expérience a été réalisée à l'aide d'une boîte de Pétriensemencée avec 10 millions de cellules. Dans ce cas, les cellules ont été récupérées à J+3 puis lysées à 4 °C pendant 1 h dans 200 µL de

tampon de lyse avec 10 s de vortex toutes les 20 min (Protocole de lyse n°2). A la fin de chaque lyse, les surnageant (S₂, S₄, S₈ et S₁₀) et les culots membranaires (C₂, C₄, C₈ et C₁₀) ont été séparés et les culots resuspendus dans du tampon de lyse afin de déterminer la proportion de protéines solubilisées dans les conditions testées. Les quantités de protéines contenues dans chaque échantillon ont été déterminées par dosage à l'acide bicinchoninique, une méthode connue pour sa grande sensibilité (jusqu'à 0,5 µg/mL) et pour sa tolérance à la présence de détergents (Tableau 9).

	Echantillons	Concentration de protéines (µg/µL)	Proportion de protéines solubilisées
Lysats obtenus à J+4 (100 µL)	S ₂	5,00	<u>77 %</u>
	C ₂	1,53	
	S ₄	6,76	<u>75 %</u>
	C ₄	2,31	
	S ₈	11,54	<u>79 %</u>
	C ₈	3,15	
Lysats obtenus à J+3 (200 µL)	S ₁₀	9,83	<u>78 %</u>
	C ₁₀	5,59	

Tableau 9. Quantités de protéines obtenues selon le nombre de cellulesensemencées et selon le protocole de lyse utilisé. (S = surnageant, C = culot)

Les concentrations en protéines des surnageants S₈ et S₁₀ sont toutes les deux intéressantes puisqu'elles permettent de déposer sur gel jusqu'à 276 et 235 µg, respectivement (pour un volume d'échantillon déposable de 24 µL maximum). On peut par ailleurs constater que les deux protocoles de lyse sont aussi efficaces l'un que l'autre puisqu'ils ont conduit à la solubilisation d'une même proportion de protéines (79 et 78 %). Il n'y a donc pas d'avantage à utiliser l'un plutôt que l'autre. Ensemencer les boîtes de Pétri avec 10 millions de cellules et lyser ces cellules à J+3 a par contre permis d'obtenir plus rapidement une quantité de cellules plus importante (1966 µg / 1154 µg). Nous avons donc finalement décidé que les boîtes de Pétri seraientensemencées avec 10 millions de cellules et que ces cellules seraient lysées à J+3 selon le protocole de lyse n°2 décrit ci-dessus.

ii. Quantité de protéines à déposer sur gel SDS-PAGE

Déposer sur gel un maximum de protéines permettait d'augmenter les chances de détecter la protéine marquée mais déposer trop de protéines pouvait conduire à diminuer la résolution du gel. Afin de déterminer la quantité de protéines à déposer, une gamme d'échantillons contenant entre 25 et 100 µg de protéines a été préparée à partir d'une boîte de Pétri traitée à J+3 selon le protocole de lyse défini précédemment. Les protéines présentes dans ces échantillons ont été séparées sur un gel SDS-PAGE à 12 %. Une fois la migration terminée, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF qui a ensuite été colorée au Bleu de Coomassie, une coloration permettant de détecter jusqu'à 0,1 µg de protéines (Figure 33). Ce transfert a été réalisé afin de vérifier que le protocole indiqué dans le manuel d'utilisation du Mini Trans-Blot[®] (Bio-Rad) permettait bien de transférer l'ensemble des protéines présentes dans le gel.

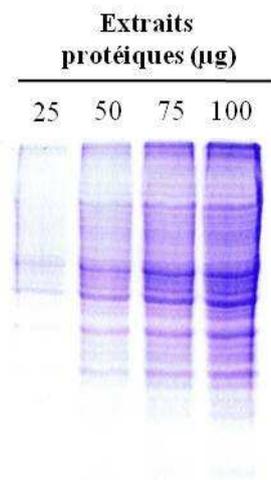


Figure 33. Gamme massique d'extraits protéiques obtenus à partir de cellules FRTL-5 (scan de membrane PVDF colorée au bleu de Coomassie)

Les profils obtenus indiquent que la quantité maximale de protéines qui peut être déposée tout en conservant une bonne résolution est de 75 µg. Une trainée est en effet déjà observée pour l'échantillon contenant 100 µg de protéines. Les expériences de photomarquage ont donc toutes été analysées sur 75 µg d'extraits cellulaires maximum.

iii. Quantité de Streptavidine-HRP à utiliser en Western-blot

Comme nous l'avons vu précédemment, les expériences de photomarquage sont analysées après migration des protéines sur un gel SDS-PAGE et transfert de ces protéines sur une membrane PVDF. Les membranes sont révélées dans notre cas à l'aide de Streptavidine couplée à une enzyme appelée « horseradish peroxidase » (HRP). Cette enzyme peut catalyser l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène du luminol en 3-aminophtalate. La réaction produit un signal lumineux qui permet de localiser les protéines biotinylées sur lesquelles la Streptavidine s'est fixée, que ces protéines soient biotinylées naturellement ou qu'elles le soient suite aux expériences de marquage.

L'objectif de cette expérience était de déterminer la concentration de Streptavidine-HRP qui devait être utilisée pour détecter la protéine photomarkuée tout en détectant un minimum de protéines de manière non spécifique. Dans cette perspective, 1 boîte de cellules a été incubée 10 min en présence de 5 µM de sonde avant d'être irradiée à 365 nm pendant 10 min (valeurs moyennes des gammes de temps d'irradiation et de concentration de sonde que nous souhaitions tester ultérieurement). Une fois les cellules lysées, trois échantillons de 75 µg de protéines ont été prélevés puis séparés sur un gel SDS-PAGE à 12 %. Afin de distinguer la protéine marquée par la sonde des protéines reconnues non spécifiquement par la Streptavidine-HRP, 3 échantillons de protéines provenant de cellules non irradiées ont également été déposés sur ce gel. Les résultats de ces expériences ont ensuite été analysés en Western-blot en utilisant une solution de Streptavidine-HRP à 1 mg/mL diluée soit par 1 000, soit par 8 000, soit par 15 000 (Figure 34).

3 bandes importantes ont été observées dans chacune des pistes, que les échantillons aient été photomarkués (pistes 1, 3 et 5) ou non (pistes 2, 4 et 6). Etant donné qu'aucune bande d'intensité importante n'a pu être observée dans cette région en gel coloré au Bleu de Coomassie, il est peu probable que ces protéines aient été reconnues du fait de leur abondance. Elles correspondent donc sans doute à des protéines naturellement biotinylées.

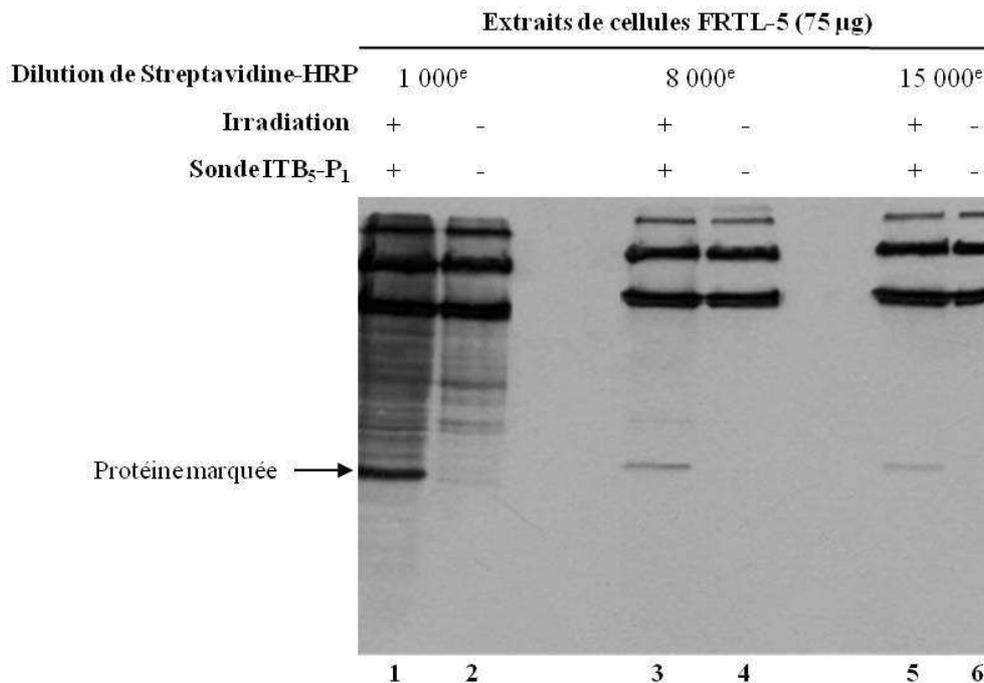


Figure 34. Premiers essais de photomarquage à 365 nm (± 10 min, ± 5 µM d'ITB₅-P₁).
 Membranes PVDF révélées avec différentes dilutions d'une solution de Streptavidine-HRP à 1 mg/mL.

Une autre bande a été observée. Cette bande n'est visible qu'en présence d'irradiation et son intensité augmente dans les mêmes proportions que la concentration de Streptavidine-HRP (pistes 2, 4 et 6), deux arguments permettant de penser que cette bande correspond à la protéine marquée spécifiquement par la sonde **ITB₅-P₁**. D'après le film obtenu, une dilution au 8 000^e permet de limiter le bruit de fond aux 3 bandes évoquées précédemment mais donne une intensité de signal relativement faible pour la protéine d'intérêt tandis qu'une dilution au 1 000^e conduit à la fois à une intensité de signal intéressante et à la visualisation non spécifique de nombreuses protéines. Afin d'obtenir le meilleur rapport signal sur bruit, nous avons décidé de nous placer entre ces deux conditions et avons donc utilisé une dilution au 4 000^e lors des expériences suivantes.

3.3.b) Optimisation des conditions de photomarquage

Les expériences d'optimisation préliminaires ont permis de définir des conditions qui ont conduit à la détection d'une protéine photomarkée par la sonde **ITB₅-P₁**. Une deuxième série d'expériences a été réalisée afin de confirmer la spécificité du marquage et de déterminer les conditions d'irradiation permettant de marquer à la fois un maximum de protéine cible et un minimum de protéines non spécifiques.

i. Concentration de sonde

Afin de déterminer la concentration de sonde à utiliser pour marquer un maximum de protéine cible tout en marquant un minimum de protéines non spécifiques, des cellules ont été incubées 10 min en présence de 0, 0,5, 5 ou 50 µM de sonde avant d'être irradiées 10 min à 365 nm. 75 µg de protéines provenant de chacune de ces conditions ont été séparés sur un gel SDS-PAGE à 12 % puis analysés en Western-blot (Figure 35).

La comparaison des signaux obtenus pour la bande d'intérêt (bande A) dans les différentes conditions testées indique que la protéine n'est pas marquée en absence de sonde (piste 1) et que la quantité de protéine marquée augmente avec la concentration de sonde jusqu'à une concentration de 5 µM (pistes 2 et 3). Ces deux résultats suggèrent que la bande A correspond à une protéine marquée de manière spécifique par la sonde **ITB₅-P₁**. La comparaison des

pistes 3 et 4 a par contre permis de constater qu'une concentration de sonde de 50 μM ne permet pas d'augmenter la quantité de protéine marquée et qu'utiliser des concentrations supérieures à 5 μM ne conduit finalement qu'à augmenter le bruit de fond. L'ensemble de ces résultats nous a amenés à choisir une concentration d'**ITB₅-P₁** de 5 μM pour l'ensemble des expériences de photomarquage.

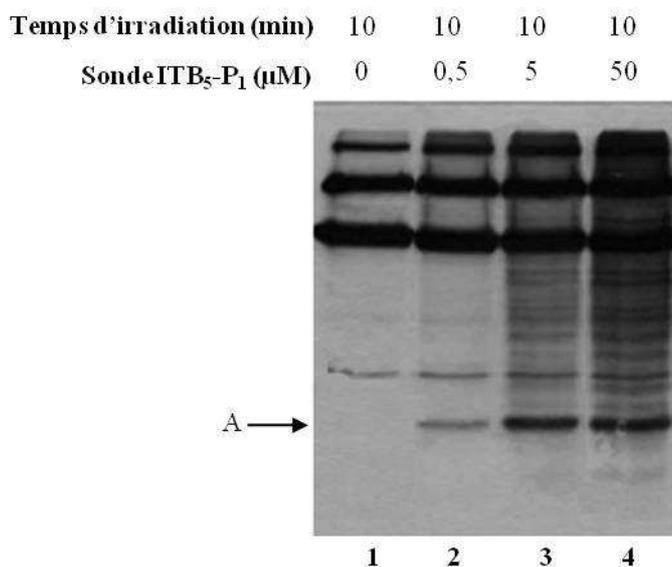


Figure 35. Film photo obtenu après irradiation de cellules 10 min en présence de différentes concentrations de sonde. 75 μg de protéines ont été déposés pour chacune des conditions. (la flèche indique la position de la bande d'intérêt A correspondant à la protéine marquée)

ii. Temps d'irradiation et expériences de compétition

L'effet du temps d'irradiation sur la quantité de protéine marquée a également été évalué. Après une incubation de 10 min en présence de 5 μM de sonde, les cellules ont été irradiées à 365 nm pendant 0, 4, 10 ou 20 min. Comme précédemment, 75 μg de protéines ont été prélevés dans chaque cas pour être analysés en Western-blot. La Figure 36 montre l'intensité de signal obtenue au niveau de la bande d'intérêt pour chacune de ces expériences.

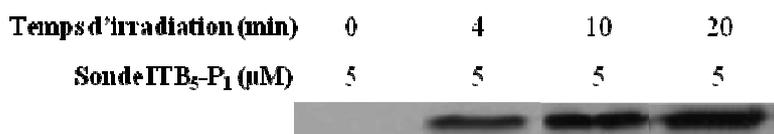


Figure 36. Signal obtenu au niveau de la bande d'intérêt en fonction du temps d'irradiation. 75 μg de protéines ont été déposés pour chacune des conditions.

Les résultats obtenus indiquent que la quantité de protéine marquée augmente de manière importante lorsque le temps d'irradiation est porté de 4 à 10 min puis plus discrètement lorsque ce temps est porté à 20 min. Ils montrent également que la protéine n'est marquée que si les cellules sont irradiées. Ces résultats tendent donc à montrer, comme les expériences précédentes, que la bande d'intérêt correspond à la protéine marquée spécifiquement par la sonde **ITB₅-P₁**. Etant donné la similarité des résultats obtenus après 10 et 20 min, le temps d'irradiation a été fixé dans un premier temps à 10 min. Cela permettait en effet d'augmenter le nombre d'expériences pouvant être réalisées dans une journée.

Des expériences de compétition ont ensuite été menées afin de confirmer l'identité entre la protéine photomarkée par la sonde **ITB₅-P₁** et la protéine reconnue par l'inhibiteur **ITB₅** et ainsi de conclure quant à la spécificité du marquage. Ces expériences ont consisté à préincuber les cellules 10 min avec une quantité d'**ITB₅** 50 fois supérieure à celle de la sonde

avant d'ajouter 5 μM de sonde **ITB₅-P₁** pour 10 min d'incubation supplémentaires. Une fois l'incubation terminée, les cellules ont été irradiées pendant 4, 10 ou 20 min en présence des deux composés. Les profils obtenus en Western-blot avec un temps d'irradiation de 20 min étant identiques à ceux obtenus avec un temps de 10 min, seuls les résultats obtenus en utilisant des temps de 4 et 10 min sont présentés ici (Figure 37).

Temps d'irradiation (min)	4	4	10	10
Compétiteur ITB ₅ (250 μM)	-	+	-	+
Sonde ITB ₅ -P ₁ (5 μM)	+	+	+	+

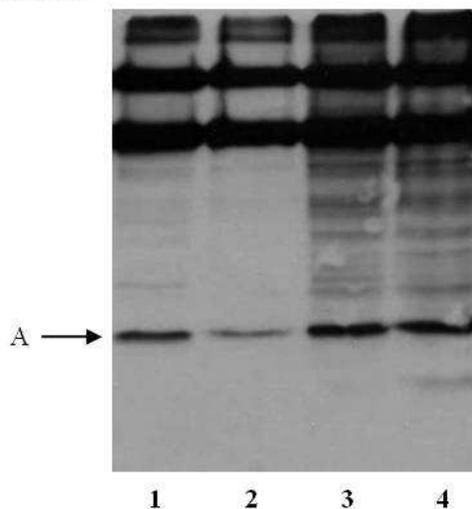


Figure 37. Résultats obtenus lors des expériences de compétition réalisées avec la sonde ITB₅-P₁ et l'inhibiteur ITB₅. 75 μg de protéines ont été déposés pour chacune des conditions. (la flèche indique la position de la protéine photomarkuée)

Dans le cas des expériences menées avec un temps d'irradiation de 4 min (pistes 1 et 2), une nette diminution d'intensité de la bande d'intérêt (bande A) a été observée en présence d'un excès d'**ITB₅**, ce qui permet de conclure que la révélation de la bande A est issue du marquage spécifique d'une protéine par la sonde **ITB₅-P₁**.

Le même résultat n'a cependant pas été obtenu lorsque les cellules ont été irradiées pendant des durées de 10 (pistes 3 et 4) ou 20 min. Ce résultat est assez surprenant compte-tenu des quantités d'inhibiteur que nous avons utilisées et de l'efficacité de l'inhibiteur (environ 20 fois supérieure à celle de la sonde). Dans les systèmes complexes tels que les cellules, une plus grande efficacité (IC_{50}) n'est toutefois pas toujours révélatrice d'une plus grande affinité pour la cible (Kd). D'autres paramètres tels qu'une facilité à traverser les membranes ou une stabilité métabolique plus importante peuvent aussi conduire un composé peu affiné à être plus efficace. Ce résultat peut aussi être expliqué par la relative inégalité de la compétition au cours de l'irradiation. En effet, si la sonde peut déplacer l'inhibiteur lié à la cible de manière réversible, l'inverse (normalement favorisé par l'excès d'inhibiteur) n'est vrai que si le carbène n'a pas eu le temps de se former à partir de la diazine présente sur la sonde et si la sonde n'est par conséquent pas encore fixée de manière covalente à la protéine cible. On peut donc supposer que plus le temps de photomarquage augmente, plus la proportion de sites occupés puis marqués par la sonde augmente, un temps d'irradiation important pouvant alors conduire à une quantité de marquage similaire en présence et en absence de compétiteur.

Il était important en tous les cas de se placer dans des conditions où l'expérience de compétition permettait de différencier la cible d'**ITB₅** des protéines marquées non spécifiquement par la sonde ou des protéines isolées de manière non spécifique lors de l'étape de capture sur billes. Le temps d'irradiation a donc finalement été fixé à 4 min.

3.3.c) Tentative de photomarquage sur lysats

Suite aux expériences de photomarquage sur cellules décrites ci-dessus, nous avons souhaité évaluer la possibilité de marquer la protéine cible d'**ITB₅** au sein de lysats cellulaires. Nous tenions dans un premier temps à réaliser nos expériences de photomarquage sur des cellules entières parce qu'il y avait une chance pour que la protéine cible soit membranaire. L'utilisation de lysats offrait toutefois la possibilité de travailler avec des échantillons plus concentrés en protéines et d'utiliser une quantité moins importante de sonde, ce qui permettait d'augmenter la spécificité du marquage.

Dans cette perspective, les cellules d'une boîte de Pétri ont été traitées en suivant le protocole de lyse décrit précédemment mais en utilisant cette fois un tampon à base de Nonidet P-40, un détergent « doux » qui permet de préserver au maximum la conformation des protéines solubilisées. 600 µg de protéines ont ensuite été placés dans l'un des puits d'une microplaque 12 puits et incubés 10 min avec 5 µM d'**ITB₅-P₁**. Les protéines ont été irradiées 4 min à 365 nm puis 24 µg ont été prélevés pour une analyse en Western-blot (Figure 38, piste 3). La même expérience a également été réalisée en absence de sonde et en présence de compétiteur (Figure 38, pistes 2 et 4 respectivement). A titre de comparaison, 24 µg de protéines provenant de cellules irradiées en présence de la sonde **ITB₅-P₁** ont également été déposés sur le gel (Figure 38, piste 1).

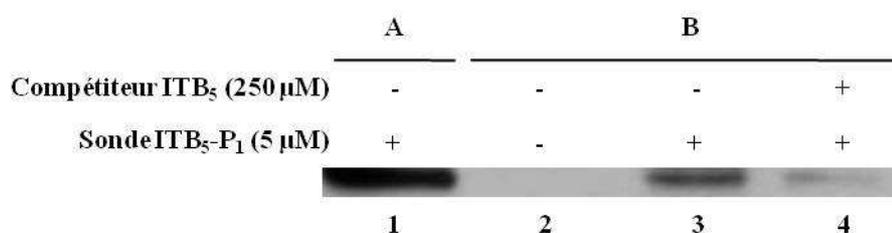


Figure 38. Signal obtenu au niveau de la bande d'intérêt après irradiation de cellules vivantes (A) ou de lysats cellulaires (B). Les échantillons ont été irradiés pendant 4 min en absence ou présence de sonde et en absence ou présence de compétiteur.

L'irradiation d'un lysat cellulaire en présence de sonde (piste 3) a permis comme précédemment de marquer spécifiquement une protéine : la bande correspondante n'est en effet pas visible en absence de sonde (piste 2) et l'est beaucoup plus discrètement en présence de compétiteur (piste 4). Cette bande est située au même niveau que la bande observée lors des expériences de photomarquage sur cellules (piste 1) : la protéine marquée dans les deux cas est donc très probablement la même. L'efficacité de marquage obtenue sur lysat est cependant nettement moindre que celle obtenue sur cellules entières. Dans notre cas, il était donc préférable d'isoler la protéine cible après l'avoir marquée au sein de cellules vivantes.

Il était intéressant d'avoir pu observer cette différence. Si la protéine est moins accessible une fois les cellules lysées, on peut en effet émettre l'hypothèse que sa structure a été altérée lors de l'étape de lyse. Or, ce type d'altérations est fréquemment observé dans le cas des protéines membranaires, qu'elles soient situées sur la membrane plasmique ou sur la membrane d'organites intracellulaires (réticulum endoplasmique, mitochondrie...). Bien que l'observation faite ici ne permettait pas d'affirmer que la protéine marquée était effectivement membranaire, elle pouvait tout de même servir d'argument pour confirmer ou mettre en doute les résultats obtenus lors des expériences d'identification.

3.3.d) Conclusion

Les différentes expériences d'optimisation réalisées ont permis de définir des conditions expérimentales conduisant à la détection, en Western-blot, d'une quantité importante de protéine marquée et d'une quantité minimum de protéines non spécifiques :

- Nombre de cellules à ensemercer par boîte de Pétri : 10 millions
- Jour de photomarquage : J+3
- Matériel irradié : cellules vivantes
- Concentration de sonde : 5 μM
- Temps d'incubation des cellules avec la sonde : 10 min
- Temps d'irradiation à 365 nm : 4 min
- Conditions de lyse : 200 μL de tampon, 1 h d'incubation, vortex toutes les 20 min
- Quantité de protéines déposée sur gel : 75 μg
- Solution de Streptavidine-HRP : solution à 1 mg/mL diluée 4 000 fois

Les expériences de photomarquage ont montré que la quantité de protéine marquée est d'autant plus importante que le temps d'irradiation et la concentration de sonde sont importants. Le marquage de cette protéine n'est par ailleurs visible en Western-blot que si la sonde est présente et si les cellules sont irradiées à 365 nm et l'intensité de la bande correspondante est fortement diminuée en présence du compétiteur **ITB₅**. L'ensemble de ces résultats nous a conduit à conclure que la sonde **ITB₅-P₁** permet de marquer spécifiquement la protéine cible du composé **ITB₅**.

3.4. Isolement de la protéine photomarquée

Les conditions de photomarquage étant mises au point, nous sommes passés à l'étape suivante qui consistait à extraire des lysats cellulaires la protéine biotinylée suite au photomarquage (Figure 39). A cette fin, des lysats protéiques issus de cellules irradiées ont été incubés avec des billes d'agarose fonctionnalisées. La Streptavidine présentant une affinité plus forte que l'Avidine pour la Biotine ($K_d \sim 10^{-15} \text{ M}$ / $K_d \sim 10^{-10} \text{ M}$) et étant donné qu'elle forme moins de liaisons non spécifiques, nous avons utilisé préférentiellement des billes fonctionnalisées par de la Streptavidine. Les protéines retenues par ces billes ont ensuite été éluées puis séparées sur un gel SDS-PAGE. L'objectif principal était de définir les conditions expérimentales permettant d'obtenir un gel suffisamment propre pour que la bande d'intérêt puisse être clairement visualisée. En attendant d'obtenir de telles conditions, toutes les expériences ont été analysées par Western-blot.

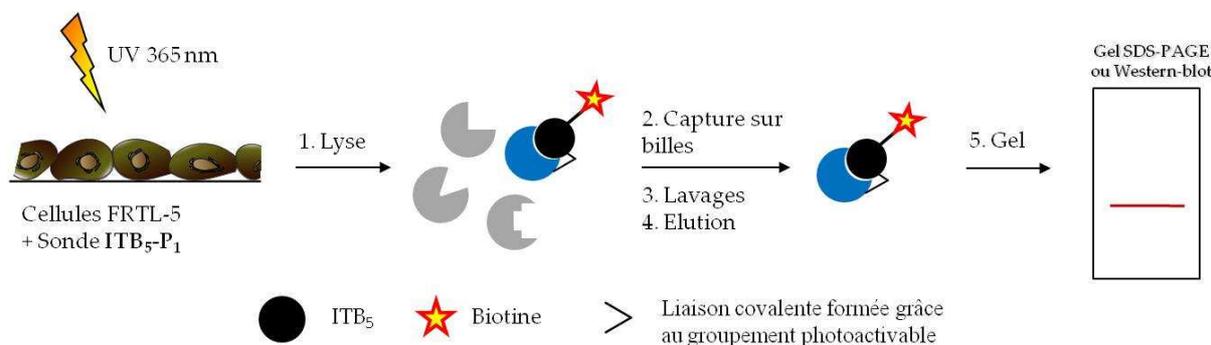


Figure 39. Représentation schématique des expériences de capture

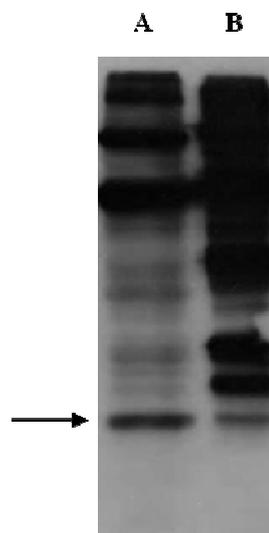
3.4.a) Premier essai de capture sur billes de la protéine photomarkée

Les conditions d'incubation des lysats cellulaires avec les billes d'agarose-Streptavidine ainsi que les protocoles de lavages et d'éluion ont été définis, pour ce premier essai, en s'inspirant des travaux d'Ishii¹⁷. 500 µg de protéines, issues de cellules irradiées en présence de sonde, ont ainsi été incubés pendant une nuit à 4 °C avec 25 µL d'une résine commerciale (Pierce, 20347) contenant 12,5 µL de billes d'agarose-Streptavidine. Ce volume de billes permet de capter entre 2 et 6 nmol de protéine biotinylée, ce qui peut paraître peu comparé à la quantité de sonde utilisée pour photomarquer la protéine cible (50 nmol). Etant donné que seule une petite partie de la sonde se fixe réellement sur une protéine et qu'une majeure partie de la sonde restée libre est éliminée par retrait du surnageant avant l'étape de lyse, nous avons toutefois estimé que cette quantité de billes pouvait être suffisante pour capter l'ensemble des protéines marquées.

Une fois l'incubation terminée, les billes ont été lavées dans des volumes décroissants de tampon de lyse et les protéines en interaction non covalente avec les billes ont été éluées grâce à une incubation de 20 min à 80 °C dans du Laemmli (tampon réducteur contenant 2 % de SDS). Les protéines du surnageant obtenu après centrifugation ont été déposées sur un gel SDS-PAGE à 12 % et analysées en Western-blot (Figure 40).

Figure 40. Comparaison des profils protéiques obtenus en Western-blot avant et après capture sur billes d'agarose-Streptavidine
(la flèche indique la position de la protéine photomarkée)

A) Avant capture : profil correspondant à 75 µg de protéines issues de cellules irradiées en présence de la sonde **ITB₅-P₁**
B) Après capture : profil obtenu après incubation avec 12,5 µL de billes de 500 µg de protéines issues de cellules irradiées en présence de la sonde **ITB₅-P₁**.



L'analyse du film obtenu montre que de nombreuses protéines ont été retenues de manière non spécifiques par les billes (piste B). Parmi elles se trouvent les trois protéines déjà observées avant capture (comparaison piste A/piste B), ce qui n'est guère surprenant si ces protéines sont effectivement biotinylées de manière endogène. Quant aux bandes apparues après traitement par les billes, elles correspondent sans doute à des protéines possédant une affinité pour l'agarose lui-même, les lavages effectués ici n'ayant visiblement pas été suffisants pour que ces protéines soient éliminées. D'autres conditions expérimentales devaient donc être recherchées afin de limiter la fixation de ces protéines sur les billes ou de les décrocher plus efficacement.

La bande d'intérêt, quant à elle, a été observée à la fois avant (piste A) et après (piste B) l'expérience de capture sur billes. L'intensité de la bande présente dans la piste B est cependant étonnamment faible. En effet, cette bande correspond à l'extraction de la protéine d'intérêt depuis 500 µg de protéines totales alors que la bande de la piste A correspond à la quantité de cible présente dans seulement 75 µg de protéines totales. Nous nous attendions donc à obtenir une intensité de signal 6 à 7 fois plus importante dans la piste B que dans la piste A. Nous avons envisagé trois explications à l'isolement d'une si faible quantité de protéine cible. 1) La protéine d'intérêt était dégradée au cours de l'incubation du lysat avec les billes dans les conditions utilisées (1 nuit à 4 °C). 2) La quantité de billes nécessaire à la

capture de la protéine photomarkée était insuffisante. 3) La protéine n'était pas décrochée de la matrice efficacement soit parce que les conditions utilisées n'étaient pas suffisantes pour rompre l'interaction entre la protéine cible biotinylée et la Streptavidine, soit parce que la présence de nombreuses protéines non spécifiques limitait l'accès du Laemmlli à la protéine cible.

3.4.b) Augmentation du rapport protéine spécifique / protéines non spécifiques

La première expérience de capture sur billes a mis en évidence deux obstacles à l'obtention d'un gel permettant de visualiser clairement la protéine cible : la fixation d'une quantité importante de protéines non spécifiques sur les billes d'agarose-Streptavidine et l'isolement d'une très faible quantité de protéine cible. Différentes expériences ont donc été envisagées dans le but d'augmenter le rapport protéine spécifique / protéines non spécifiques obtenu après élution. Les deux premières ont consisté à contrôler la stabilité de la protéine d'intérêt et à vérifier si la quantité de billes utilisée était suffisante pour capter toutes les protéines cibles photomarkées. Quant aux expériences suivantes, elles ont eu pour but de réduire la quantité de protéines non spécifiques se fixant sur les billes et d'optimiser les conditions d'élution.

i. Contrôle de la stabilité de la protéine

Nous avons commencé par vérifier si la protéine était stable dans les conditions utilisées lors de l'incubation des lysats avec les billes d'agarose-Streptavidine. L'expérience a été menée sur un lysat contenant 1 mg de protéines issues de cellules irradiées en présence de sonde. Un prélèvement représentant 3 % de ce lysat a été réalisé puis le reste du surnageant a été conservé 1 nuit à 4 °C. Un deuxième prélèvement, de 3 % également, a alors été effectué et les deux échantillons ont été déposés sur un gel SDS-PAGE à 12 % pour être analysés en Western-blot (Figure 41).

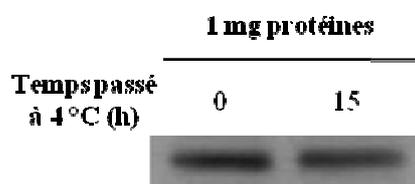


Figure 41. Contrôle de la stabilité de la protéine après 1 nuit à 4 °C

L'intensité de la bande correspondant au deuxième prélèvement (après 15 h à 4 °C) apparaît plus faible que celle de la bande correspondant au premier prélèvement mais cette différence reste très discrète et ne justifie pas le faible rendement obtenu suite à l'expérience de capture. La protéine d'intérêt était donc stable dans les conditions d'incubation utilisées. Puisque nous avons obtenu des intensités similaires, nous avons également pu conclure de cette expérience que la faible intensité observée pour la bande d'intérêt Figure 40, piste B n'était pas liée à une perte de l'étiquette Biotine au cours de l'incubation des protéines avec les billes.

ii. Contrôle de la capture

Nous avons ensuite vérifié si la quantité de billes utilisée (12,5 µL) était suffisante pour capter l'ensemble des protéines photomarkées par la sonde **ITB₅-P₁**. Pour ce faire, 8 % d'un lysat contenant 500 µg de protéines ont été prélevés ainsi que 8 % du surnageant récupéré après que ce lysat ait été incubé avec 12,5 µL de billes. Les prélèvements ont été déposés sur un gel SDS-PAGE à 12 % et ont été analysés en Western-blot (Figure 42).

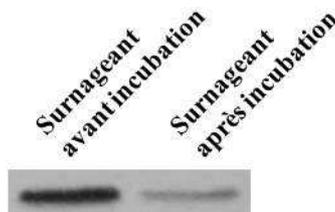


Figure 42. Vérification de l'efficacité de capture de la protéine cible.

Surnageant avant incubation : prélèvement de 40 μL effectué sur un lysat contenant 500 μg de protéines.

Surnageant après incubation : prélèvement de 40 μL effectué sur le surnageant obtenu après incubation du lysat avec 12,5 μL de billes.

Les résultats obtenus montrent que près de 90 % de la protéine cible photomarquée sont captés par les 12,5 μL de billes utilisés. Seulement 10 % environ du signal observé avant incubation sont en effet retrouvés dans le surnageant après incubation qui contient les protéines non retenues par les billes. L'efficacité de la capture n'était donc pas plus en cause que la stabilité de la protéine dans l'obtention de très faibles quantités de protéine cible après élution. Nous en avons conclu que c'était l'efficacité de l'élution qui posait problème. Des expériences devaient donc être menées afin de trouver des conditions permettant de décrocher plus efficacement la protéine cible des billes d'agarose-Streptavidine.

Avant de réaliser ces expériences, nous avons souhaité savoir si l'utilisation d'une quantité de billes plus importante permettrait de capter les 10 % de protéine perdus dans le surnageant après incubation et si cela aurait un impact significatif sur la quantité de protéine cible isolée grâce à l'expérience de capture. Dans cette perspective, 500 μg de protéines issues de cellules irradiées en présence de sonde ont été incubés soit avec 12,5 μL , soit avec 37,5 μL de billes. Le film photo présenté Figure 43 montre le signal obtenu pour la bande d'intérêt une fois les billes lavées et les protéines éluées dans du Laemmli à 80 $^{\circ}\text{C}$.

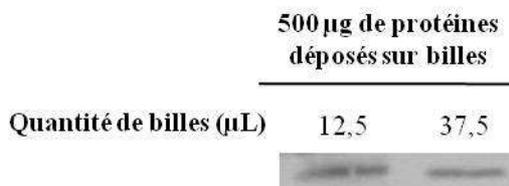


Figure 43. Effet de la quantité de billes sur la quantité de protéine cible récupérée après élution.

L'augmentation de la quantité de billes n'a pas permis d'augmenter significativement la quantité de protéine cible récupérée suite à l'expérience de capture : l'intensité des bandes obtenues après élution est en effet très similaire dans les deux conditions testées. Nous avons donc décidé de conserver un volume de billes de 12,5 μL pour réaliser les expériences visant à améliorer l'efficacité de l'élution.

iii. Préincubation du lysat avec des billes d'agarose-Streptavidine

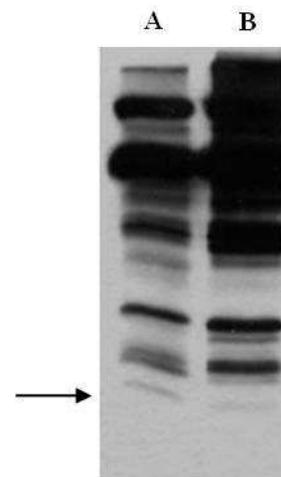
Comme nous l'avons vu précédemment, la présence de nombreuses protéines captées de manière non spécifique par les billes posait deux problèmes : 1) certaines de ces protéines pouvaient empêcher de visualiser la bande d'intérêt sur des gels colorés au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent et 2) l'accès du Laemmli à la protéine cible pouvait être limité, d'où une efficacité d'élution réduite. Nous avons donc préincubé des lysats cellulaires avec des billes d'agarose-Streptavidine dans le but d'appauvrir ces lysats en protéines se fixant de manière non spécifique aux billes. Dans l'hypothèse où ces protéines étaient les premières à se fixer, nous espérons qu'une incubation de courte durée permettrait de ne capter que ces protéines, la protéine d'intérêt étant capturée dans un deuxième temps lors de l'incubation des lysats avec un deuxième lot de billes.

Afin de le vérifier, 500 µg de protéines ont été incubés pendant 1 h avec un premier lot de billes (7,5 µL) puis pendant une nuit avec un deuxième lot (12,5 µL). Les protéines captées dans chaque cas ont été éluées à 80 °C dans du Laemmli. Elles ont ensuite été séparées sur un gel SDS-PAGE à 12 % pour être analysées en Western-blot (Figure 44).

Figure 44. Tentative d'appauvrissement des échantillons en protéines non spécifiques (la flèche indique la position de la protéine photomarkée)

A : protéines captées par 7,5 µL de billes après une incubation d'1 h avec 500 µg de protéines provenant de cellules irradiées en présence de sonde.

B : protéines captées par 12,5 µL de billes après une incubation d'une nuit avec le surnageant issu de la première capture



Une quantité non négligeable de protéines a effectivement été captée de manière non spécifique lors de l'incubation du lysat avec le premier lot de billes (piste A). Cette quantité ne semble toutefois représenter qu'une petite partie des protéines non spécifiques présentes dans le lysat puisqu'un grand nombre de protéines ont encore été captées de manière non spécifique lors de l'incubation avec le deuxième lot de billes (piste B). Nous avons par ailleurs constaté qu'une majeure partie de la protéine cible est captée dès la première incubation (piste A). La fixation des protéines non spécifiques et celle de la protéine cible avaient donc lieu simultanément. Par conséquent, il n'était pas possible d'appauvrir le lysat en protéines non spécifiques avant de procéder à la capture de la protéine d'intérêt.

iv. Comparaison de différents types de billes

Nous avons ensuite évalué la quantité de protéines captées de manière non spécifique par différents types de billes. Les billes d'agarose-Streptavidine Pierce (20347) que nous utilisons jusqu'alors ont ainsi été comparées à des billes d'agarose-Streptavidine fournies par Sigma Aldrich (85881) et à des billes magnétiques d'Invitrogen fonctionnalisées elles aussi par de la Streptavidine (Dynabeads[®] M-280 Streptavidin). Les billes magnétiques comportent un nombre de sites de liaison pour la Biotine qui est inférieur à celui des billes d'agarose mais elles ont l'avantage de ne pas être poreuses, ce qui réduit fortement la surface disponible pour les interactions non spécifiques.

Toutes ces billes ont été incubées avec des lysats issus de cellules irradiées en absence de sonde afin de ne comparer que leur aptitude à interagir avec des protéines autres que la protéine d'intérêt photomarkée. Une fois éluées, ces protéines ont été séparées sur un gel SDS-PAGE à 12 % et ont été analysées en Western-blot. Les profils protéiques ainsi obtenus se sont révélés identiques quelles que soient les billes utilisées. Ni les billes d'agarose Sigma, ni les billes magnétiques d'Invitrogen n'ont donc permis de diminuer la quantité de protéines captées de manière non spécifique.

v. Optimisation des lavages et des conditions d'éluion

Une troisième possibilité pour diminuer la quantité de protéines interagissant de manière non spécifique avec les billes était de laver les billes dans des conditions plus drastiques. Un nouveau protocole de lavages a donc été mis en place. Ce protocole consiste à laver les billes plusieurs fois dans un grand volume de tampon phosphate (PBS) contenant 0,1 % de SDS (5 mL) puis avec différentes solutions de NaCl (≤ 2 M) avant de procéder aux lavages décrits

lors de la première expérience de capture (cf. partie 3.4.a). Des éluions sont ensuite réalisées dans du tampon Laemmli à 40 puis 60 °C, températures choisies en vue d'éliminer les protéines liées aux billes de manière non spécifique sans décrocher la protéine cible.

La première expérience de capture sur billes (partie 3.4.a)) et les expériences de contrôle de la stabilité de la protéine cible et de l'efficacité de capture (parties 3.4.b) *i* et *ii*) ont montré que les conditions d'éluion utilisées (incubation de 20 min dans du tampon Laemmli à 80 °C) étaient en cause dans l'isolement de faibles quantités de protéine d'intérêt. Le protocole de lavage optimisé décrit ci-dessus devait permettre, *via* l'élimination d'une grande quantité de protéines non spécifiques, de rendre la protéine cible plus accessible au Laemmli et donc d'obtenir une éluion plus efficace. Deux autres éléments pouvaient toutefois également favoriser l'éluion de la protéine cible, à savoir l'utilisation d'une température d'éluion plus élevée (95 °C au lieu de 80) et la présence d'un courant électrique. Afin de tester ces différentes conditions d'éluion, nous avons réalisé une expérience de capture dans laquelle les billes ont été lavées comme décrit ci-dessus, après quoi les protéines encore présentes ont été éluées dans du Laemmli à 80 °C puis dans du Laemmli à 95 °C. L'échantillon obtenu à 95 °C a ensuite été divisé en deux, la première moitié n'étant constituée que de surnageant et la deuxième de surnageant et de billes. Ces deux échantillons ont été déposés dans leur intégralité sur un gel SDS-PAGE à 12 %. Différents prélèvements effectués au cours de l'expérience ont également été déposés puis l'ensemble des échantillons a été analysé en Western-blot (Figure 45).

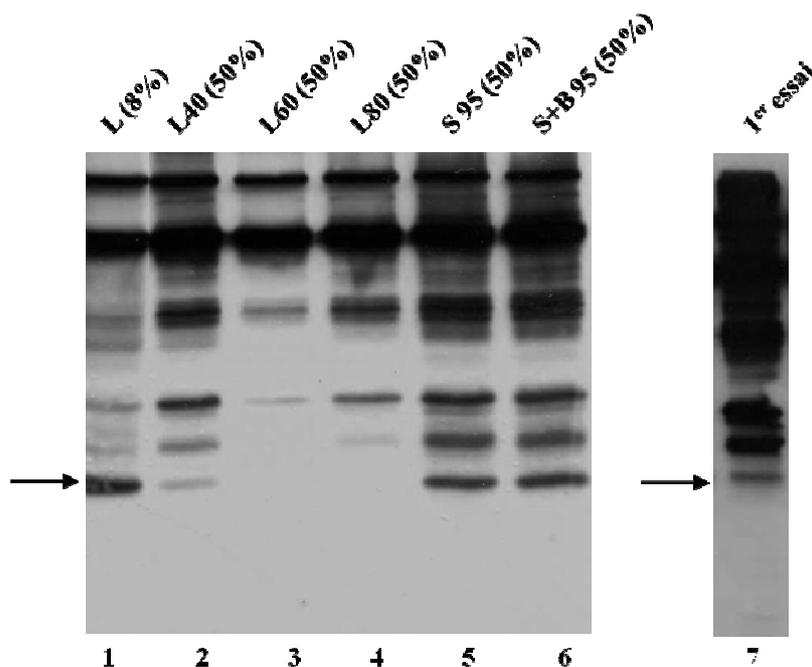


Figure 45. Echantillons obtenus au cours d'une expérience de capture visant à tester un nouveau protocole de lavages et différentes conditions d'éluion. 500 µg de protéines provenant de cellules irradiées 4 min avec 5 µM de sonde (**L**) ont été incubés avec 12,5 µL de billes d'agarose-Streptavidine Pierce. Après 1 nuit d'incubation à 4 °C, les billes ont été lavées 3 fois avec 5 mL de PBS - SDS (0,1 %), 1 fois avec 2 mL de NaCl 1 M, 1 fois avec 2 mL de NaCl 2 M et 1 fois avec 800, 400 puis 200 µL de PBS - SDS (0,1 %). Les billes ont ensuite été incubées 15 min à 40 °C dans 100 µL de Laemmli. Une fois le surnageant récupéré (**L40**), le même processus a été réalisé à 60 °C (**L60**) puis à 80° C (**L80**). Les billes ont enfin été incubées 15 min à 95 °C dans 100 µL de Laemmli. L'échantillon a été divisé en deux : 50 µL de surnageant seul (**S 95**) et ~50 µL de surnageant + billes (**S+B 95**). Ces deux échantillons ont été comparés à celui obtenu suite au premier essai de capture (**1^{er} essai**), cf. Figure 40, piste B.

Un échantillon de lysat non traité, contenant l'ensemble des protéines cibles photomarquées, a été déposé pour servir de référence (piste 1). Il permet de localiser facilement la protéine d'intérêt (indiquée par une flèche Figure 45). Les protéines décrochées à l'aide des lavages réalisés dans du PBS - SDS (0,1 %) et dans des solutions de NaCl n'ont

pas pu être visualisées en Western-blot : les échantillons obtenus dans le premier cas étaient trop dilués et ceux obtenus dans le deuxième n'ont pas migré correctement du fait de la présence du chlorure de sodium (non montré). Les surnageants obtenus après incubation des billes dans du Laemmli à 40 °C (piste 2) puis à 60 °C (piste 3) ont eux pu être analysés. D'après les résultats obtenus, ces deux incubations ont permis comme prévu d'éliminer des protéines captées par les billes de manière non spécifique tout en décrochant très peu de protéine cible.

L'éluion dans du Laemmli à 80 °C (piste 4) n'a pas conduit au décrochage de la protéine cible. Elle a par contre permis d'éliminer un certain nombre de protéines captées de manière non spécifique ; il a donc été décidé que cette éluion serait intégrée au protocole de lavages optimisé. L'éluat obtenu après l'incubation des billes dans du Laemmli à 95 °C (piste 5) contient quant à lui une quantité de protéine cible, certes pas encore aussi importante que ce que nous aurions dû obtenir si toute la protéine cible captée avait été éluee, mais nettement plus importante que celle que nous avons obtenue lors de notre premier essai (piste 7). Une température de 95 °C était donc finalement nécessaire pour obtenir un meilleur décrochage de la protéine d'intérêt. On peut également constater que le rapport protéine spécifique / protéines non spécifiques est bien meilleur dans ce cas (piste 5) que lors de notre premier essai (piste 7). Nous avons donc atteint, au moins partiellement, notre objectif.

Le résultat obtenu avec l'échantillon surnageant + billes (piste 6) indique que les billes d'agarose peuvent être déposées sans que la migration des protéines ne soit affectée. Le dépôt n'a cependant pas conduit à l'obtention d'une plus grande quantité de protéines. La présence d'un courant électrique n'a donc pas favorisé dans notre cas le décrochage de la protéine d'intérêt. Ce résultat était tout de même intéressant. Nous évitions jusqu'alors de nous approcher des billes lors du prélèvement des surnageants, ce qui conduisait souvent à la perte d'une partie des échantillons. Grâce aux résultats observés ici, nous savions que les échantillons obtenus lors de l'éluion à 95 °C pouvaient être prélevés et déposés sur gel dans leur intégralité.

3.4.c) Obtention d'un gel analysable en spectrométrie de masse

Les nouveaux protocoles de lavages et d'éluion ont conduit à de très nettes améliorations en terme de quantité de protéine cible récupérée après éluion et d'élimination des protéines captées de manière non spécifique par les billes. Il restait à déterminer si ces améliorations étaient suffisantes pour obtenir un gel coloré au nitrate d'argent propre sur lequel la bande d'intérêt pouvait être clairement visualisée puis excisée afin d'être soumise à une analyse par spectrométrie de masse.

L'expérience de capture précédente a donc été réitérée. Cette fois, elle a été réalisée sur trois échantillons de protéines de 500 µg chacun, le premier étant issu de cellules irradiées en absence de sonde, le deuxième de cellules irradiées en présence de sonde seule (**ITB₅-P₁**, 5 µM) et le troisième de cellules irradiées en présence de sonde (**ITB₅-P₁**, 5 µM) et de compétiteur (**ITB₅**, 250 µM). Une fois les billes lavées, les protéines retenues sur les billes ont été éluees à 95 °C dans une solution de Laemmli contenant 3 mM de Biotine. La Biotine a été ajoutée au tampon d'éluion au cas où sa présence pourrait favoriser le décrochage de la protéine cible. Les trois éluats obtenus ont ensuite été déposés sur un gel SDS-PAGE à 12 %. Une gamme de trypsine allant de 1 à 100 ng a également été déposée sur ce gel pour avoir une idée approximative de la quantité de protéine cible isolée et un marqueur de poids moléculaire a été ajouté afin d'estimer la masse de la protéine photomarquée. Une fois les protéines séparées, le gel a été coloré au nitrate d'argent selon un protocole classique permettant de détecter jusqu'à 0,1 ng de protéines (Figure 46).

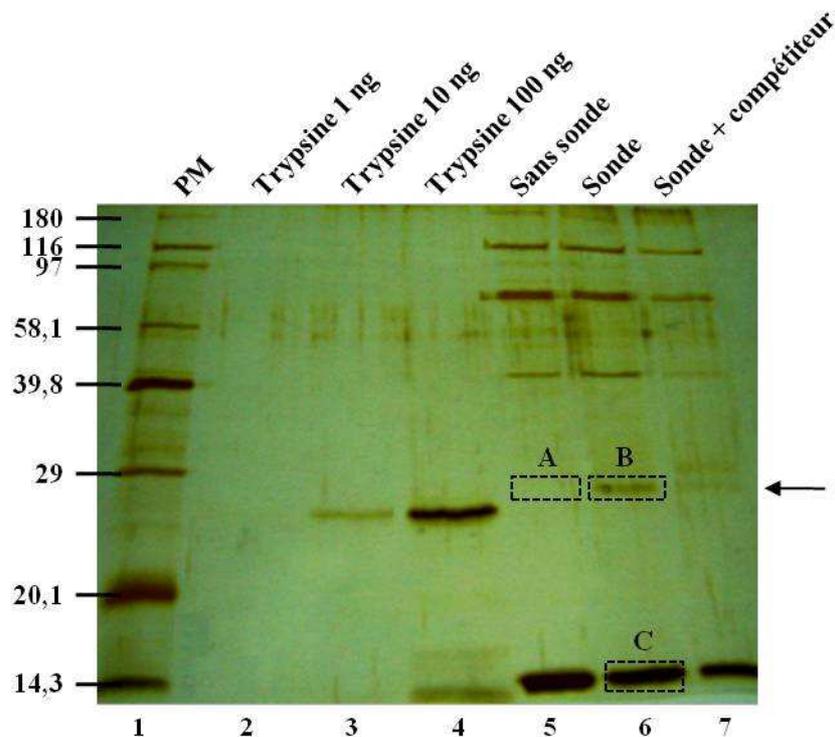


Figure 46. Gel coloré au nitrate d'argent obtenu grâce au nouveau protocole de purification à partir de cellules irradiées en absence de sonde, en présence de sonde seule ou en présence de sonde et de compétiteur. La flèche indique la localisation de la protéine photomarquée et les rectangles A, B, C les bandes qui ont été excisées par la suite (PM = poids moléculaire)

Le gel que nous avons obtenu est effectivement très propre. Seules 4 à 5 bandes sont visibles dans chacune des pistes 5, 6 et 7 correspondant aux protéines extraites depuis les trois lysats utilisés. Cette faible présence de protéines non spécifiques a clairement permis de distinguer une bande n'étant visible qu'en présence de sonde (comparaison pistes 5 et 6) et dont l'intensité est fortement diminuée en présence de compétiteur (comparaison pistes 6 et 7). L'augmentation d'efficacité d'éluion observée en Western-blot était donc bien suffisante pour que la protéine photomarquée par la sonde **ITB₅-P₁** puisse être visualisée sur un gel coloré au nitrate d'argent.

La bande d'intérêt, indiquée par une flèche Figure 46, est située légèrement en-dessous de la bande correspondant à la protéine standard de masse $M = 29$ kDa (comparaison pistes 1 et 6) et légèrement au-dessus de la gamme de trypsine (comparaison pistes 4 et 6), la trypsine utilisée ayant une masse de 24,8 kDa. Cette localisation a permis d'estimer un poids moléculaire apparent compris entre 24 et 29 kDa pour la protéine d'intérêt. La coloration à l'argent n'étant pas quantitative, il n'est pas possible de déterminer avec précision la quantité de protéines se trouvant dans une bande. La gamme de trypsine déposée a néanmoins permis d'estimer la masse de la protéine isolée à 10 ng environ. C'est une quantité de protéine faible ne pouvant garantir le succès des expériences d'identification par spectrométrie de masse. Le gel étant extrêmement propre, une première tentative d'excision et de digestion de la bande B (Figure 46) a tout de même été réalisée en vue d'analyses par spectrométrie de masse.

3.5. Identification de la protéine photomarquée

Les protocoles mis au point jusqu'ici ont permis d'isoler la protéine cible de l'inhibiteur **ITB₅** et de la localiser sur un gel coloré au nitrate d'argent. Pour identifier une protéine, la bande correspondante doit être excisée puis incubée dans une solution de trypsine (Figure 47). La trypsine est une enzyme qui clive les protéines après chaque lysine ou arginine. Elle forme de cette façon des peptides qui sont extraits du gel à l'aide d'une succession d'hydratations et de déshydratations. La solution de peptide ainsi obtenue est dessalée et concentrée à l'aide

La révélation des gels colorés au nitrate d'argent est stoppée grâce à une solution d'acide acétique. La trypsine ne fonctionnant qu'en milieu neutre à basique, les fragments de gel excisés ont d'abord été lavés plusieurs fois au bicarbonate de sodium. Ces fragments ont ensuite été lyophilisés puis incubés une nuit à 37 °C avec une solution basique de trypsine. Les peptides formés dans chaque cas ont été extraits du gel à l'aide d'une série d'hydratations et de déshydratations. Une fois les solutions obtenues lyophilisées, ces peptides ont été repris dans une solution de TFA 0,1 % pour un dessalage et une concentration sur colonnes Zip-Tips. Grâce à ces colonnes, l'intégralité des échantillons peut être déposée sur une cible MALDI (volume déposable : 1 µL maximum). Le spectre obtenu suite à l'analyse MS est présenté Figure 49 pour chacune des trois bandes excisées.

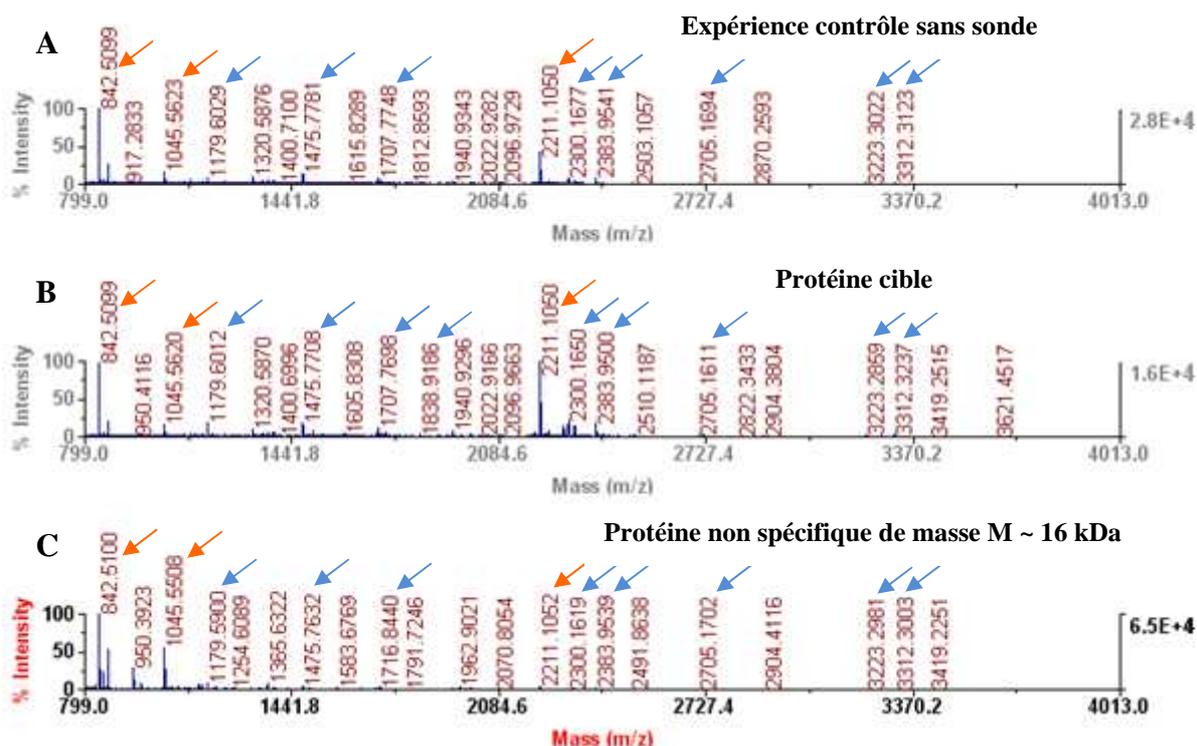


Figure 49. Spectres MS obtenus après extraction et concentration des peptides
(flèche orange = peptide typique de l'autolyse de la trypsine, flèche bleue = peptide de kératine humaine)

Ces spectres ont d'abord été utilisés pour interroger la base de données Swissprot, toutes espèces confondues. Seule de la kératine humaine a ainsi été identifiée avec un score significatif. Les peptides avec lesquels cette protéine a été reconnue sont indiqués par des flèches bleues sur les spectres de la Figure 49. La kératine, présente dans la peau et les cheveux, est un contaminant presque toujours présent dans ce type d'expériences et ce même si de nombreuses précautions sont prises pour en limiter les quantités. Il n'était donc pas surprenant de l'avoir identifiée.

Afin de n'interroger les bases de données qu'avec les masses de peptides pouvant appartenir à la protéine cible ou à la protéine non spécifique de masse M ~ 16 kDa, les spectres B et C de la Figure 49 ont été comparés au spectre contrôle A et seuls les peptides totalement absents du spectre A ont été sélectionnés (voir Figure 50). Les pics ne possédant pas une intensité suffisante pour être analysés par MS-MS n'ont par contre pas été retenus.

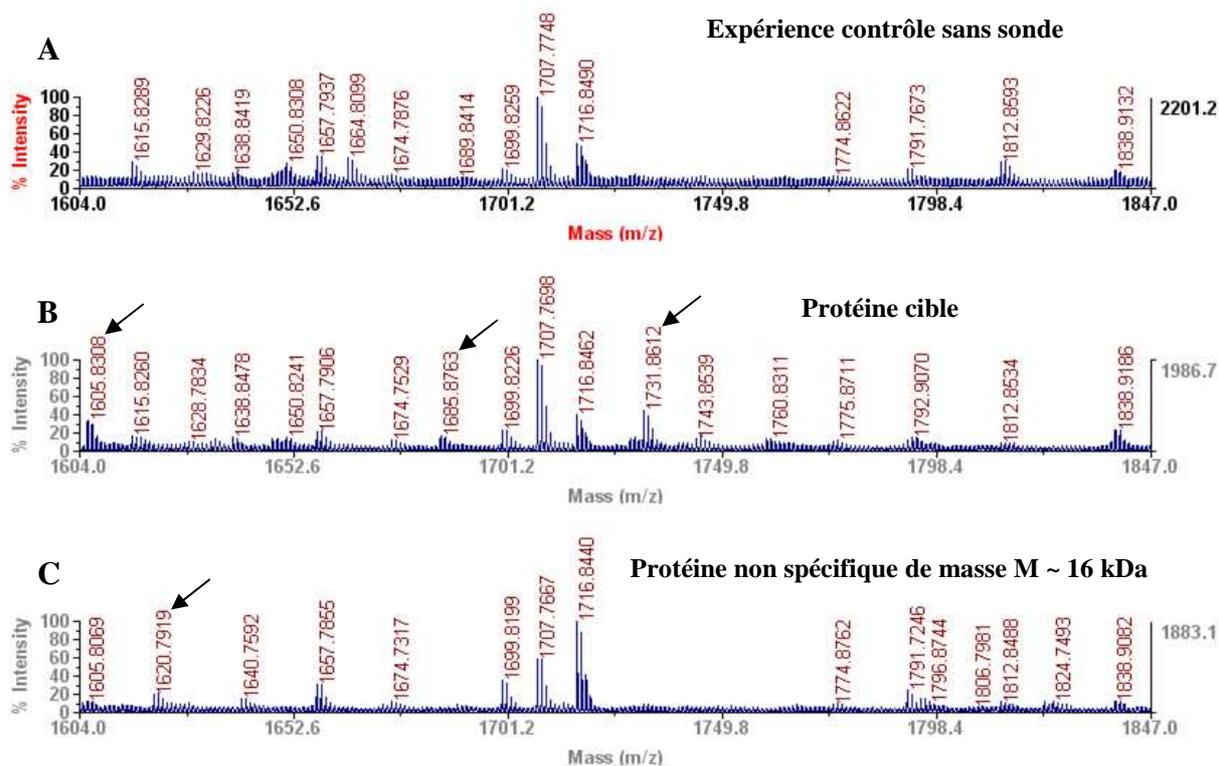


Figure 50. Exemple d'agrandissement effectué afin de rechercher des peptides pouvant appartenir aux protéines à identifier (donc absents du spectre contrôle). Les flèches indiquent certains des pics qui ont été sélectionnés.

En procédant comme indiqué Figure 50, 4 peptides ont été sélectionnés dans le spectre de la protéine cible (Figure 49, spectre B) et 7 ont été sélectionnés dans le spectre de la protéine non spécifique de masse M ~ 16 kDa (Figure 49, spectre C). Lorsque la base de données Swissprot a été interrogée uniquement avec les 7 peptides sélectionnés dans le spectre C, différentes protéines ayant une masse comprise entre 13 et 18 kDa ont été proposées par MASCOT avec un score non significatif. Toutes ces protéines ont été identifiées à partir de peptides ayant une masse de 1205 ou 1962 Da. Afin de valider l'une des protéines proposées par MASCOT, les peptides présents dans l'échantillon issu de la bande C et correspondant à ces deux masses ont été sélectionnés pour être fragmentés. Les spectres MS-MS obtenus sont présentés Figure 51.A et 51.B.

Lorsque ces spectres ont été utilisés pour interroger la base de données Swissprot, une même protéine a été identifiée à chaque fois : la Streptavidine. Nous avons obtenu dans un cas un score tout à fait significatif de 88 (peptide de masse M = 1962 Da, Figure 51.C) et dans l'autre cas un score non significatif de 12 (peptide de masse M = 1205 Da, Figure 51.D). Comme nous l'avons vu précédemment, une identification est considérée comme fiable à partir du moment où l'identité de deux peptides peut être confirmée par MS-MS, ce qui n'est pas tout à fait le cas ici. La masse de la Streptavidine (M = 18,8 kDa) correspondait toutefois parfaitement à la localisation de la bande C sur le gel et il était tout à fait logique que cette protéine soit observée sur le gel quelles que soient les conditions d'irradiation des cellules (pistes 5, 6 et 7 de la Figure 46) puisque tous les lysats cellulaires passaient par une incubation avec des billes d'agarose-Streptavidine. L'identification de la Streptavidine a donc tout de même été considérée comme fiable.

Le fait d'avoir pu identifier cette protéine a permis de valider le protocole que nous avons utilisé pour préparer les échantillons à l'analyse MS (digestion « in-gel » des protéines par la trypsine, extraction des peptides à l'aide d'hydratations et de déshydratations successives, dessalage et concentration des peptides sur colonne Zip-Tip).

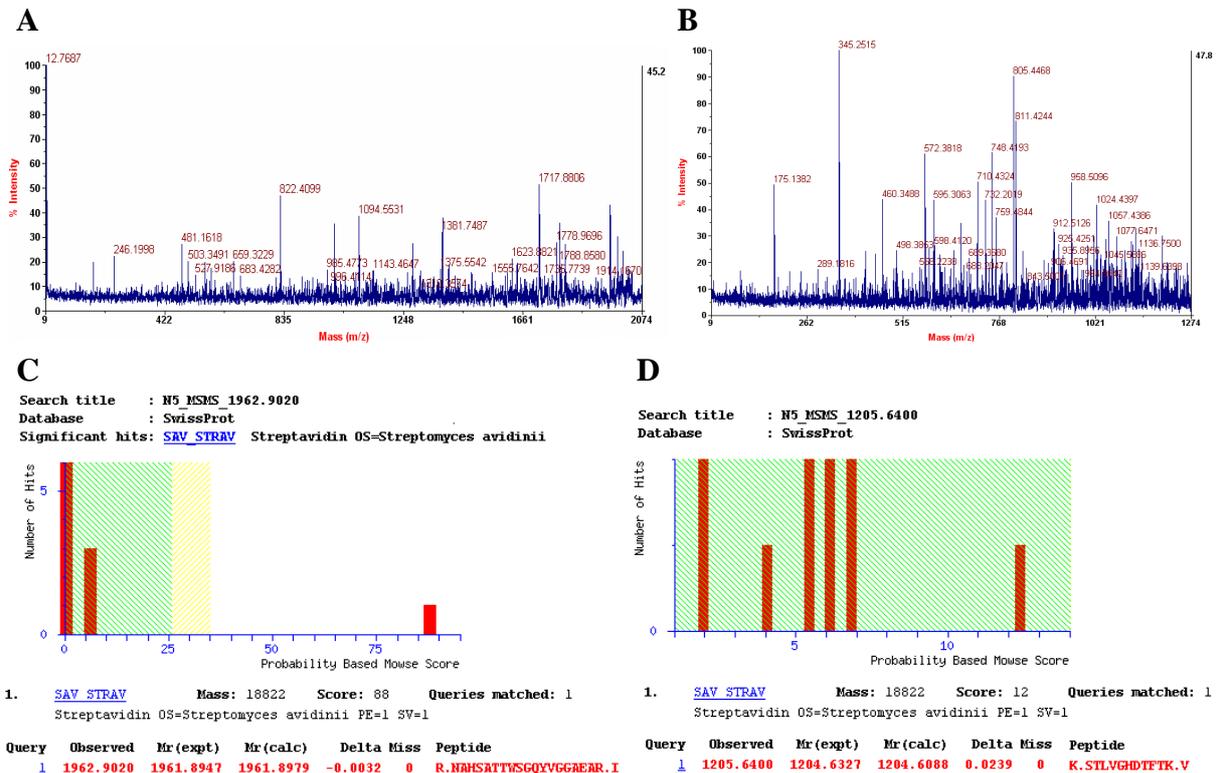


Figure 51. Spectres MS-MS ayant permis d'identifier la Streptavidine

A) Spectre MS-MS obtenu pour le peptide de masse $M = 1962$ Da.

B) Spectre MS-MS obtenu pour le peptide de masse $M = 1205$ Da.

C) Résultat obtenu en interrogeant la base de données Swissprot avec les données du spectre A

D) Résultat obtenu en interrogeant la base de données Swissprot avec les données du spectre B

Nous avons alors tenté de procéder de la même façon avec les 4 peptides sélectionnés dans le spectre MS de la protéine cible en restreignant cette fois l'interrogation de la base de données aux protéines de rat. Aucune protéine n'a été reconnue avec un score significatif dans ces conditions mais l'une des protéines proposées par MASCOT présentait un poids moléculaire intéressant de 28 kDa : une protéine interagissant avec un canal potassique voltage-dépendant appelée Kv-ICP4. Cette protéine ayant été reconnue grâce à des peptides de masse $M = 1686$ et $M = 1732$ Da, les peptides présents dans l'échantillon issu de la bande B et correspondant à ces masses ont été sélectionnés pour être fragmentés. Les spectres MS-MS obtenus n'ont cependant pas permis de confirmer l'identification de cette protéine. Le premier spectre MS-MS contenait en effet trop peu de pics et le deuxième comportait un bruit de fond trop important.

Le gel obtenu suite à l'optimisation des protocoles de lavages et d'éluion n'a donc pas conduit à l'identification de la protéine photomarkée par la sonde **ITB₅-P₁**. Cette absence de résultat était très probablement liée à la faible quantité de matériel présente dans la bande excisée (bande B, Figure 46), d'autant que la Streptavidine présente en quantités plus importantes (bande C, Figure 46) avait elle pu être identifiée. L'identification de la protéine cible d'**ITB₅** impliquait donc de trouver en premier lieu un moyen d'augmenter la quantité de matériel analysable par spectrométrie de masse.

3.5.c) Expériences visant à augmenter la quantité de matériel analysable en masse

La première tentative que nous avons faite pour identifier la protéine cible d'**ITB₅** a montré que la quantité de matériel pouvant être analysée en spectrométrie de masse était trop faible pour qu'une identification puisse être réalisée. Plusieurs expériences ont alors été envisagées pour augmenter cette quantité de matériel :

- Les expériences d'optimisation précédentes nous avaient conduits à laver les billes de manière intensive et certaines des étapes de lavage n'avaient pas pu être analysées pour vérifier si elles conduisaient ou non au décrochage de la protéine cible. Une première expérience consistait donc à déterminer si une partie de la protéine d'intérêt était perdue au cours de ces lavages et si des ajustements pouvaient être effectués, le cas échéant, afin de limiter cette perte.

- Nous savions par ailleurs que l'élution de la protéine cible était loin d'être quantitative malgré les améliorations apportées précédemment. D'autres protocoles d'élution pouvaient donc être testés dans un deuxième temps afin de trouver des conditions plus drastiques qu'une élution dans du Laemmli à 95 °C.

- Nous prévoyions aussi de tester d'autres protocoles de coloration, la coloration au nitrate d'argent étant connue pour être, certes très sensible, mais peu compatible avec l'analyse des échantillons par spectrométrie de masse.

- Nous envisagions enfin, au cas où aucune expérience menée avec la sonde **ITB₅-P₁** ne permettrait d'augmenter la quantité de matériel, de synthétiser de nouvelles sondes, toujours basées sur l'inhibiteur **ITB₅**, mais permettant de décrocher la protéine cible plus facilement (affinité moindre pour les billes, présence d'un lien clivable).

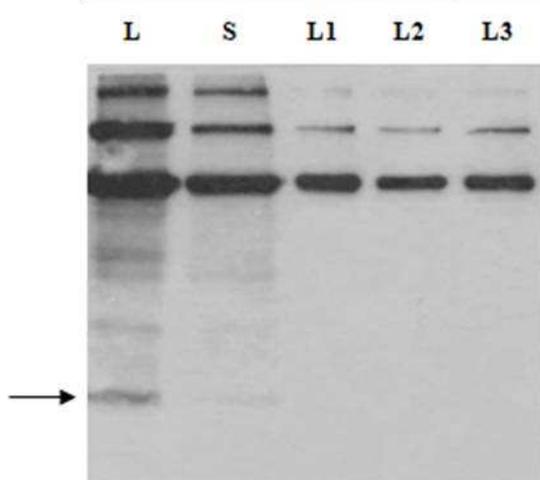
i. Contrôle des lavages

Comme nous l'avons vu précédemment, les lavages effectués dans de grands volumes de PBS-SDS (0,1 %) et dans des solutions de NaCl ne peuvent pas être analysés en Western-blot pour déterminer si une partie de la protéine cible est décrochée ou non dans ces conditions. Pour pouvoir contrôler chaque étape de l'expérience de capture sur billes, le protocole de lavages a donc été réduit : les billes n'ont ainsi été lavées que par incubation dans du Laemmli à 40, 60 puis 80 °C. Une fois ces lavages terminés, les billes ont été incubées à 95 °C avec une solution de Biotine à 3 mM dans le Laemmli puis des prélèvements de 3 % (v/v) ont été effectués sur les surnageants récupérés au cours des lavages pour être analysés en Western-blot (Figure 52.A, pistes L1, L2 et L3). L'éluat final a, quant à lui, été déposé sur un gel SDS-PAGE à 12 % qui a été coloré, après migration, au nitrate d'argent (Figure 52.B, piste 1). Il a ainsi pu être comparé à un éluat obtenu la semaine précédente grâce au même protocole d'élution mais après que l'ensemble des étapes de lavages aient été effectuées : PBS-SDS (0,1 %), NaCl 1 M puis 2 M, PBS-SDS (0,1 %) à nouveau puis éluations dans du Laemmli à 40, 60 puis 80 °C (Figure 52.B, piste 2).

Il est à noter qu'une autre petite modification de protocole a été effectuée au cours de cette expérience. Etant donné que nous avions des problèmes de quantité de matériel, nous avons décidé de multiplier par 2 les quantités de protéines incubées avec les billes et ainsi de réaliser l'expérience de capture sur 1 mg de protéines au lieu des 500 µg utilisés jusqu'ici. Afin de capter correctement ce surplus de protéines, la quantité de billes a été augmentée de 12,5 à 15 µL. Des prélèvements de 3 % (v/v) ont été effectués sur le lysat non traité et sur le surnageant récupéré après incubation pour vérifier l'efficacité de la capture (Figure 52.A, pistes L et S).

Une quantité très faible de protéine cible a été détectée dans le surnageant éliminé après l'incubation avec les billes (comparaison pistes L et S). La quantité de billes utilisée a donc bien permis de capter l'ensemble des protéines cibles photomarquées présentes dans un lysat d'1 mg de protéines.

A Expérience de capture réalisée avec 1 mg de protéines et un protocole de lavages réduit



B

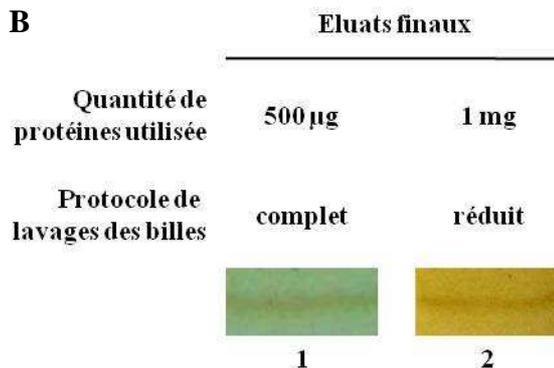


Figure 52. Western-blot obtenu à partir de prélèvements effectués au cours de l'expérience de capture avec lavages réduits (A) et comparaison des éluats finaux obtenus selon la quantité de protéines et le protocole de lavages utilisés (B). **L** : 3 % d'un lysat contenant 1 mg de protéines provenant de cellules irradiées en présence de sonde, **S** : 3 % du surnageant récupéré après incubation du lysat L avec 15 µL de billes, **L1** : 3 % du surnageant obtenu après incubation des billes avec du Laemmli à 40 °C, **L2** : 3 % du surnageant obtenu après incubation des billes avec du Laemmli à 60 °C, **L3** : 3 % du surnageant obtenu après incubation des billes avec du Laemmli à 80 °C. Les éluats finaux ont été obtenus après incubation des billes dans du Laemmli à 95 °C contenant 3 mM de Biotine. (la flèche indique la position de la protéine marquée)

La protéine cible est totalement absente des pistes L1, L2 et L3. La réduction des lavages permet donc d'éviter toute perte de protéine cible au cours de cette étape. Cela n'a cependant conduit qu'à une augmentation très légère de la quantité de protéine cible décrochée à 95 °C (comparaison des pistes 1 et 2, Figure 52.B), l'augmentation étant sans doute davantage liée à l'utilisation d'1 mg de protéines qu'à la réduction des lavages. Puisque le résultat obtenu en réduisant les lavages est similaire à celui que nous obtenons lorsque nous réalisons l'ensemble du protocole de lavages optimisé, il est peu probable que de la protéine cible ait été perdue au cours des lavages effectués dans de grands volumes de PBS-SDS (0,1 %) et dans des solutions de NaCl. Nous avons donc conservé le protocole de lavages intensifs décrit précédemment et nous nous sommes focalisés sur la recherche de conditions d'éluion permettant de décrocher une quantité de protéine cible plus importante. Malgré le peu de bénéfice apporté par l'utilisation d'1 mg de protéines au lieu de 500 µg, il a tout de même été décidé de réaliser les expériences de capture suivantes en partant d'1 mg de protéines totales.

ii. Recherche de conditions d'éluion plus efficaces

Trypsinolyse sur billes

Une première possibilité pour décrocher davantage de protéine cible était de digérer cette protéine à la trypsine directement sur les billes d'agarose-Streptavidine. L'inconvénient de cette façon de procéder est que les digestats contiennent à la fois les peptides issus de la digestion de la protéine cible et les peptides provenant des protéines ayant été captées non spécifiquement par les billes. Etant donné que les gels que nous avons obtenus ne semblaient contenir qu'une quantité restreinte de protéines (pas plus de 5 ou 6), nous avons pensé que l'expérience valait tout de même la peine d'être tentée. Afin de faire la distinction entre les pics appartenant à la protéine cible et ceux appartenant aux protéines non spécifiques, l'expérience a été menée en parallèle avec des protéines issues de cellules irradiées en absence et en présence de sonde. Les spectres MS obtenus une fois les digestats dessalés et concentrés sur des colonnes Zip-Tips sont présentés Figure 53.

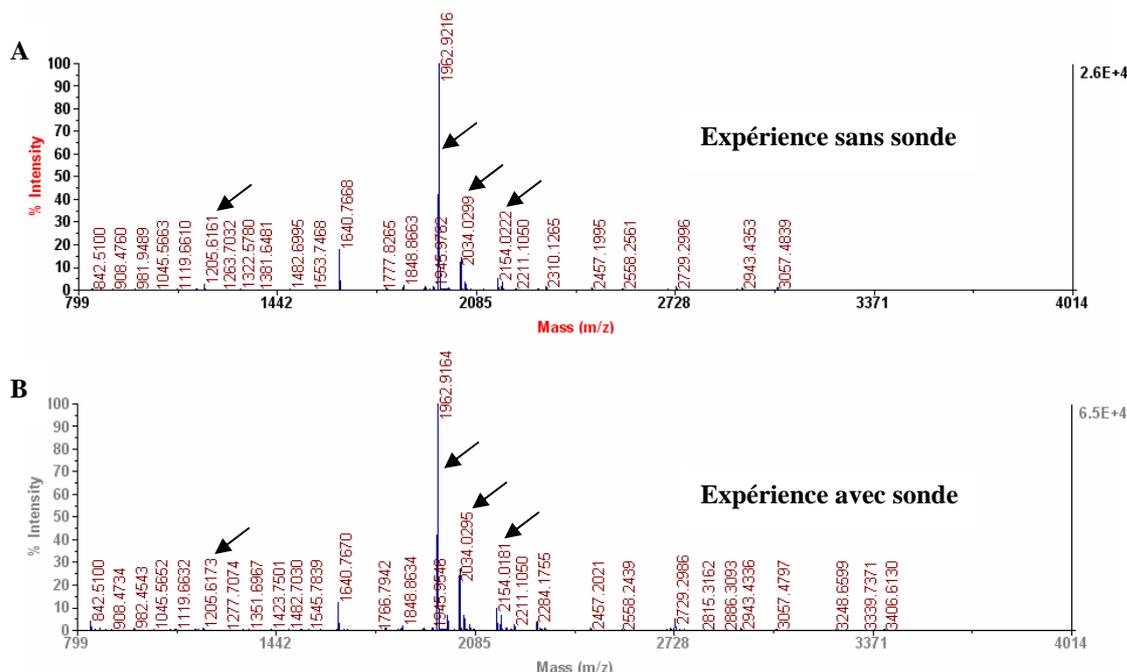


Figure 53. Spectres MS obtenus après digestion sur billes et concentration des digestats
(les flèches indiquent les 4 peptides grâce auxquels la Streptavidine a été identifiée)

Parmi les pics visibles sur les deux spectres MS, on retrouve les peptides de masse $M = 1205$ et 1962 Da qui avaient déjà permis d'identifier la Streptavidine. La présence importante de cette protéine a été confirmée par interrogation de l'ensemble de la base de données Swissprot avec les 20 plus grands pics de ces deux spectres. Dans chaque cas, la Streptavidine a été reconnue avec 4 peptides dont les identités ont toutes été confirmées par une expérience de MS-MS. La base de données Swissprot a donc ensuite été interrogée en entrant comme données la liste des pics présents dans le spectre B à laquelle nous avons retiré les 4 pics de la Streptavidine. En procédant de cette manière, une protéine de 29 kDa, appelée synaptoporine (SYNPR), est apparue parmi les suggestions de Mascot. Cette protéine était reconnue avec 8 peptides dont 2 totalement absents du spectre contrôle A. Nous avons tenté de confirmer l'identité de ces 8 peptides par des expériences de MS-MS. Le bruit de fond était cependant si important que sur ces 8 peptides, 6 n'ont pas pu être isolés afin d'être engagés dans des expériences de fragmentation. Quant aux 2 peptides restants, ils se sont avérés d'intensité trop faible pour que les spectres MS-MS obtenus permettent de confirmer leur identité.

La trypsinolyse sur billes posait donc deux problèmes : les signaux correspondant aux protéines captées étaient complètement écrasés par ceux de la Streptavidine et le bruit de fond créé par la présence des protéines non-spécifiques était trop important pour qu'une quelconque identification puisse être confirmée par des expériences de MS-MS.

Test de différentes solutions d'éluion

La trypsinolyse sur billes ne pouvant être utilisée, nous avons tenté d'éluier la protéine cible dans d'autres solutions que le tampon Laemmli. Pour ce faire, 3 lysats contenant 1 mg de protéines issues de cellules irradiées en présence de sonde ont été traités selon le protocole défini précédemment (cf. partie 3.4.b) v) jusqu'à l'incubation des billes avec du Laemmli à 80°C . Une fois le dernier surnageant éliminé, chacun des échantillons a été incubé 1 h à 65°C avec l'une des trois solutions d'éluion suivantes : un mélange acétonitrile/eau/TFA 70/30/0,1 % (Figure 54.A), une solution d'EDTA et de dithiothréitol à 17,5 et 100 mM, respectivement (Figure 54.B) et une solution contenant 2 % de SDS, 30 mM de Biotine, 6 M d'urée et 2 M de thiourée (Figure 54.C)¹⁸. Les protéines éluées dans chaque cas ont été

dénaturées grâce à une incubation de 5 min dans du Laemmli à 95 °C puis 3 % de chaque éluat ont été déposés sur un gel SDS-PAGE à 12 %. 3 % des lysats non traités et des surnageants récupérés après l'incubation avec les billes ont également été déposés pour contrôler dans chaque cas l'efficacité de la capture (Figure 54, pistes L et S).

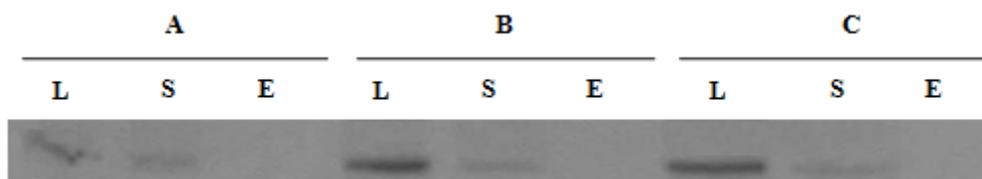


Figure 54. Test de différentes solutions d'éluion.

3 échantillons d'1 mg de protéines issues de cellules irradiées en présence de sonde (L) ont été incubés 1 nuit à 4 °C avec 15 µL de billes. Une fois les surnageants retirés (S), les billes ont été lavées avec 3 x 5 mL de PBS-SDS (0,1 %), 1 x 2 mL de NaCl 1 M, 1 x 2 mL de NaCl 2 M puis 800, 400 et 200 µL de PBS-SDS (0,1 %). Des éluions de 15 min dans 100 µL de Laemmli ont été réalisées à 40, 60 puis 80 °C. L'éluion finale a été réalisée pendant 1 h à 65 °C avec 150 µL de CH₃CN/H₂O/TFA 70/30/0,1 % (A), avec 150 µL d'EDTA/DTT 17,5/100 mM (B) ou avec 52 µL de SDS/Biotine/Urée /Thiourée 2 %/30 mM/6 M/2 M (C). Les surnageants A et B ont été lyophilisés avant d'être repris dans 50 µL de Laemmli 1× et le surnageant C a été additionné de 13 µL de Laemmli 5×. Après 5 min à 95 °C, 3 % de chaque surnageant (E) ont été déposés sur un gel SDS-PAGE à 12 %.

La capture de la protéine cible s'est révélée efficace dans les 3 cas. Pas plus de 5 % de la protéine cible ont en effet été retrouvés dans le surnageant récupéré après l'incubation des lysats avec les billes (comparaisons des pistes L et S). On constate, par contre, qu'aucune des solutions testées n'a permis d'éluier une quantité significative de protéine cible (pistes E). Aucune des conditions présentées ici ne s'est donc révélée plus drastique qu'une incubation des billes avec du Laemmli à 95 °C, condition qui a par conséquent été conservée pour les expériences suivantes.

iii. Test d'une coloration argentique plus compatible avec les analyses de masse

Puisqu'aucune condition d'éluion plus efficace qu'une ébullition dans du Laemmli n'avait pu être trouvée, nous avons tenté d'augmenter la quantité de matériel analysable par spectrométrie de masse en utilisant un protocole de coloration décrit dans la littérature comme étant plus compatible avec ce type d'analyse. La coloration au nitrate d'argent classique a l'avantage d'être très sensible. La présence de formaldéhyde dans la solution de révélation peut cependant conduire à une modification irréversible des protéines, cela ayant pour conséquence de perturber à la fois la digestion trypsique et l'extraction des peptides. Différentes études ont été menées dans la littérature afin de trouver des composés chimiques capables de réduire les ions Ag⁺ sans réagir avec les protéines. La variante de coloration que nous avons choisie de tester a été développée par l'équipe de Thierry Rabilloud¹⁹. Le protocole décrit est très proche du protocole classique excepté que le formaldéhyde est remplacé par un sucre (glucose, galactose, xylose, ribose ou arabinose) solubilisé dans un tampon à base de borate de sodium.

Afin de comparer les deux protocoles de coloration, deux échantillons de protéines provenant de cellules irradiées en présence de sonde ont été incubés avec des billes d'agarose-Streptavidine. Chacun des surnageants obtenus après lavages des billes et éluion des protéines captées a été déposé sur un gel SDS-PAGE à 12 %. Une fois la migration terminée, l'un des échantillons a été coloré au nitrate d'argent selon le protocole classique et l'autre selon le protocole défini par l'équipe de Rabilloud, le sucre choisi étant le galactose. Dans les deux cas, la bande d'intérêt a pu être visualisée : la sensibilité des deux colorations est donc bien identique. Chacune des bandes a alors été excisée puis incubée avec une solution de trypsine. Les spectres MS obtenus une fois les peptides extraits et les solutions peptidiques dessalées et concentrées sur des colonnes Zip-Tips sont présentés Figure 55.

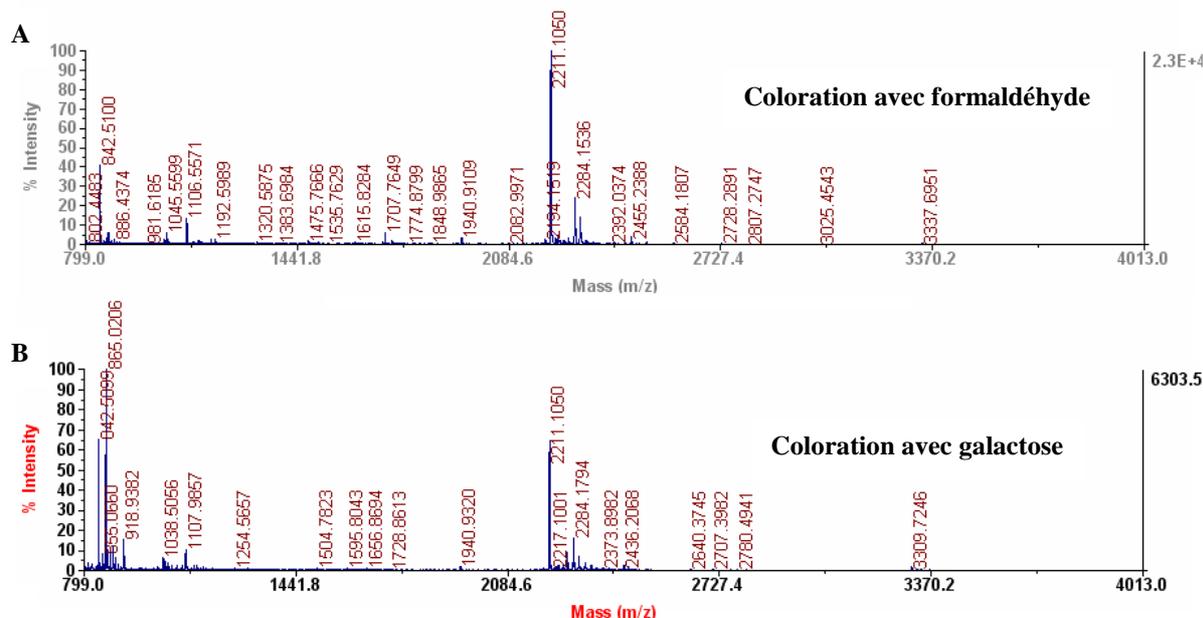


Figure 55. Spectres MS obtenus après concentration des digestats

Le protocole utilisant le galactose comme réducteur (spectre B) n'a pas permis d'obtenir un spectre MS contenant davantage de pics que la coloration utilisant le formaldéhyde (spectre A). Une interrogation restreinte à l'espèce *Rattus* a tout de même été tentée à partir des 50 plus grands pics présents dans les deux spectres. Le logiciel MASCOT a suggéré dans les deux cas une correspondance avec une protéine de signalisation de la famille des protéines Ras (M = 23,5 kDa). Nous avons tenté de confirmer l'identité des 4 peptides ayant permis de reconnaître cette protéine. Les mêmes problèmes que précédemment ont cependant été rencontrés : soit les spectres MS-MS contenaient trop peu de pics, soit ils comportaient un important bruit de fond. Ainsi, l'utilisation d'une coloration argentique sans formaldéhyde n'a pas permis d'augmenter significativement la quantité de matériel analysable par spectrométrie de masse.

iii. Utilisation de nouvelles sondes

Etant donné qu'aucune des démarches effectuées avec la sonde **ITB₅-P₁** n'a permis d'obtenir une quantité de matériel suffisante pour que la protéine cible puisse être identifiée, deux nouvelles sondes ont été synthétisées. Basées sur **ITB₅** et comportant le même groupement photoactivable qu'**ITB₅-P₁**, ces nouvelles sondes ont été conçues de sorte à faciliter le décrochage de la protéine cible des billes d'agarose-Streptavidine. La synthèse de la sonde **ITB₅-P₂** a consisté à remplacer la molécule de Biotine présente dans la première sonde par une molécule de Desthiobiotine, un métabolite de la Biotine présentant une affinité moindre pour la Streptavidine²⁰ (Kd ~ 10⁻¹² M / Kd ~ 10⁻¹⁵ M). Quant à la sonde **ITB₅-P₃**, elle a été fonctionnalisée avec un bras espaceur pouvant être clivé dans des conditions « douces » suite à la capture de la protéine cible sur les billes.

Synthèse d'une sonde desthiobiotinylée **ITB₅-P₂**

La synthèse de la sonde desthiobiotinylée **ITB₅-P₂** (cf. Schéma 14) est très similaire à celle de la sonde **ITB₅-P₁**. La Desthiobiotine a d'abord été activée par du *N*-hydroxysuccinimide en présence de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide dans du DMF (Schéma 13). Le produit **28** a ainsi été obtenu avec un rendement quantitatif. Celui-ci a ensuite été couplé à de l'acide 6-aminocaproïque en présence de triéthylamine pour obtenir le bras desthiobiotinylé **29** avec un rendement de 35 %.

La principale différence avec la Biotine a été l'absence de précipitation du composé **29** au cours de la réaction de couplage. Une telle précipitation n'a été obtenue que lorsque le composé a été repris dans du dichlorométhane et une solution de chlorure d'ammonium saturée dans le but d'éliminer le *N*-hydroxysuccinimide. Le faible rendement obtenu lors de la deuxième étape est essentiellement lié au passage d'une partie du produit **29** en phase aqueuse. Nous avons bien tenté d'obtenir davantage de produit en extrayant cette phase avec de l'acétate d'éthyle mais seul un mélange produit / *N*-hydroxysuccinimide a été récupéré. Le produit ayant toutefois été obtenu en quantité suffisante pour pouvoir continuer la synthèse, nous n'avons pas essayé d'optimiser davantage le traitement de cette réaction de couplage.

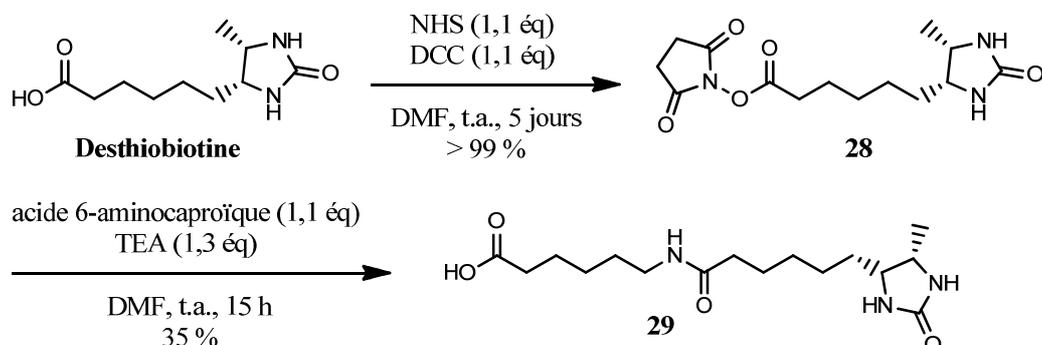


Schéma 13. Synthèse du bras desthiobiotinylé

Le produit **29** a ensuite été couplé au composé **27** correspondant à l'inhibiteur **ITB₅** couplé à une trifluorométhylphényldiazirine (cf. partie 3.2.d) *ii*, p.71). Comme pour la sonde biotinylée, la réaction de couplage a été réalisée dans du DMSO en présence d'HATU et de *N,N*-diisopropyléthylamine (Schéma 14). La sonde **ITB₅-P₂** a ainsi été obtenue avec un rendement de 79 % après chromatographie.

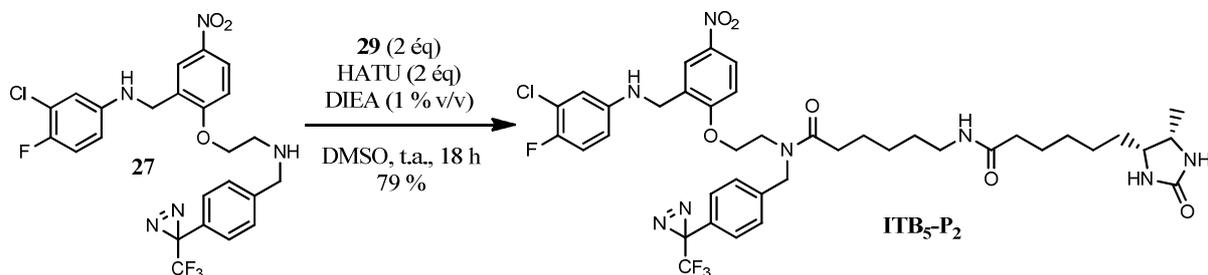


Schéma 14. Synthèse de la sonde **ITB₅-P₂**

Synthèse d'une sonde clivable **ITB₅-P₃**

Comme nous avons pu le voir dans le 1^{er} chapitre de ce manuscrit, de nombreux bras clivables ont été développés soit pour éluer les protéines dans des conditions plus douces, soit pour résoudre le problème d'irréversibilité de l'interaction Biotine-Streptavidine. Au départ, nous pensions en tester deux, l'un contenant un pont disulfure et l'autre étant basé sur un composé diazobenzénique. Pour le premier, nous avons commandé un acide commercial déjà activé par du *N*-hydroxysuccinimide. Cet acide comportait à la fois une molécule de Biotine et un pont disulfure (Schéma 15). La réaction de couplage entre ce composé et le composé **27** n'a toutefois pas fonctionné et compte-tenu du temps qu'il nous restait, nous avons finalement décidé de nous focaliser sur la synthèse de la sonde **ITB₅-P₃** comportant un bras diazobenzène.

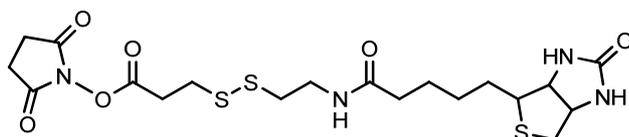


Schéma 15. Bras biotinylé commercial comportant un pont disulfure

La synthèse de la sonde **ITB₅-P₃** (cf. Schéma 20) a été largement inspirée par les travaux de Matthew Bogyo²¹. Le bras clivable a été synthétisé en une seule étape comportant trois réactions successives (Schéma 16). L'amine aromatique de l'acide 4-aminobenzoïque a d'abord été transformée en sel de diazonium en milieu acide à l'aide de nitrite de sodium. Ce sel de diazonium a ensuite été couplé au cycle aromatique de la tyramine (4-hydroxyphényléthylamine) en milieu légèrement basique. Une fois le lien diazo formé, la Biotine activée par du *N*-hydroxysuccinimide (composé **23**) a été additionnée pour former le composé **30**. Le composé obtenu précipite dès que le milieu est acidifié. Il a donc été récupéré par simple filtration mais avec une pureté de seulement 80 à 85 %. Etant donné son insolubilité dans tous les solvants organiques excepté le DMSO, la purification de ce composé s'annonçait difficile. Nous avons donc tenté dans un premier temps de le coupler au composé **27** sans autre purification.

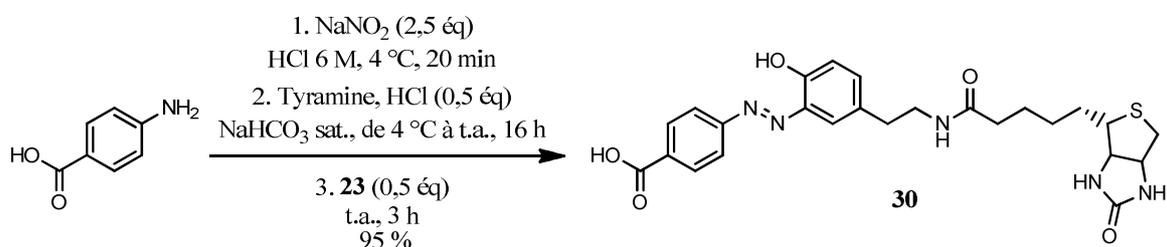


Schéma 16. Synthèse du composé 30

La réaction de couplage a été réalisée dans les conditions qui avaient déjà permis d'obtenir les sondes **ITB₅-P₁** et **ITB₅-P₂** (Schéma 17). Ces conditions n'ont cependant pas permis d'observer la formation de la sonde souhaitée. Nous avons alors purifié un échantillon du produit **30** par HPLC et engagé le composé pur obtenu dans une nouvelle réaction de couplage mais cela n'a pas donné davantage de résultats. Les impuretés présentes dans le précipité n'étaient donc pas la cause de cette absence de réaction.

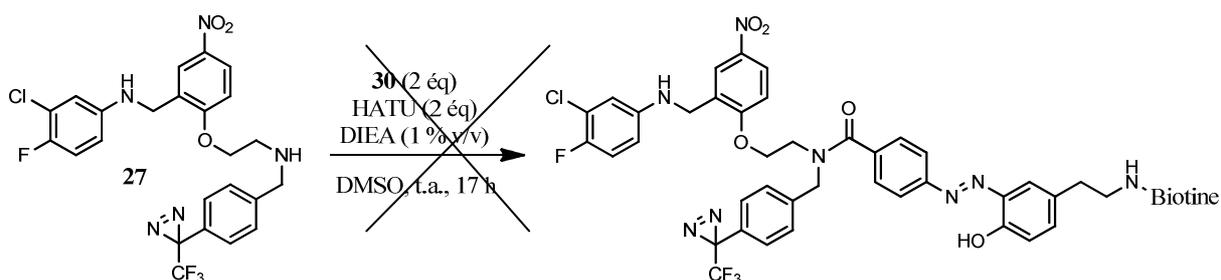


Schéma 17. Premier essai de couplage entre le composé 27 et le bras clivable

L'absence de réaction avait davantage de chances d'être liée à la faible réactivité de l'acide benzoïque. Nous avons donc fait réagir le composé **30** avec une amine moins encombrée, la glycine *tert*-butyl ester, en présence d'HATU et de *N,N*-diisopropyléthylamine (Schéma 18). Cette fois la réaction a bien eu lieu. Le produit **31** a été obtenu avec une pureté supérieure à 95 % et un rendement faible (14 %) mais suffisant pour que l'on puisse continuer la synthèse de la sonde.

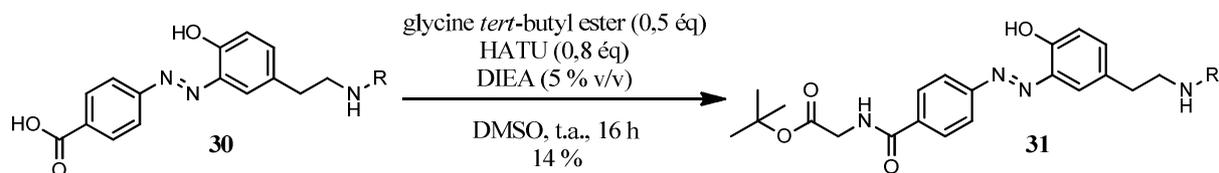


Schéma 18. Synthèse du composé 31 (R = Biotine)

Pour que ce nouveau bras clivable puisse être couplé au composé **27**, la fonction acide devait être déprotégée. Deux conditions ont été testées : un mélange dichlorométhane/TFA 50/50 (hydrolyse acide) et 6 équivalents d'hydroxyde de lithium (saponification) dans un mélange THF/MeOH/H₂O 4/2/1. Les deux réactions ont fonctionné mais la saponification a produit moins de produits secondaires. C'est pourquoi le composé **32** a finalement été synthétisé par saponification du composé **31** (Schéma 19). L'acide **32** étant insoluble dans la plupart des solvants organiques, il a facilement été récupéré par simple filtration après acidification du mélange et ajout de dichlorométhane (rendement quantitatif).

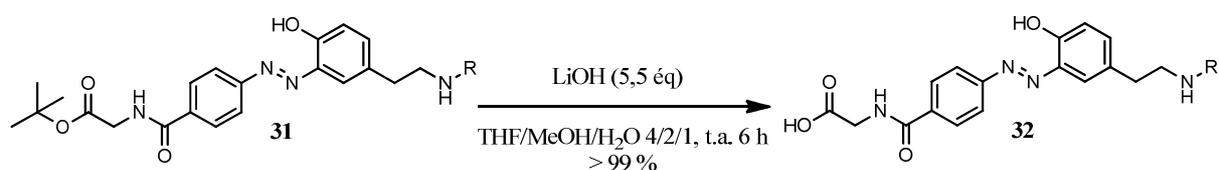


Schéma 19. Synthèse du composé 32 (R = Biotine)

La réaction de couplage avec le composé **27** a alors été retentée (Schéma 20) et cette fois nous avons effectivement pu observer la formation de la sonde **ITB₅-P₃**. La sonde a été obtenue avec un rendement de 37 %, soit un rendement plus faible que ceux que nous avons obtenus pour les deux premières sondes (55 % pour **ITB₅-P₁** et 79 % pour **ITB₅-P₂**). Du fait des faibles quantités de produit dont nous disposions, nous n'avons utilisé ici qu'un seul équivalent d'acide et d'HATU, ce qui peut peut-être expliquer ce résultat. La quantité de sonde était toutefois suffisante pour que l'on puisse tester son activité inhibitrice et savoir si la quantité de protéine cible récupérée suite à l'expérience de capture sur billes pouvait être supérieure à celle obtenue avec la sonde **ITB₅-P₁**.

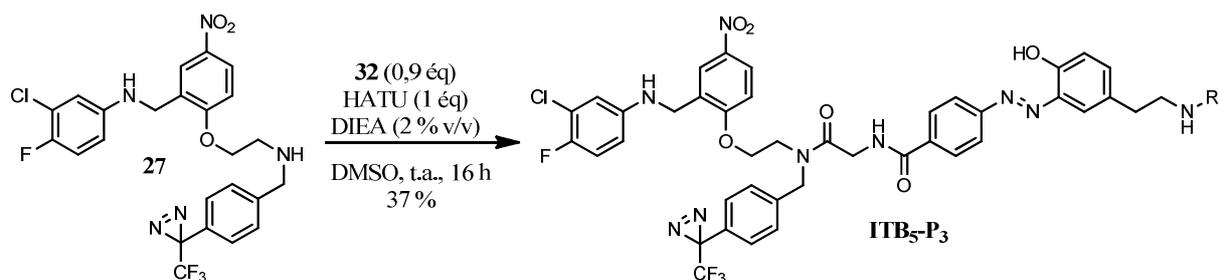


Schéma 20. Couplage peptidique ayant permis d'obtenir la sonde **ITB₅-P₃** (R = Biotine)

Evaluation de l'activité biologique des nouvelles sondes

La capacité des sondes **ITB₅-P₂** et **ITB₅-P₃** à inhiber le transport d'iodure a été évaluée grâce au test cellulaire déjà utilisé pour tester l'activité biologique de la première sonde. Une IC₅₀ de 0,03 μM a ainsi été obtenue pour la sonde **ITB₅-P₂**. La sonde desthiobiotinylée s'est donc révélée être aussi active que l'inhibiteur **ITB₅** (IC₅₀ = 0,04 μM) et 30 fois plus active que la sonde **ITB₅-P₁** (IC₅₀ = 0,9 μM). Nous pensons que cette différence d'activité est principalement liée à la plus grande solubilité de la sonde desthiobiotinylée, amélioration que nous avons observée tant dans certains solvants organiques qu'en milieu aqueux. L'activité qui a été obtenue pour la sonde **ITB₅-P₃** (IC₅₀ = 1 μM) est, quant à elle, similaire à celle de la sonde **ITB₅-P₁**.

Expériences de photomarquage

Une fois l'activité des deux nouvelles sondes contrôlée, des expériences de photomarquage ont été réalisées afin de vérifier si ces sondes permettaient de marquer spécifiquement la même protéine que la sonde **ITB₅-P₁**. Pour cela, des échantillons de cellules ont été irradiés 4 min en absence de sonde, en présence de sonde seule ou en présence de sonde et de compétiteur **ITB₅**. Pour comparaison, un échantillon de cellules a été dans chaque cas irradié en présence de la sonde **ITB₅-P₁**. Une fois les cellules lysées et les concentrations en protéines déterminées par dosage BCA, 40 µg de protéines ont été prélevés pour chaque condition de photomarquage testée. Ces protéines ont été déposées sur un gel SDS-PAGE à 12 % pour être analysées en Western-blot (Figure 56).

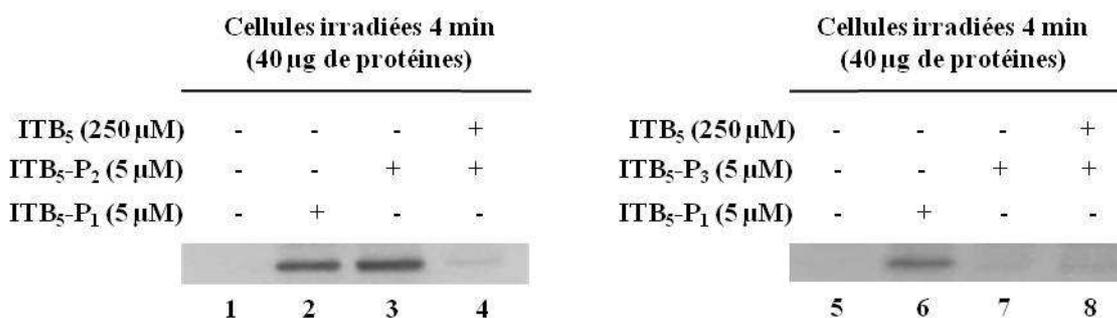


Figure 56. Expériences de photomarquage réalisées avec les sondes **ITB₅-P₁**, **ITB₅-P₂** et **ITB₅-P₃**

Les résultats obtenus avec la sonde desthiobiotinylée **ITB₅-P₂** montrent que cette sonde marque bien la même protéine qu'**ITB₅-P₁**. Il semble même que la sonde desthiobiotinylée permette de photomarquer deux fois plus de protéine d'intérêt que la sonde biotinylée (comparaison des pistes 2 et 3). Ce résultat est cohérent avec l'augmentation d'activité observée auparavant. Il conforte l'hypothèse selon laquelle le composé **ITB₅-P₂** a une activité inhibitrice supérieure au composé **ITB₅-P₁** du fait de sa plus grande solubilité, cette solubilité permettant à une plus grande quantité de composé d'atteindre la protéine cible et donc de la marquer. On peut constater que le marquage de la protéine par **ITB₅-P₂** est totalement spécifique puisque la bande d'intérêt n'est visible ni en absence de sonde (piste 1), ni en présence du compétiteur **ITB₅** (piste 4).

Le film photo obtenu pour la sonde **ITB₅-P₃** semble indiquer que cette sonde ne permet pas de marquer la protéine cible (comparaison des pistes 6 et 7). Une inefficacité de marquage n'est toutefois pas la seule explication possible à l'absence de bande en présence de sonde clivable. Il se peut en effet que l'étiquette Biotine ait été perdue au cours de l'expérience et que par conséquent la protéine marquée ne puisse plus être visualisée au moyen de Streptavidine-HRP. Le clivage de la liaison diazo peut avoir eu lieu soit au moment de l'irradiation, soit lors de l'ébullition à 95 °C dans du Laemmli destinée à dénaturer les protéines avant de les faire migrer sur gel. La première hypothèse est peu probable. Différentes applications des composés de type diazobenzène reposent en effet sur la capacité de ces composés à passer d'une conformation trans à 500 nm à une configuration cis à 380 nm^{22,23,24}. Il est donc plus probable que le bras clivable ait subi une isomérisation lors de l'irradiation qu'une coupure. Une perte de l'étiquette Biotine lors des traitements effectués en vue d'une analyse par Western-blot paraît par contre assez vraisemblable puisque le tampon Laemmli est un milieu fortement réducteur et que la liaison diazo est décrite comme étant clivable par un réducteur doux. Dans ce cas, une expérience de capture sur billes Streptavidine (réalisée sans lavages au Laemmli) suivie de la coloration au nitrate d'argent des protéines éluées devrait permettre de visualiser la protéine marquée par la sonde **ITB₅-P₃**.

Expériences de capture sur billes

La capacité de la sonde desthiobiotinylée à photomarquer la protéine cible d'**ITB₅** ayant été démontrée, nous pouvions comparer les quantités de protéine cible obtenues après l'expérience de capture sur billes selon la sonde utilisée. Deux lots de cellules ont donc été irradiés 4 min en présence d'**ITB₅-P₁** ou d'**ITB₅-P₂**. 1 mg de protéines issues de chacune de ces conditions a ensuite été incubé avec des billes d'agarose-Streptavidine. Etant donné que l'affinité de la sonde **ITB₅-P₂** pour les billes Streptavidine est moindre, la quantité de billes utilisée avec cette sonde a été multipliée par 2. Une affinité moindre pouvant conduire à la perte de la protéine d'intérêt en cas de lavages trop drastiques, ces derniers ont aussi été adaptés. Le nouveau protocole a consisté à simplement vortexer les billes une dizaine de secondes dans 800, 400 et 200 μ L de PBS-SDS (0,1 %) puis à les incuber dans du tampon Laemmli à 40 °C seulement. L'analyse de prélèvements en Western-blot a permis de montrer que ces lavages ne conduisent pas au décrochage de la protéine cible (non montré). Cette protéine a enfin été éluée grâce à une incubation à 95 °C dans du tampon Laemmli contenant 3 mM de Biotine. Les éluats obtenus ont été déposés sur un gel SDS-PAGE à 12 % pour être colorés au nitrate d'argent (Figure 57, pistes 1 et 2). Des prélèvements de 3 % (v/v) ont été analysés parallèlement en Western-blot pour vérifier l'efficacité de la capture (Figure 57, comparaison pistes L et S) et pour estimer la proportion de protéine photomarkée récupérée dans l'éluat final (Figure 57, comparaison pistes L et E).

Une expérience de capture a également été réalisée avec la sonde **ITB₅-P₃** afin de déterminer si l'absence de signal observée en Western-blot suite aux expériences de photomarkage était liée à une perte de l'étiquette Biotine ou à une absence de marquage de la protéine cible. Deux échantillons d'1 mg de protéines issues de cellules irradiées en présence d'**ITB₅-P₁** ou d'**ITB₅-P₃** ont ainsi été incubés avec des billes d'agarose-Streptavidine. Dans le cas des échantillons photomarkés en présence d'**ITB₅-P₁**, les billes ont été lavées en suivant le protocole de lavages complet. Dans le cas de la sonde clivable, les billes ont été lavées en suivant le protocole défini par Matthew Bogyo et son équipe²⁵. L'éluat finale a été réalisée pour la sonde **ITB₅-P₁** à 95 °C dans du tampon Laemmli contenant 3 mM de Biotine (Figure 57, piste 3). Quant à la sonde **ITB₅-P₃**, nous avons d'abord élué la protéine cible par deux incubations successives de 15 min à température ambiante dans une solution de Na₂S₂O₄ à 50 mM²⁵ (Figure 57, piste 4) puis à 95 °C dans une solution de Biotine à 3 mM dans le Laemmli (Figure 57, piste 5) pour visualiser les protéines non décrochées par le dithionite de sodium. Tous les éluats finaux ont été déposés sur un gel SDS-PAGE à 12 % pour être colorés au nitrate d'argent.

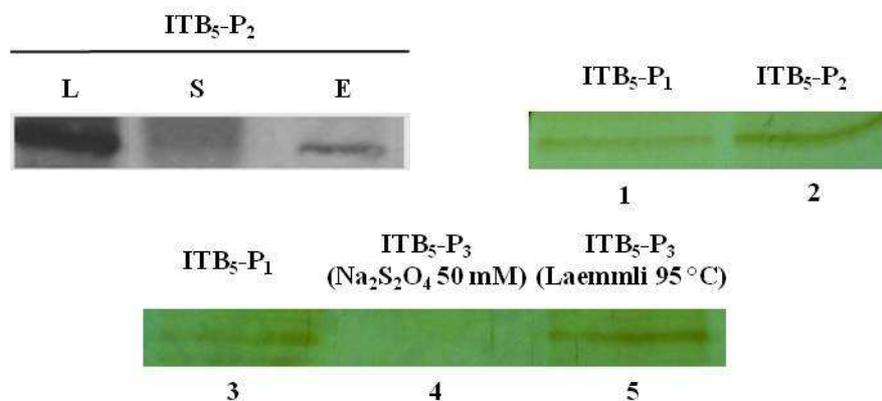


Figure 57. Western-blot et gels SDS-PAGE colorés au nitrate d'argent obtenus suite à des expériences de capture sur billes. La sonde utilisée pour photomarquer la protéine d'intérêt est indiquée dans chaque cas. **L** : 3 % d'un lysat contenant 1 mg de protéines issues de cellules irradiées en présence d'**ITB₅-P₂**, **S** : 3 % du surnageant récupéré après l'incubation du lysat L avec 30 μ L de billes, **E** : éluat final.

Les résultats obtenus en Western-blot avec la sonde desthiobiotinylée **ITB₅-P₂** montrent que la multiplication des billes par 2 a été suffisante pour que 90 % de la protéine photomarkée par cette sonde soit captée par les billes (comparaison pistes L et S). Ils indiquent également que la sonde desthiobiotinylée a permis d'obtenir dans 3 % de l'éluat final une quantité de protéine détectable par la Streptavidine-HRP (piste E), ce qui n'était pas le cas auparavant avec la sonde **ITB₅-P₁**. La quantité de protéine cible récupérée suite à l'expérience de capture a donc été augmentée. Ce résultat a été confirmé par la coloration au nitrate d'argent des protéines contenues dans les éluats finaux obtenus avec les sondes **ITB₅-P₁** et **ITB₅-P₂** (pistes 1 et 2). Le gel montre en effet que la sonde desthiobiotinylée permet d'obtenir une quantité de protéine d'intérêt deux à trois fois plus importante (piste 2) que la sonde biotinylée (piste 1) : un résultat encourageant, même si la quantité de protéine cible obtenue après élution reste faible comparée à la quantité de protéine initialement photomarkée (comparaison des pistes L et E).

Le gel obtenu avec les sondes **ITB₅-P₁** et **ITB₅-P₃** montre qu'une élution dans du Laemmli à 95 °C permet de décrocher la protéine cible de billes ayant été incubées avec un lysat provenant de cellules irradiées en présence de la sonde clivable (piste 5). La sonde **ITB₅-P₃** permet donc bien de photomarker la protéine d'intérêt et de l'isoler à l'aide de billes Streptavidine. Cela confirme l'hypothèse selon laquelle la protéine marquée n'a pas été visualisée en Western-blot parce que l'étiquette Biotine a été perdue lors des traitements effectués avant d'analyser les échantillons en Western-blot. La protéine d'intérêt n'a cependant pas été visualisée dans l'échantillon obtenu après incubation des billes avec du dithionite de sodium (piste 4). Ce réducteur ne semble donc pas permettre, dans notre cas, de cliver sélectivement la protéine photomarkée. Par ailleurs, la quantité de protéine obtenue après élution est identique à celle obtenue avec la sonde desthiobiotinylée (comparaison pistes 2 et 5). La sonde **ITB₅-P₃** n'apporte donc aucun avantage particulier par rapport à la sonde **ITB₅-P₂**. De plus, aucune étape intermédiaire du protocole de capture sur billes ne peut être contrôlée en Western-blot lorsque cette sonde est utilisée. Nous avons donc décidé de nous focaliser sur la sonde desthiobiotinylée **ITB₅-P₂** et d'abandonner la sonde **ITB₅-P₃**.

iv. Exploitation de la sonde desthiobiotinylée

Multiplication par 4 des quantités de protéines

Comme nous venons de le voir, la sonde desthiobiotinylée nous a permis d'isoler deux à trois fois plus de protéine cible, ce qui nous a amenés à une quantité de protéine proche de 30 ng. Néanmoins, l'analyse par spectrométrie de masse de la protéine présente dans la bande obtenue avec cette sonde (Figure 57, piste 2) n'a pas permis d'obtenir davantage de résultats que précédemment, les seuls signaux significatifs restant ceux de la trypsine et des kératines. La quantité de protéine cible n'était donc toujours pas suffisante pour que cette protéine puisse être identifiée par spectrométrie de masse.

Il fallait donc trouver un moyen pour réaliser l'expérience de capture sur billes en partant d'une quantité de protéines totales au moins 3 fois plus importante. Multiplier la quantité de protéine cible par 3 devait en effet permettre de visualiser cette protéine sur un gel coloré par une variante du bleu de Coomassie²⁶ que nous avons testée et qui avait permis de détecter jusqu'à 50 ng de BSA. Multiplier les quantités de protéines implique d'augmenter le volume de toutes les solutions utilisées au cours de l'expérience, y compris la solution d'élution. Or, le volume d'échantillon pouvant être déposé sur un gel SDS-PAGE était limité par la configuration de notre système d'électrophorèse. Nous avons alors essayé de déposer l'échantillon en plusieurs fois en enclenchant le courant électrique quelques minutes après chaque dépôt pour faire entrer l'échantillon dans le gel de concentration. Pour laisser le temps aux dépôts successifs de ne former qu'un seul échantillon, la taille du gel de concentration a été doublée.

Un premier test a été réalisé avec 4 mg de protéines issues de cellules irradiées en présence de la sonde **ITB₅-P₂**. Ces protéines ont été incubées avec 120 µL de billes d'agarose-Streptavidine. Les billes ont ensuite été vortexées plusieurs fois dans du PBS-SDS (0,1 %) puis elles ont été incubées dans du Laemmli à 40 °C. Les protéines encore en interaction avec les billes ont enfin été décrochées par une incubation à 95 °C dans du Laemmli contenant 3 mM de Biotine (200 µL). L'ensemble de l'échantillon, billes comprises, a été déposé en 5 fois sur un gel SDS-PAGE à 12 %. Une gamme de trypsine allant de 20 à 80 ng a aussi été déposée pour estimer la quantité de protéine isolée. La migration terminée, le gel a été coloré au nitrate d'argent (Figure 58).

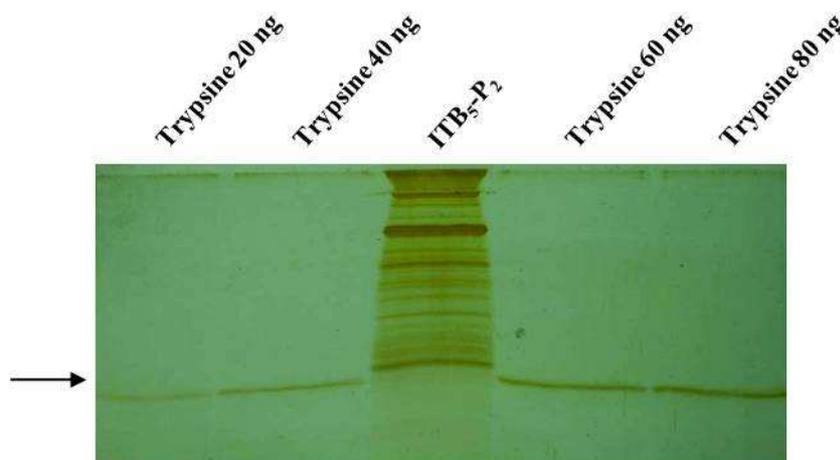


Figure 58. Gel SDS-PAGE, coloré au nitrate d'argent, obtenu après incubation de 4 mg de protéines issues de cellules irradiées en présence d'**ITB₅-P₂** avec 120 µL de billes d'agarose-Streptavidine (la flèche indique la position de la protéine photomarkée)

D'après le gel obtenu, déposer l'échantillon en plusieurs fois ne l'empêchait pas de se comporter comme un seul échantillon. La procédure de dépôt décrite ci-dessus pouvait donc être utilisée pour déposer jusqu'à 200 µL de surnageant + 120 µL de billes sur nos mini-gels. Sur le gel de la Figure 58, une bande intense a clairement pu être visualisée juste au-dessus de la gamme de trypsine, là où la protéine cible devait se trouver. Etant donné que les intensités de coloration des bandes correspondant à 60 et 80 ng de trypsine sont très similaires, il est difficile d'évaluer précisément la quantité de protéine cible ayant été isolée. Cette quantité a toutefois été estimée comme étant proche de 80 ng, ce qui représentait une multiplication par 8 par rapport aux 10 ng que nous avons obtenu lors du premier essai d'identification. Partir de 4 mg de protéines issues de cellules irradiées en présence de sonde **ITB₅-P₂** permettait donc bien d'obtenir des quantités de protéines détectables suite à une coloration au bleu de Coomassie.

Au cas où les quantités obtenues seraient suffisantes pour qu'une identification puisse être réalisée malgré la coloration au nitrate d'argent, la bande correspondant à la protéine cible a été excisée et soumise à une digestion trypsique. Les peptides obtenus ont été extraits du gel puis analysés par spectrométrie de masse. 7 protéines dont la masse pouvait correspondre à la position de la bande sur le gel ont été suggérées par Mascot lors des différentes interrogations tentées : un régulateur de protéine G (RGS19, M = 24,7 kDa), la chaîne alpha 3 de la tropomyosine (TPM3, M = 29,0 kDa), une protéine contenant un domaine IQ (IQCF3, M = 25,0 kDa), une sous-unité du protéasome (PSA7, M = 28,3 kDa), une protéine de signalisation (RAB3A, M = 25,0 kDa) et deux enzymes (CAH3, M = 29,4 kDa et DHRS4, M = 29,8 kDa). Ces protéines étaient cependant toutes associées à un score non significatif et aucune d'entre elles n'a pu être confirmée par des expériences de MS-MS.

Obtention d'un gel coloré au bleu de Coomassie

L'expérience précédente a montré qu'extraire la protéine cible depuis un lysat contenant 4 mg de protéines issues de cellules irradiées en présence de la sonde **ITB₅-P₂** permet d'obtenir environ 80 ng de protéine cible. Colorés au nitrate d'argent, ces 80 ng de protéine n'ont pas permis d'obtenir une identification fiable. Cette quantité était toutefois suffisante pour réitérer l'expérience de capture précédente et tenter de colorer l'échantillon après migration au bleu de Coomassie²⁶. Cette fois l'expérience a été réalisée avec 3 lysats cellulaires différents, le premier provenant de cellules irradiées en absence de sonde, le deuxième de cellules irradiées en présence de sonde seule et le troisième de cellules irradiées en présence de sonde et de compétiteur. Une photo du gel obtenu est présentée Figure 59.

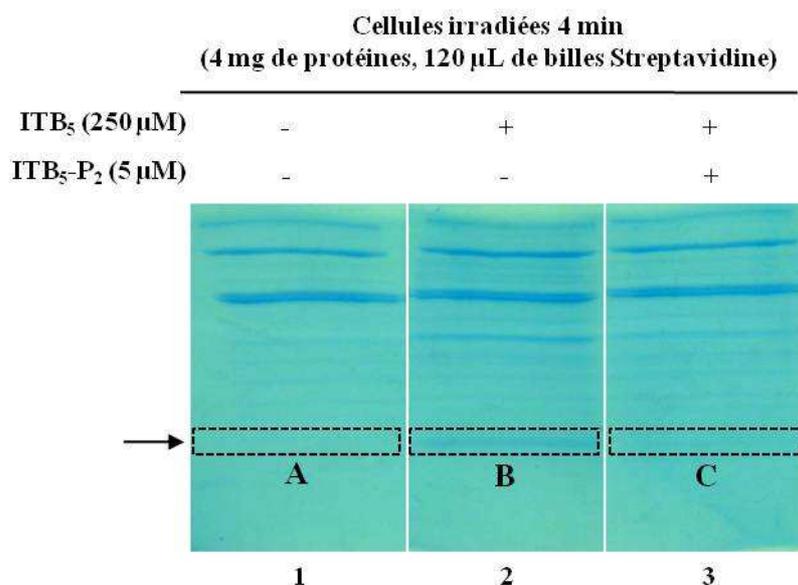


Figure 59. Gel coloré au bleu de Coomassie obtenu suite à des expériences de capture réalisées sur 4 mg de protéines. La flèche indique la position de la protéine photomarkée et les rectangles A, B et C la position des bandes qui ont été excisées par la suite.

Bien que le contraste obtenu entre les bandes et le fond du gel ne soit pas très important, une bande située dans la région de la protéine cible a pu être distinguée dans la piste 2. Cette bande correspond à la protéine photomarkée spécifiquement par la sonde **ITB₅-P₂** puisqu'elle est totalement absente du contrôle sans sonde (piste 1) et que son intensité est fortement réduite en présence d'un excès de compétiteur (piste 3). Cela n'est pas montré ici, mais une gamme de trypsine allant de 80 à 120 ng de protéine a également été déposée sur ce gel. Elle nous a permis d'estimer la quantité de protéine cible isolée à 100 ng, soit 10 fois plus que lors de notre premier essai de purification.

3.5.d) Identification de la protéine cible

Afin d'identifier la protéine cible, 3 bandes ont été excisées dans le gel de la Figure 59 : la bande B correspondant à la protéine d'intérêt et les bandes A et C situées au même niveau que la bande B mais dans les expériences contrôles sans sonde et avec compétiteur, respectivement. Dans les 3 cas, les fragments de gel excisés ont été lavés jusqu'à décoloration complète, lyophilisés puis réhydratés avec une solution de trypsine à 12 ng/µL. Après une nuit d'incubation à 37 °C, les peptides obtenus ont été extraits des fragments de gel, lyophilisés puis dessalés et concentrés au moyen de colonnes Zip-Tips. Le spectre de masse correspondant aux peptides issus de la bande B est indiqué Figure 60.A.

Pour la première fois, les pics correspondant à des peptides de kératines ont été à peine visibles et de nombreux pics intenses appartenant à d'autres protéines ont pu être observés. La

coloration au bleu de Coomassie a permis d'extraire du gel des peptides qui n'avaient encore jamais été observés, pas même lorsque nous avons tenté d'identifier la protéine cible à partir d'un lysat contenant 4 mg de protéines et que les protéines éluées avaient été colorées au nitrate d'argent (cf. Figure 58). On peut donc supposer que la protéine à laquelle ces nouveaux peptides appartiennent n'avait pas pu être identifiée jusque là du fait de la coloration au nitrate d'argent. Comme nous l'avons évoqué précédemment, cette coloration est connue pour perturber la digestion trypsique et rendre plus difficile l'extraction de certains peptides. Cette explication paraît donc plus que probable.

Lorsque le spectre A (Figure 60.A) a été utilisé pour interroger la base de données Swissprot, en restreignant les recherches à l'espèce *Rattus*, nous avons eu la surprise d'identifier 3 protéines avec un score significatif: deux isoformes d'une ADP/ATP translocase (ADT1 et ADT2) et la Mitochondrial Phosphate Carrier Protein (MPCP) (Figure 60.B). Prises individuellement, ces protéines sont associées à un score de 66 mais si on considère que l'échantillon correspond au mélange de deux de ces protéines, on obtient un score de 133, donc hautement significatif. Certains des peptides grâce auxquels ces protéines ont été identifiées sont indiqués sur le spectre MS de la Figure 60. Ils sont au nombre de 9 pour ADT1, 9 pour ADT2 et 8 pour MPCP. Comme on peut le constater, la majorité des pics correspondant dépasse largement le bruit de fond. Il y avait donc cette fois de grandes chances pour que des expériences de MS-MS permettent de confirmer l'identité de ces peptides.

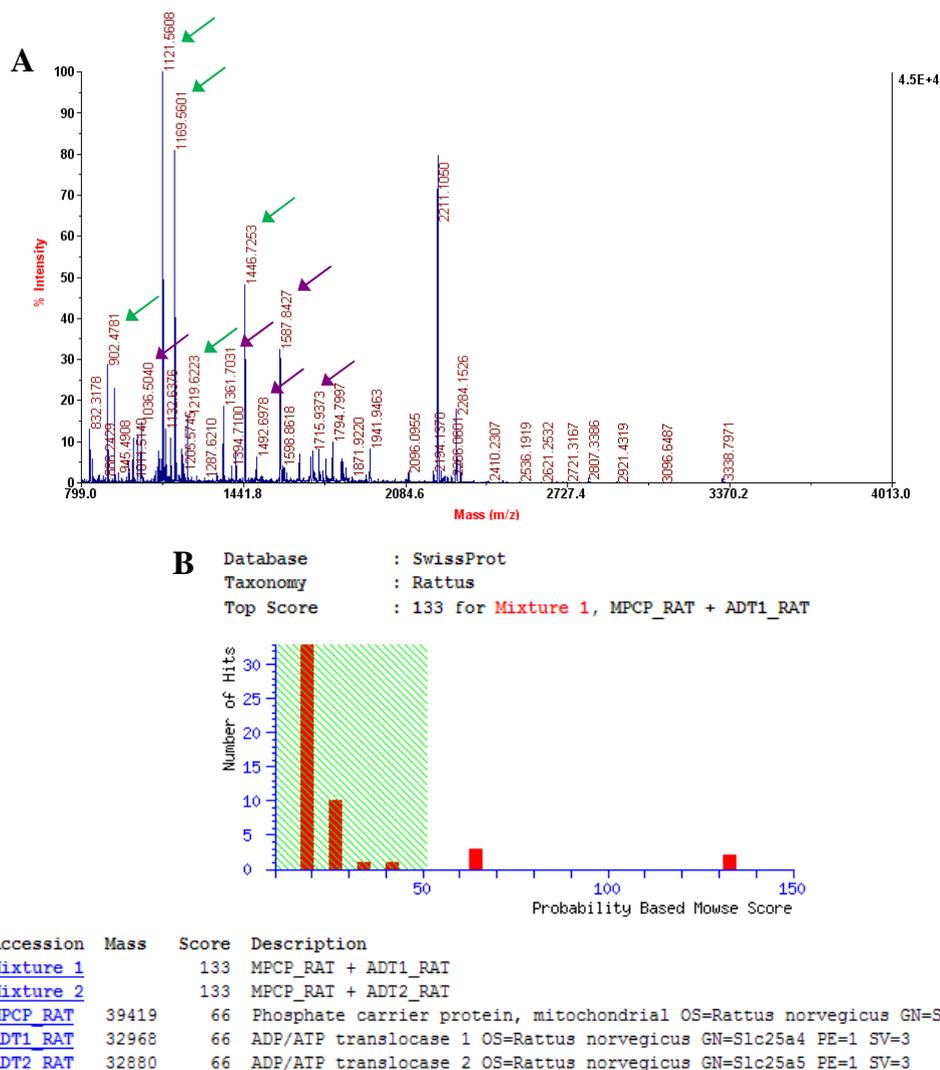


Figure 60. Identification des protéines présentes dans la bande d'intérêt.

A) Spectre MS obtenu à partir de la bande d'intérêt (flèche verte = peptide appartenant à ADT1 ou ADT2, flèche violette = peptide appartenant à MPCP), B) Résultat de l'interrogation MASCOT réalisée avec le spectre A

La liste des masses correspondant aux peptides ayant permis d'identifier les protéines ADT1, ADT2 et MPCP sont indiquées dans le Tableau 10. Chacun de ces peptides a été sélectionné pour être engagé dans des expériences de fragmentation et le score avec lequel les protéines ADT1, ADT2 et MPCP ont été retrouvées suite à ces expériences est indiqué dans chaque cas. Sur les 19 peptides listés ci-dessous, 15 ont permis de confirmer la présence dans l'échantillon des 3 protéines avec des scores compris entre 23 et 79, donc significatifs.

En analysant les spectres MS obtenus à partir des expériences contrôles sans sonde (Figure 59, bande A) et avec compétiteur (Figure 59, bande C), nous avons constaté que ces 15 peptides sont totalement absents de l'expérience contrôle sans sonde et qu'ils sont présents, mais avec des intensités plus faibles, dans l'expérience contrôle «de compétition». Pour que les protéines identifiées puissent correspondre aux protéines marquées par la sonde **ITB₅-P₂**, elles devaient être totalement absentes de l'expérience « sans sonde » et être présentes, mais en plus faible quantité, dans l'expérience «de compétition». D'après les données obtenues, les protéines ADT1, ADT2 et MPCP remplissent toutes ces deux conditions.

ADT1			ADT2			MPCP		
Peptide (Da)	Score MS-MS	Couverture de séquence	Peptide (Da)	Score MS-MS	Couverture de séquence	Peptide (Da)	Score MS-MS	Couverture de séquence
856,50	/	25 %	856,50	/	25 %	987,52	/	16 %
902,48	26		902,48	26		1036,51	41	
1004,54	45		1121,56	56		1196,50	38	
1136,66	37		1132,64	38		1361,70	47	
1169,56	67		1136,66	37		1492,70	45	
1219,62	35		1219,62	42		1587,84	40	
1446,73	65		1446,73	65		1715,93	23	
1739,92	79		1739,92	79		1941,93	4	
2284,15	/		2284,15	/				

Tableau 10. Peptides ayant permis d'identifier les protéines ADT1, ADT2 et MPCP

Les peptides ayant été confirmés par MS-MS sont indiqués en gras. Les pourcentages de couverture de séquence ne tiennent compte que de ces peptides. L'absence de score indique qu'aucune protéine n'a pu être identifiée à l'aide des données de fragmentation.

Suite à ces résultats, l'expérience complète a été réalisée une deuxième fois. Les protéines ADT1, ADT2 et MPCP ont à nouveau été identifiées lors de cette deuxième expérience et les peptides qui ont été reconnus sont les mêmes que ceux listés dans le Tableau 10. Encore une fois, les peptides confirmés par MS-MS se sont avérés être absents de l'expérience contrôle « sans sonde ». Il y a donc une très forte probabilité pour que les protéines ADT1, ADT2 et MPCP soient toutes les trois photomarkées par les sondes **ITB₅-P₁**, **ITB₅-P₂** et **ITB₅-P₃** et qu'elles correspondent donc à des cibles de l'inhibiteur **ITB₅**.

3.5.e) Discussion

Les travaux décrits dans ce chapitre ont conduit à identifier 3 protéines ciblées par l'inhibiteur **ITB₅** : deux isoformes d'une ADP/ATP translocase (ADT1 et ADT2) et un transporteur de phosphate (MPCP). Ces protéines appartiennent toutes les trois à la même famille de transporteurs mitochondriaux, la « Mitochondrial Carrier Family » ou MCF²⁷. Cette famille est constituée d'une vingtaine de protéines responsables du transport ou de

l'échange de métabolites à travers la membrane interne des mitochondries. La fonction première de la mitochondrie est de convertir l'énergie respiratoire en énergie chimique. Or, cette conversion ne peut avoir lieu que si un certain nombre de métabolites sont transportés et/ou échangés au travers des deux membranes de cet organite intracellulaire. Les protéines ADT1 et ADT2 ont pour fonction de catalyser l'échange d'ADP et d'ATP à travers la membrane interne des mitochondries et la protéine MPCP de co-transporter des groupements phosphates et des protons du cytosol vers la matrice mitochondriale.

Les protéines membres de la MCF sont majoritairement présentes sous la forme d'homodimères, chaque sous-unité présentant une masse d'environ 30 kDa. Les poids moléculaires des protéines que nous avons identifiées sont de 32,9 kDa pour ADT1 et ADT2 et de 39,4 kDa pour MPCP. Les séquences en acides aminés correspondantes sont présentées Figure 61. Ces masses sont légèrement supérieures à l'estimation que nous avons faite d'après la localisation de la bande sur le gel (entre 25 et 30 kDa). Déterminer le poids moléculaire d'une protéine en comparant sa migration à celle de protéines standards reste cependant peu précis. Lorsque la protéine identifiée est une protéine membranaire, comme c'est le cas ici, les différences de migration avec les protéines standards (généralement solubles) peuvent en effet être importantes. De plus, un certain nombre de modifications post-traductionnelles peuvent modifier la migration des protéines. Les modifications que subissent les protéines ADT1, ADT2 et MPCP ne sont pas encore toutes connues, mais on sait par exemple que les acides aminés 1 à 44 de la MPCP (cf. Figure 61) sont clivés dès lors que la protéine est correctement localisée sur la membrane interne des mitochondries²⁸. Cela produit une protéine fonctionnelle dont la masse d'environ 35 kDa se rapproche de la masse que nous avons estimée par gel SDS-PAGE. Les expériences de masse n'ont conduit à l'identification d'aucun peptide situé entre les acides aminés 1 à 44 de la MPCP. Il est donc probable que nos sondes n'aient marqué que la forme fonctionnelle de cette protéine.

ADT1

```

1 MGDQALSFLK DFLAGGIARA VSKTAVAPIE RVKLLLQVOH ASKQISAEEKQ
51 YKGIIDCVVR IPKEQGFLSF WRGNLANVIR YEPTQALNFA FKDKYKQIFL
101 GGVDRHKQFW RYFAGNLASG GAAGATSLCF VYPLDFARTR LAADVKGSS
151 QREFNGLGDC LTKIFKSDGL KGLYQGFVS VQGIIYRAA YFGVYDTAKG
201 MLPDPKNVHI IVSWMIAQSV TAVAGLVSYF FDTVRRRMMM QSGRKGADIM
251 YTGTVDCWRK IAKDEGRKAF FKGAWSNVLR GMGGAFVLVL YDEIKKYV

```

ADT2

```

1 MTDAAVSFAK DFLAGGVAAA ISKTAVAPIE RVKLLLQVOH ASKQITADKQ
51 YKGIIDCVVR IPKEQGVLSF WRGNLANVIR YEPTQALNFA FKDKYKQIFL
101 GGVDKRTQFW RYFAGNLASG GAAGATSLCF VYPLDFARTR LAADVKGAGA
151 EREFKGLGDC LVKIYKSDGI KGLYQGFNVS VQGIIYRAA YFGIYDTAKG
201 MLPDPKNTHI FISWMIAQSV TAVAGLTSYP FDTVRRRMMM QSGRKGTDIM
251 YTGTLDCWRK IARDEGGKAF FKGAWSNVLR GMGGAFVLVL YDEIKKYT

```

MPCP

```

1 MFSSVAHLAR ANPFNAPHLQ LVHDSVSGPRS PPGPPRRSRH LAAAVVEGYS
51 CEFGSMKYIA LCGFGGVLSG GLTHTAVVPL DLVKCRMVQD PQKYKGIFNG
101 FSITLKEDGV RGLAKGWAPT LIGYSMQGLC KFGFYEVKA LYSNILGEEN
151 TYLWRTSLYL AASASAEFFA DIALAPMEAA KVRIQTQPGY ANTLREAVPK
201 MYKEEGLNAF YKGVAPVWMR QIPYTMKFA CFERTVEALY KFWVPKPRSE
251 CTKAEQLVVT FVAGYIAGVF CAIVSHPADS VSVLNKEKG STASQVLQRL
301 GFRGVWKGLF ARIIMIGTLT ALQWFIYDSV KVFYRLPRPP PPEMPESLKK
351 KLGLTE

```

Figure 61. Séquence des protéines identifiées.

Séquences en rouge : séquence des peptides ayant permis d'identifier ADT1, ADT2 et MPCP. Marque verte : site de coupure conduisant à la production d'une protéine MPCP fonctionnelle.

Nous n'avons trouvé dans la littérature aucune donnée confirmant ou excluant la présence des protéines ADT1, ADT2 et MPCP dans la thyroïde. Les résultats que nous avons obtenus par spectrométrie de masse semblent donc être les premiers permettant d'affirmer que ces protéines sont exprimées dans des cellules FRTL-5. Nos expériences de photomarquage d'affinité ont démontré l'existence d'une interaction physique entre le composé **ITB₅** et les protéines ADT1, ADT2 et MPCP. Différentes expériences pourront être effectuées pour le confirmer : FRET, expériences de compétition avec un ligand radiomarqué, résonance plasmonique de surface, titration calorimétrique isotherme. Il sera par ailleurs intéressant, si les protéines identifiées peuvent être isolées, d'utiliser certaines de ces techniques pour accéder aux constantes d'affinité du composé **ITB₅** pour ces protéines.

Les résultats que nous avons obtenus grâce à nos expériences semblent suggérer un lien entre les protéines ADT1, ADT2 et MPCP et le transport d'iodures puisque le composé **ITB₅** ayant conduit à l'isolement de ces protéines permet d'inhiber le transport des ions iodures dans les cellules thyroïdiennes. L'identification des cibles d'**ITB₅** ayant eu lieu deux semaines avant la fin de ma thèse, nous n'avons pas eu le temps de faire beaucoup de recherches bibliographiques concernant l'existence d'un éventuel lien entre les protéines de la famille MCF et le transport d'iodures dans la thyroïde. Un certain nombre d'éléments permettent toutefois de penser que ce lien pourrait effectivement exister.

Le premier élément qui a attiré notre attention est la capacité de la TSH à réguler, dans des cellules FRTL-5, l'expression d'une protéine membre de la MCF présentant de fortes homologies de séquence avec l'ADP/ATP translocase et le transporteur de phosphate²⁹. Le deuxième élément concerne l'hormone thyroïdienne T3. Différentes études ont montré que les ADP/ATP translocases servent de récepteurs mitochondriaux à cette hormone^{30,31} et que la T3 module le transport des ions phosphates au sein des mitochondries³². Or, on sait que cette hormone agit aussi de manière rétroactive sur les cellules thyroïdiennes pour réguler sa production. La T3 pourrait donc également moduler le fonctionnement des ADP/ATP translocases et le transport de phosphate dans les cellules thyroïdiennes, cette modulation pouvant peut-être conduire à une diminution du transport d'iodure conduisant elle-même à une diminution de production des hormones thyroïdiennes. Un troisième élément intéressant est l'acide rétinoïque. Ce composé est décrit dans la littérature comme conduisant à une diminution à la fois d'expression et d'activité du symporteur sodium/iode dans les cellules non transformées telles que les cellules FRTL-5³³. Par ailleurs, l'équipe de Mampel a montré que l'acide rétinoïque est capable de se fixer sur une ADP/ATP translocase et d'inhiber sa fonction³⁴. On peut donc penser que la diminution d'expression et d'activité du NIS observée en présence d'acide rétinoïque est liée à l'inhibition de cette ADP/ATP translocase. Le lien que ces deux résultats permettent de faire entre le symporteur sodium/iode et les ADP/ATP translocases suggère en tout cas, tout comme nos résultats, que les ADP/ATP translocases sont impliquées d'une façon ou d'une autre dans la régulation du transport d'iodures.

Les résultats de nos recherches ainsi qu'une rapide étude bibliographique ont suggéré l'existence d'un lien entre les ADP/ATP translocases, un transporteur de phosphate et le transport d'iodure. Cela devra toutefois être confirmé par différentes expériences de validation fonctionnelle. Des inhibiteurs spécifiques ou des SiRNAs pourront par exemple être utilisés pour vérifier si l'invalidation des protéines ADT1, ADT2 et/ou MPCP conduit à une diminution du transport d'iodure et inversement, chacune des trois protéines pourra être surexprimée pour voir si cette surexpression est corrélée à une augmentation du transport d'iodures.

En parallèle des expériences évoquées ci-dessus seront réalisées des études fonctionnelles visant à déterminer comment le composé **ITB₅** module la fonction des protéines ADT1, ADT2 et MPCP et quel effet cette modulation peut avoir sur le fonctionnement de

mitochondries isolées ou de cellules entières. Ces expériences permettront de comprendre par quel(s) mécanisme(s) l'interaction d'**ITB₅** avec les protéines ADT1, ADT2 et MPCP conduit à une modulation du transport d'iodure. Une piste intéressante à explorer pourrait être la bifonctionnalité des ADTs qui sont capables soit de prendre en charge les échanges d'ADP et d'ATP au travers des membranes mitochondriales comme nous l'avons indiqué précédemment, soit de former dans ces membranes des pores induisant l'entrée en apoptose des cellules³⁵. Un certain nombre de composés interagissant avec les ADTs sont connus pour leur capacité à promouvoir l'activité pro-apoptotique de ces protéines. On peut donc faire l'hypothèse que l'interaction d'**ITB₅** avec ADT1 et ADT2 ait le même effet et que le transport d'iodure soit affecté par cette activité pro-apoptotique. Afin d'étudier cette hypothèse, une collaboration avec l'équipe du Dr. Catherine Brenner (faculté de pharmacie de Châtenay Malabry) est en train d'être mise en place.

3.6. Conclusion du chapitre 3

Lors de ma thèse, un test non radioactif permettant de connaître rapidement la quantité d'iodures captée par des cellules de thyroïde de rat en absence ou en présence de composés chimiques a été mis au point. Ce test a permis de déterminer l' IC_{50} d'inhibiteurs du transport d'iodure avec une bonne reproductibilité.

Grâce à ce test, l'activité inhibitrice de 184 analogues de l'inhibiteur **ITB₅** synthétisés par Lucie Pillette, étudiante en master 2, a pu être déterminée. De ces résultats, nous avons pu déduire que les groupements NO_2 et NH ainsi que les atomes de chlore et de fluor présents sur la molécule **ITB₅** sont importants pour l'activité de ce composé au contraire du groupement hydroxyle qui peut être alkylé sans que l'activité n'en soit affectée (IC_{50} de 0,02 μM au lieu de 0,04 μM). C'est donc *via* cette fonction qu'ont été greffés sur **ITB₅** une trifluorométhylphényldiazirine devant permettre de marquer la protéine cible d'**ITB₅** de manière covalente et une molécule de Biotine devant permettre d'extraire la protéine marquée des lysats cellulaires.

La sonde synthétisée, appelée **ITB₅-P₁**, s'est révélée suffisamment active ($IC_{50} = 0,9 \mu M$) pour que des expériences de photomarquage puissent être réalisées. Ces dernières ont permis d'observer le marquage spécifique d'une protéine dans des cellules vivantes. Cette protéine n'est en effet marquée que si la sonde **ITB₅-P₁** est présente et sous irradiation lumineuse et le marquage augmente avec la concentration de sonde et la durée d'irradiation. La protéine marquée a été extraite des lysats cellulaires grâce à des billes d'agarose fonctionnalisées par de la Streptavidine. L'optimisation du protocole de lavages a permis d'obtenir, après élution, un gel coloré au nitrate d'argent sur lequel la protéine cible a clairement pu être visualisée. L'utilisation d'un marqueur de poids moléculaire et d'une gamme de trypsine ont permis de situer la masse de la protéine entre 25 et 30 kDa et d'estimer la quantité de cible isolée à partir de 500 μg de lysat protéique à ~ 10 ng.

Cette quantité s'est révélée insuffisante pour que la protéine puisse être identifiée par spectrométrie de masse. Différentes expériences ont montré que la faible quantité de protéine cible récupérée après l'expérience de capture sur billes était liée à des difficultés pour décrocher la protéine cible des billes. Plusieurs conditions d'élution ont été testées avec la sonde **ITB₅-P₁** mais aucune n'a permis de décrocher davantage de cible. Deux autres sondes ont donc été synthétisées dans le but de faciliter l'élution de cette protéine. Dans la première (**ITB₅-P₂**), la Biotine a été substituée par de la Desthiobiotine afin de réduire l'affinité de la sonde pour la Streptavidine. Quant à la deuxième (**ITB₅-P₃**), elle a été fonctionnalisée par un bras biotinylé clivable dans des conditions « douces ».

La sonde **ITB₅-P₂** s'est révélée 30 fois plus active que notre première sonde ($IC_{50} = 0,03 \mu M$) tandis que la sonde **ITB₅-P₃** présente une activité similaire ($IC_{50} = 1 \mu M$). Toutes deux ont permis d'isoler une quantité de protéine cible supérieure à 10 ng mais aucun des éluats obtenus au fur et à mesure de l'expérience de capture n'a pu être contrôlé par Western-blot avec la sonde **ITB₅-P₃**. L'étiquette Biotine de cette sonde est en effet perdue dès lors que l'on dénature les protéines avant de les séparer sur gel d'électrophorèse. La sonde clivable **ITB₅-P₃** a donc été abandonnée. La capture sur billes de la protéine photomarkée par la sonde **ITB₅-P₂** à partir de 4 mg de protéines totales a permis d'isoler entre 80 et 100 ng de protéine d'intérêt et d'envisager pour la première fois de colorer les protéines éluées au bleu de Coomassie.

L'expérience a donc été réitérée en colorant cette fois le gel SDS-PAGE avec une variante du bleu de Coomassie permettant de détecter jusqu'à 50 ng de protéines. L'analyse par spectrométrie de masse de la bande correspondant à la protéine d'intérêt a permis d'identifier de façon certaine trois protéines appartenant toutes à la même famille de transporteurs mitochondriaux : deux isoformes d'une ADP/ATP translocase (ADT1 et ADT2) et un transporteur de phosphate (MPCP). L'absence des peptides ayant permis d'identifier ces 3 protéines dans l'expérience de capture réalisée sans sonde et la présence de ces peptides en plus faibles quantités dans l'expérience réalisée en présence de compétiteur **ITB₅** a permis d'affirmer que les protéines ADT1, ADT2 et MPCP sont toutes les trois marquées spécifiquement par la sonde **ITB₅-P₂**. Par conséquent, elles sont toutes les trois ciblées par le composé **ITB₅**.

Nos travaux ont permis de démontrer que le composé **ITB₅** se lie physiquement aux protéines ADT1, ADT2 et MPCP. Différentes expériences pourront être menées suite à cette thèse pour confirmer ce résultat (FRET, expériences de compétition avec un ligand radiomarké, résonance plasmonique de surface, titration calorimétrique isotherme). Nous n'avons trouvé aucun lien direct entre les trois protéines que nous avons identifiées et le transport d'iodure dans la littérature. Nos résultats suggèrent toutefois que ce lien existe puisque le composé **ITB₅** est capable d'inhiber le transport des ions iodures. D'autre part, une rapide étude bibliographique a mis en évidence un certain nombre d'éléments laissant penser qu'il existe effectivement un lien entre la fonction mitochondriale et la fonction thyroïdienne. Des expériences de validation fonctionnelle (utilisation d'inhibiteurs spécifiques ou de SiRNAs, surexpression des protéines...) seront menées pour tenter de corrélérer plus directement les protéines que nous avons identifiées au transport d'iodure. Parallèlement des études fonctionnelles seront réalisées afin de comprendre par quel processus l'interaction d'**ITB₅** avec les protéines ADT1, ADT2 et MPCP peut conduire à une modulation du transport d'iodure. Une collaboration avec l'équipe du Dr. Catherine Brenner (faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry) est envisagée pour les expériences portant sur les ADP/ATP translocases.

Bibliographie

- ¹ Ambesi-Impiombato F.S., Parks L.A., Coon H.G., Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, *77*, 3455-3459.
- ² Lecat-Guillet N., Merer G., Lopez R., Pourcher T., Rousseau B., Ambroise Y., A 96-well automated radioiodide uptake assay for sodium/iodide symporter inhibitors, *Assay Drug Dev. Tech.*, **2007**, *5*, 535-540.
- ³ Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J., Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflugers Arch.*, **1981**, *391*, 85-100.
- ⁴ Rhoden K.J., Cianchetta S., Duchi S., Romeo G., Fluorescence quantitation of thyrocyte iodide accumulation with the yellow fluorescent protein variant YFP-H148Q/I152L, *Anal. Biochem.*, **2008**, *373*, 239-246.
- ⁵ Dunn J.T., Crutchfield H.E., Gutekunst R., Dunn A.D., Two simple methods for measuring iodide in urine, *Thyroid*, **1993**, *3*, 119-123.
- ⁶ Sandell E.B., Kolthoff I.M., Chronometric catalytic method for the determination of microquantities of iodine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1934**, *56*, 1426.
- ⁷ Zhang J., Chung T.D.Y., Oldenburg K.R., A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high-throughput screening assays, *J. Biomol. Screen.*, **1999**, *4*, 67-73.
- ⁸ Lecat-Guillet N., Identification d'inhibiteurs du symporteur sodium-iodure par criblage à haut-débit, Université Paris XI, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage du CEA Saclay, **2006**, p. 40-48.
- ⁹ Waltz F., Pillette L., Ambroise Y., A non radioactive uptake assay for sodium iodide symporter function, *Anal. Biochem.*, **2010**, *396*, 91-95.
- ¹⁰ Lee J.C., Yuk J.Y., Cho S.H., Facile synthesis of alkyl phenyl ethers using cesium carbonate, *Synth. Commun.*, **1995**, *25*, 1367-1370.
- ¹¹ Verhaeghe E., Etude des mécanismes d'accumulation de l'iode chez l'algue brune *Laminaria digitata* et chez les mammifères, Université Paris XI, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage du CEA Saclay, **2007**, p. 210-211.
- ¹² Waltz F., Pillette L., Verhaeghe E., Ambroise Y., Synthesis and structure-activity relationships of a class of sodium iodide symporter function inhibitors, *ChemMedChem*, **2011**, *6*, 1-3.
- ¹³ Fujii T., Manabe Y., Sugimoto T., Ueda M., Detection of 210 kDa receptor protein for a leaf-movement factor by using novel photoaffinity probes, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 7874-7893.
- ¹⁴ Delfino J.M., Schreiber S.L., Richards F.M., Design, synthesis, and properties of a photoactivatable membrane-spanning phospholipidic probe, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 3458-3474.
- ¹⁵ Bayer E.A., Wilchek M., Insolubilized biotin for the purification of avidin, *Methods Enzymol.*, **1974**, *34*, 265-267.
- ¹⁶ Wilchek M., Bayer E.A., Biotin-containing reagents, *Methods Enzymol.*, **1990**, *184*, 123-138.
- ¹⁷ Ishii T., Ishikawa M., Miyoshi N., Yasunaga M., Akagawa M., Uchida K., Nakamura Y., Catechol type polyphenol is a potential modifier of protein sulfhydryls : development and application of a new probe for understanding the dietary polyphenol actions, *Chem. Res. Toxicol.*, **2009**, *10*, 1689-98.
- ¹⁸ Ryback J.N., Scheurer S.B., Neri D., Elia G., Purification of biotinylated proteins on Streptavidine resin : a protocol for quantitative elution, *Proteomics*, **2004**, *4*, 2296-2299.
- ¹⁹ Chevallet M., Luche S., Diemer H., Strub J.M., Van Dorsselaer A., Rabilloud T., Sweet silver : a formaldehyde-free silver staining using aldoses as developing agents, with enhanced compatibility with mass spectrometry, *Proteomics*, **2008**, *8*, 4853-4861.
- ²⁰ Hirsch J.D., Eslamizar L., Filanoski B.J., Malekzadeh N., Haugland R.P., Beechem J.M., Haugland R.P., Easily reversible desthiobiotine binding proteins : uses for protein labeling, detection, and isolation, *Anal. Biochem.*, **2002**, *308*, 343-357.
- ²¹ Verhelst S.H.L., Fonović M., Bogyo M., A mild chemically cleavable linker system for functional proteomic applications, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 1284-1286.
- ²² Banghart M., Borges K., Isacoff E., Trauner D., Kramer R.H., Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing, *Nat. Neurosci.*, **2004**, *7*, 1381-1386.
- ²³ Fortin D.L., Banghart M.R., Dunn T.W., Borges K., Wagenaar D.A., Gaudry Q., Karakossian M.H., Otis T.S., Kristan W.B., Trauner D., Kramer R.H., Photochemical control of endogenous ion channels and cellular excitability, *Nat. Methods*, **2008**, *5*, 331-338.
- ²⁴ Schierling B., Noël A.J., Wende W., Hien L.T., Volkov E., Kubareva E., Oretskaya T., Kokkinidis M., Römpf A., Spengler B., Pingoud A., Controlling the enzymatic activity of a restriction enzyme by light, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, *107*, 1361-1366.
- ²⁵ Fonović M., Verhelst S.H.L., Sorum M.T., Bogyo M., Proteomics evaluation of chemically cleavable activity-based-probes, *Mol. Cell. Prot.*, **2007**, *6*, 1761-1770.
- ²⁶ Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G.M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P.G., Blue silver : a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis, *Electrophoresis*, **2004**, *25*, 1327-1333.
- ²⁷ Kuan J., Saier M.H. Jr., The mitochondrial carrier family of transport proteins : structural, functional and evolutionary relationships, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **1993**, *28*, 209-233.

- ²⁸ Pratt R.D., Ferreira G.C., Pedersen P.L., Mitochondrial phosphate transport. Import of the H⁺/Pi symporteur and role of the presequence, *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 1276-80.
- ²⁹ Zarrilli R., Oates E.L., McBride W., Lerman M.I., Chan J.Y., Santisteban P., Ursini M.V., Notkins A.L., Kohn L.D., Sequence and chromosomal assignment of a novel cDNA identified by immunoscreening of a thyroid expression library : similarity to a family of mitochondrial solute carrier proteins, *Mol. Endocrinol.*, **1989**, 3, 1498-1508.
- ³⁰ Hafner R.P., Thyroid hormone uptake into the cell and its subsequent localisation to the mitochondria, *FEBS Lett.*, **1987**, 224, 251-256.
- ³¹ Sterling K., Thyroid hormone action : identification of the mitochondrial thyroid hormone receptor as adenine nucleotide translocase, *Thyroid*, **1991**, 1, 167-171.
- ³² Paradies G., Ruggiero F.M., Dinoi P., The influence of hypothyroidism on the transport of phosphate and on the lipid composition in rat-liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, 1070, 180-6.
- ³³ Schmutzler C., Winzer R., Meissner-Weigl J., Köhrle J., Retinoic acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, 240, 832-838.
- ³⁴ Notario B., Zamora M., Viñas O., Mampel T., All-*trans*-retinoic acid binds to and inhibits adenine nucleotide translocase and induces mitochondrial permeability transition, *Mol. Pharmacol.*, **2003**, 63, 224-231.
- ³⁵ Belzacq A.S., Brenner C., The adenine nucleotide translocator : a new potential chemotherapeutic target, *Curr. Drug Targets*, **2003**, 4, 517-524.

Chapitre 4 : Travaux initiés sur le composé ITB₂

Comme décrit chapitre 2, un criblage à haut débit réalisé au laboratoire a permis d'identifier 10 molécules capables d'inhiber le transport d'iodure. Sur ces 10 molécules, nous avons sélectionné 2 composés pour réaliser des recherches de cible : le composé **ITB₅** qui a été traité dans le chapitre 3 et le composé **ITB₂** (Figure 18, p.46). Le composé **ITB₂** (IC₅₀ = 0,3 μM) était intéressant car un certain nombre d'expériences (flux isotopique, électrophysiologie) suggéraient que ce composé agit sur une cible différente de celle d'**ITB₅**.

Comme précédemment, notre objectif était d'obtenir à partir de l'inhibiteur **ITB₂** une sonde à la fois capable de se lier de manière covalente à la protéine cible de ce composé et permettant d'isoler cette protéine pour l'identifier par des techniques de spectrométrie de masse. Le composé **ITB₂** a été traité en parallèle du composé **ITB₅** et un grand nombre de conditions expérimentales présentées ici ont été choisies en se basant sur les résultats obtenus avec le composé **ITB₅** et ses dérivés. Il est important de noter qu'**ITB₂** est un composé comportant un carbone asymétrique. Toutes les synthèses et évaluations biologiques décrites dans ce chapitre ont été réalisées avec le mélange racémique. Nous gardons toutefois en mémoire que seul un des énantiomères est actif (montré par Elodie Verhaeghe¹).

4.1. Synthèse d'une sonde biotinyllée photoactivable et évaluation de son activité

i. Conception de la sonde

La première étape pour obtenir une sonde biotinyllée photoactivable capable d'inhiber le transport d'iodure est de déterminer quelles fonctions du composé d'intérêt peuvent être modifiées chimiquement sans que ce composé ne perde en activité. Par manque de temps, nous n'avons pas fait une étude structure-activité détaillée pour le composé **ITB₂**. Nous nous sommes intéressés à l'amine secondaire présente sur le cycle non aromatique du composé **ITB₂** parce que cette fonction pouvait être fonctionnalisée par couplage peptidique. Afin de déterminer l'importance de cette fonction pour l'activité de l'inhibiteur **ITB₂**, un analogue acylé (composé **33**) a été préparé.

La synthèse de cet analogue a été réalisée en deux étapes (Schéma 21). La première a consisté en une réaction de Pictet-Spengler entre de la tryptamine et du 3-nitrobenzaldéhyde en présence d'acide trifluoroacétique (TFA)². Après 15 h de réaction à 40 °C et une simple filtration, l'inhibiteur a d'abord été récupéré sous la forme d'un sel de TFA. L'amine libre a été obtenue après plusieurs lavages basiques avec un rendement de 91 %. Dans une deuxième étape, l'amine secondaire cyclique a été acylée au moyen d'anhydride acétique, en présence de triéthylamine, selon les conditions décrites par l'équipe de Dae Yoon Chi³. Le composé **33** a ainsi été obtenu après purification sur colonne avec un rendement de 81 %.

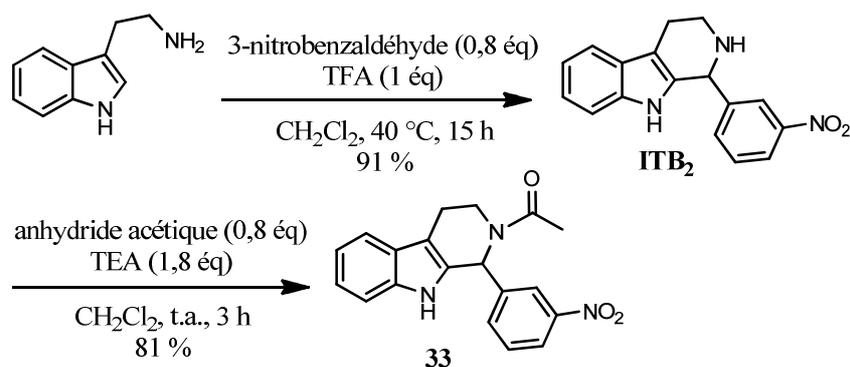


Schéma 21. Synthèse d'un analogue acylé d'ITB₂

L'activité du composé **33** a été déterminée grâce au test cellulaire non radioactif mis au point au début du chapitre 3 (cf. Chapitre 3, partie 1.a)). L'IC₅₀ du composé **ITB₂** s'est révélée être de 2 μM. L'analogue acylé présente donc une activité légèrement moins importante que le composé **ITB₂** (IC₅₀ = 0,3 μM) mais conserve une activité suffisante pour des expériences de photomarquage. En se basant sur ce résultat, nous avons envisagé la synthèse de la sonde **ITB₂-P₁** présentée Figure 62.

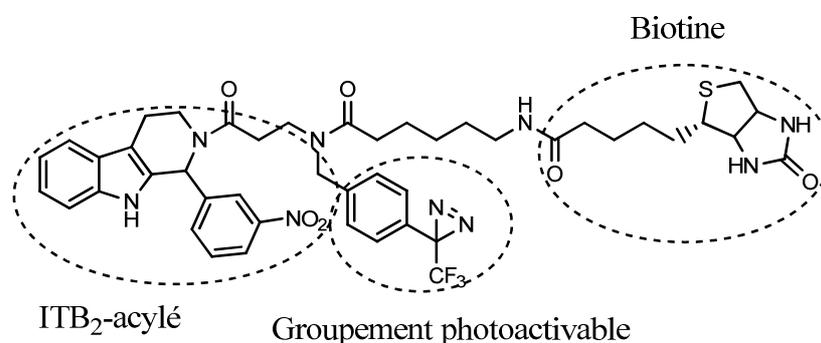


Figure 62. Sonde **ITB₂-P₁** à synthétiser

Comme pour **ITB₅**, le but était d'introduire sur **ITB₂** une amine primaire permettant d'associer ce composé à une trifluorométhylphényldiazirine *via* une amination réductrice puis à un bras biotinylé *via* un couplage peptidique. Puisque l'amine secondaire cyclique d'**ITB₂** pouvait être modifiée sans que l'activité n'en soit trop affectée, il a été décidé que l'amine primaire serait introduite grâce à cette fonction. Le groupement photoactif et la molécule de Biotine ont été positionnés sur la sonde **ITB₂-P₁** en suivant le même raisonnement que pour la conception d'**ITB₅-P₁**. Le groupement photoactif devait être proche de l'inhibiteur pour que la protéine reconnue par **ITB₂** puisse être photomarkée efficacement et la Biotine devait être éloignée à la fois pour qu'elle ne gêne pas la reconnaissance entre l'inhibiteur et sa cible et pour faciliter l'interaction entre la Biotine et la Streptavidine lors de l'étape de capture sur billes de la protéine marquée.

ii. Synthèse de la sonde et évaluation de son activité biologique

La sonde **ITB₂-P₁** décrite ci-dessus a été synthétisée en 4 étapes selon un schéma réactionnel très similaire à celui de la sonde **ITB₅-P₁**. La première a consisté à coupler le composé **ITB₂** à de la *N*-Boc-β-alanine en présence d'un agent de couplage. Dans un premier temps, deux agents de couplage différents ont été utilisés : le DCC et l'EDC,HCl. Les deux agents ont donné des résultats similaires. Le DCC a finalement été sélectionné pour son prix moins élevé. Le composé **34** a ainsi été obtenu avec un rendement de 67 % (Schéma 22).

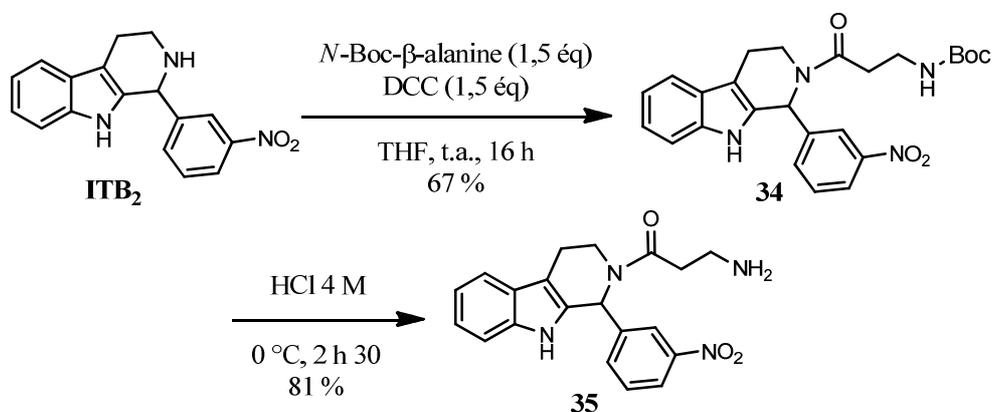


Schéma 22. Introduction d'une amine primaire sur **ITB₂**

Le groupement Boc présent sur le composé **34** a été éliminé dans une deuxième étape au moyen d'acide chlorhydrique à 4 M dans le dioxane. Des lavages basiques ont permis d'obtenir le produit **35** sous la forme d'une amine libre avec un rendement de 81 % après chromatographie.

Le produit **35** a été couplé à une trifluorométhylphényldiazirine par amination réductrice. Comme précédemment, ce couplage a été réalisé en deux étapes (Schéma 23). Le groupement photoactivable **21** protégé sous la forme d'un acétal (synthèse décrite p. 68) a d'abord été déprotégé avec une résine acide, l'Amberlyst 15, en présence d'un mélange THF/H₂O 95/5. Un mélange acétal/aldéhyde 30/70 a ainsi été obtenu. Une fois l'eau éliminée au moyen de Na₂SO₄ anhydre et le solvant évaporé dans des conditions « douces » (pression \geq 150 mbar et température ambiante), le mélange a été ajouté à une solution d'amine **35**, de triacétoxyborohydrure de sodium et d'acide acétique. Le composé **36** a été obtenu après chromatographie avec un rendement de 51 % pour l'amination réductrice seule et un rendement de 36 % pour l'ensemble des deux réactions.

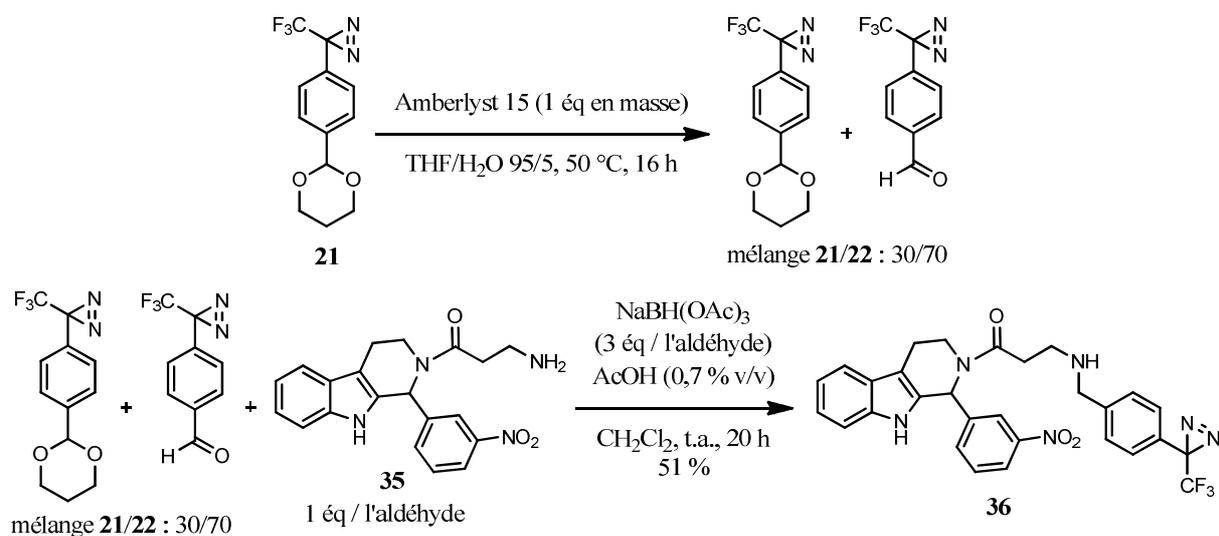


Schéma 23. Ajout du groupement photoactivable par amination réductrice

Dans une dernière étape, le composé **36** est couplé au bras biotinylé **24** (synthèse décrite p.69) en présence d'HATU et de *N,N*-diisopropyléthylamine (Schéma 24). La sonde **ITB₂-P₁** a ainsi été obtenue avec un rendement de 56 % après chromatographie.

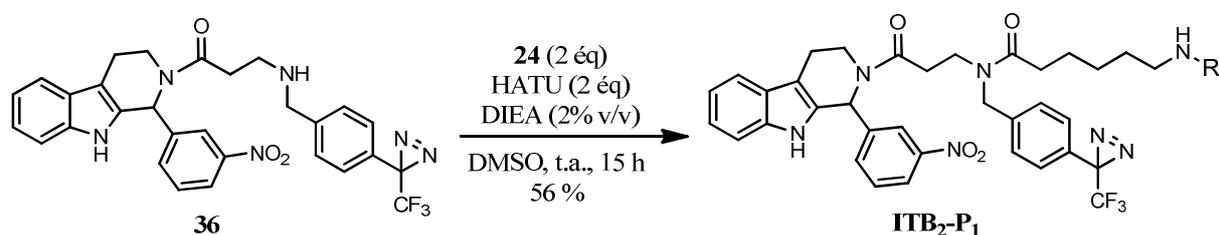


Schéma 24. Ajout du bras biotinylé par couplage peptidique (R = Biotine)

La capacité de la sonde **ITB₂-P₁** et de tous ses intermédiaires de synthèse à inhiber le transport d'iodure a été déterminée grâce au test cellulaire non radioactif décrit Chapitre 3, partie 3.1.c) *i*. Les IC₅₀ obtenues pour les différents composés testés sont indiquées dans le Tableau 11.

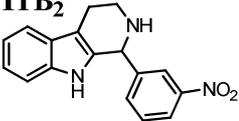
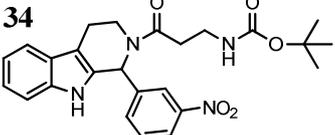
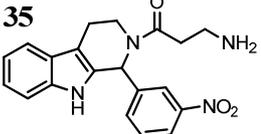
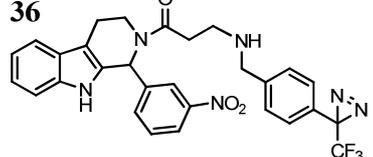
Molécule	IC ₅₀ (μM) 1 ^{ère} série	IC ₅₀ (μM) 2 ^e série
ITB₂ 	0,9	0,4
34 	2	2
35 	30	20
36 	40	20
ITB₂-P₁ 	0,2	0,3

Tableau 11. Valeurs d'IC₅₀ obtenues sur cellules FRTL-5 pour ITB₂ et pour la sonde ITB₂-P₁ et ses intermédiaires de synthèse

La comparaison des IC₅₀ obtenues pour **ITB₂** (0,9 et 0,4 μM) et pour le composé **34** (2 et 2 μM) indique que l'ajout sur l'amine secondaire cyclique d'une chaîne carbonée contenant une fonction carbamate n'a que peu d'influence sur l'activité d'**ITB₂**, comme on pouvait l'espérer compte-tenu des résultats obtenus précédemment avec le composé **33** (IC₅₀ = 2 μM). Ces valeurs d'IC₅₀ ne diffèrent en effet que d'un facteur compris entre 2 et 5. La présence d'une amine primaire ou d'une amine secondaire semble avoir une influence plus importante puisque l'activité du composé **35** est entre 50 et 75 fois moins importante que celle d'**ITB₂** (IC₅₀ = 30 et 20 μM) et celle du composé **36** entre 50 et 100 fois moins importante (IC₅₀ = 40 et 20 μM). Sans doute cela est-il dû à la protonation de ces amines dans les milieux utilisés. Si cette explication est exacte, cela signifie que la présence d'une charge diminue l'efficacité de l'inhibiteur auquel cas on peut supposer que cet inhibiteur traverse une ou plusieurs membrane(s) hydrophobe(s) avant d'atteindre sa cible, tout comme **ITB₅**.

La sonde **ITB₂-P₁** présente une activité identique à celle de l'inhibiteur **ITB₂** (IC₅₀ = 0,2 et 0,3 μM). L'ajout du bras biotinylé a donc conduit à une augmentation d'activité intéressante. Cela peut être lié au caractère hydrophobe du bras biotinylé qui peut faciliter le passage des membranes cellulaires ou à la transformation de l'amine secondaire du composé **36** en un amide qui se protone moins facilement. La sonde synthétisée présente en tous les cas une activité suffisante pour que des expériences de photomarquage puissent être réalisées.

4.2. Expériences de photomarquage

Une sonde biotinylée photoactivable capable d'inhiber le transport d'iodures ayant été obtenue, des expériences de photomarquage dont le principe est montré Figure 32 (Chapitre 3,

p.74) ont été réalisées. L'objectif était d'irradier des cellules à 365 nm en présence de différentes concentrations de sonde **ITB₂-P₁** et pendant différentes durées, en absence ou en présence d'un excès d'**ITB₂**. Si une protéine est marquée de manière spécifique par une sonde biotinylée, la bande correspondante doit en effet n'être observée en Western-blot que lorsque la sonde est présente et lorsque les cellules sont irradiées à 365 nm. D'autre part, l'intensité de cette bande doit être diminuée en présence d'un excès d'inhibiteur et doit augmenter avec la concentration de sonde et la durée d'irradiation.

Un certain nombre de conditions expérimentales utilisées dans cette partie sont identiques à celles utilisées pour les expériences de photomarquage basées sur la sonde **ITB₅-P₁** :

- l'ensemencement des boîtes de Pétri : 10×10^6 de cellules
- le temps de culture : 3 jours
- la quantité de protéines déposée sur gel : 75 μ g
- la concentration de Streptavidine-HRP utilisée pour révéler les Western-blots : solution d'1 mg/mL diluée par 4000

Des expériences d'électrophysiologie et de flux isotopique ayant montré que les effets du composé **ITB₂** mettent davantage de temps à apparaître que ceux du composé **ITB₅**, les cellules ont par contre été incubées avec la sonde **ITB₂-P₁** 30 min au lieu de 10 avant d'être irradiées. De même, la préincubation des cellules avec l'inhibiteur **ITB₂** a été fixée à 30 min pour les expériences de compétition.

i. Test d'une gamme de concentration de sonde

Des concentrations de sonde **ITB₂-P₁** de 0, 0,5, 5 et 50 μ M ont d'abord été testées. Après 4 min d'irradiation à 365 nm, les cellules ont été récupérées, lysées et les quantités de protéines présentes dans chaque lysat déterminées par dosage BCA. 75 μ g de protéines ont ensuite été déposés sur un gel SDS-PAGE à 12 % pour chacune des conditions d'irradiation. Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF qui a été révélée à l'aide de Streptavidine-HRP (Figure 63).

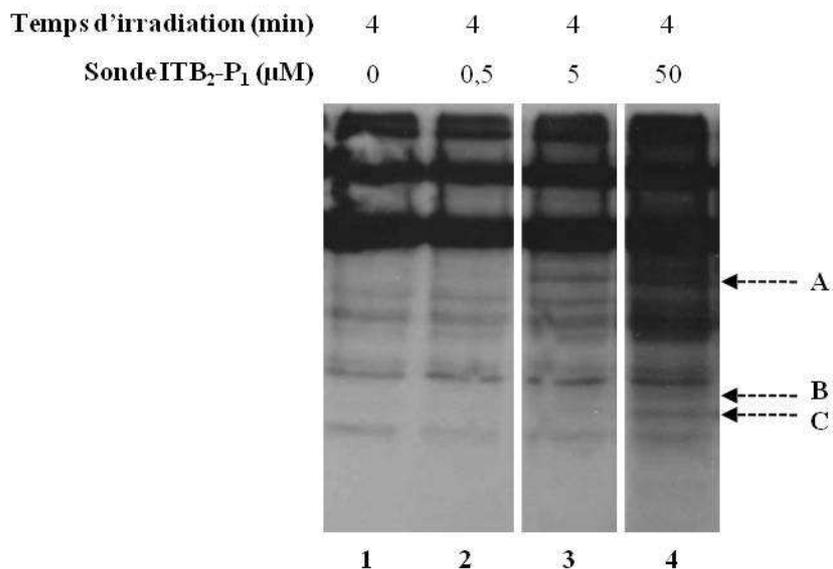


Figure 63. Western-blot obtenu après irradiation de cellules en présence de différentes concentrations de sonde ITB₂-P₁. 75 μ g de protéines ont été déposés pour chacune des conditions. (les flèches en pointillés indiquent la position des bandes pouvant correspondre à des protéines marquées spécifiquement par la sonde)

Sur ce film photo, 3 bandes semblent correspondre au photomarquage spécifique de protéines, même si le résultat est moins net que pour la protéine cible d'**ITB₅**. Elles sont indiquées par des flèches en pointillés. Ces bandes ne sont pas visibles lorsque les cellules

sont irradiées en absence de sonde (piste 1) et leur intensité augmente avec la quantité de sonde utilisée (pistes 2, 3, 4). Ce résultat était encourageant mais nécessitait des expériences complémentaires pour vérifier la spécificité du marquage.

ii. Test de différentes durées d'irradiation et expériences de compétition

Pour confirmer le résultat précédent, nous avons vérifié si l'intensité des bandes A, B et C de la Figure 63 augmentait avec la durée d'irradiation et si elle diminuait en présence d'un excès d'**ITB₂**. Une concentration de 5 μ M permettant de distinguer les 3 bandes évoquées ci-dessus sans que la membrane ne soit trop obscurcie par le marquage de protéines non spécifiques, les expériences visant à tester différentes durées d'irradiation ont toutes été réalisées avec cette concentration de sonde. Les cellules ont ainsi été irradiées 0, 4, 10 ou 20 min. Dans chaque cas, l'expérience a également été menée après une préincubation des cellules avec un excès d'**ITB₂** pour ne sélectionner que les protéines dont le marquage serait perturbé par la présence de ce composé. Une fois irradiées, les cellules ont été lysées et les protéines obtenues quantifiées par dosage BCA. 75 μ g de protéines ont été déposés dans chaque cas sur un gel SDS-PAGE à 12 % et après migration, transférés sur une membrane révélée à l'aide de Streptavidine-HRP (Figure 64).

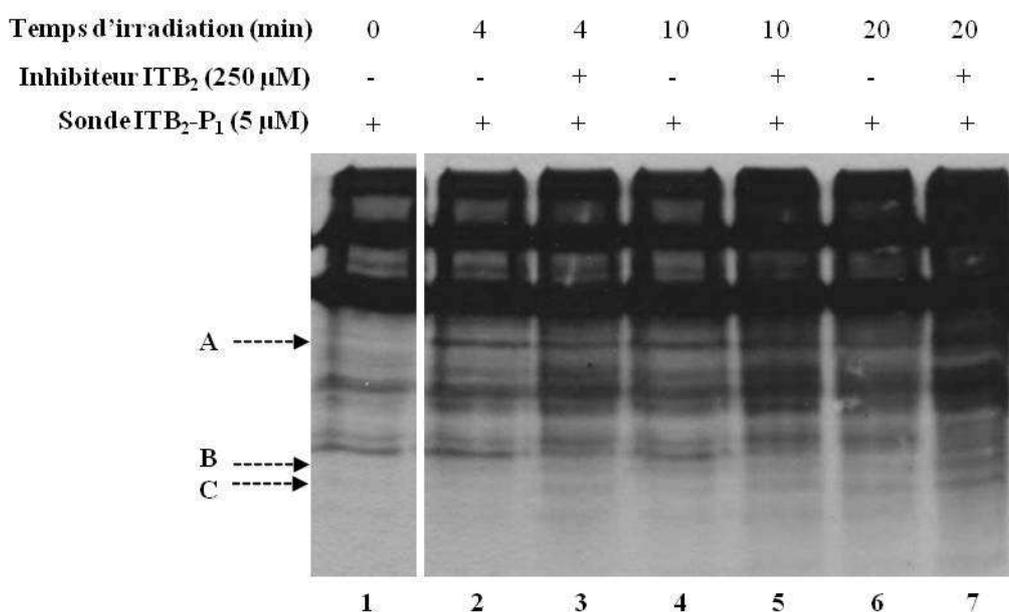


Figure 64. Western-blot obtenu après irradiation de cellules en présence de la sonde **ITB₂-P₁** et en absence ou présence de compétiteur **ITB₂** (les flèches indiquent la position des 3 bandes s'étant révélées potentiellement intéressantes lors des expériences portant sur la concentration de sonde à utiliser)

Sur les 3 bandes évoquées précédemment et dont la position est à nouveau indiquée ici par des flèches en pointillés, seules les bandes B et C ne sont pas du tout visibles en absence d'irradiation (piste 1). Toutefois l'intensité de ces 2 bandes ne varie pas avec la durée d'irradiation (pistes 2, 4, 6) et surtout elle ne semble pas diminuer en présence d'un excès d'inhibiteur **ITB₂** (comparaison pistes 2 et 3, pistes 4 et 5 et pistes 6 et 7). Les différentes concentrations de sonde et durées d'irradiation testées ici n'ont donc pas permis d'identifier clairement une ou des protéine(s) photomarquée(s) de manière spécifique par la sonde **ITB₂-P₁**.

4.3. Tentative de capture sur billes

Il est possible que la spécificité de marquage des protéines cibles n'ait pas pu être évaluée dans les conditions utilisées du fait de la faible abondance de ces protéines dans les cellules FRTL-5 et du fait d'une forte révélation de protéines marquées de manière non spécifique. A

ce stade de l'étude, la sonde **ITB₅-P₁** permettait déjà d'observer le marquage spécifique d'une protéine (cf. Chapitre 3, partie 3.3.d)) et des expériences de capture sur billes fonctionnalisées par de la Streptavidine étaient envisagées. Avant de prendre du temps pour tester d'autres conditions de photomarquage ou pour faire varier la durée d'incubation des cellules avec les composés **ITB₂** et **ITB₂-P₁**, une expérience de capture sur billes a été tentée en parallèle des expériences menées avec la sonde **ITB₅-P₁**. La capture sur billes devait permettre d'enrichir l'échantillon en protéines cibles et ainsi de faciliter l'observation de leur marquage par la sonde.

Dans cette perspective, des cellules ont été irradiées 10 min en présence de 5 µM de sonde **ITB₂-P₁** (valeurs médianes des gammes testées précédemment) et en absence ou présence de 250 µM de compétiteur **ITB₂**. 500 µg de protéines ont été incubés dans chaque cas avec 12,5 ou 37,5 µL de billes d'agarose-Streptavidine pendant 1 nuit à 4 °C. Après quoi, les billes ont été lavées avec 800, 400 puis 200 µL de tampon de lyse et les protéines captées éluées au moyen de Laemmli à 80 °C. Les surnageants obtenus après centrifugation ont été déposés sur un gel SDS-PAGE à 12 % et après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane révélée à l'aide de Streptavidine-HRP (Figure 65).

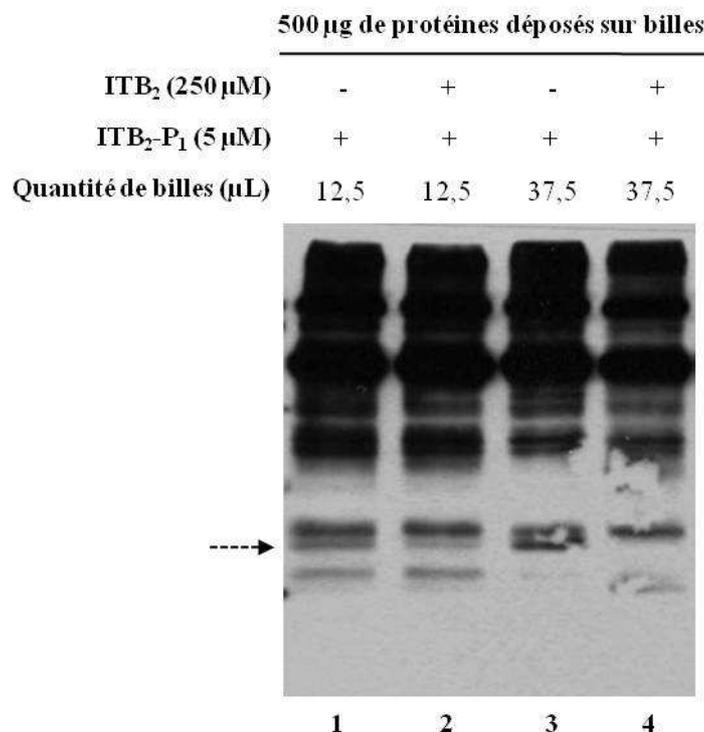


Figure 65. Essai de capture de la protéine marquée par ITB₂-P₁
(la flèche en pointillés indique la position d'une bande pouvant correspondre à une protéine photomarquée de manière spécifique par la sonde)

Sur ce film photo, on peut distinguer une bande pour laquelle l'intensité de signal est fortement diminuée en présence d'un excès d'**ITB₂** (comparaison des pistes 1 et 2 et des pistes 3 et 4) et dont l'intensité augmente lorsque la quantité de billes utilisée augmente (comparaison des pistes 1 et 3). Cette bande pourrait donc correspondre à une protéine photomarquée de manière spécifique par la sonde **ITB₂-P₁**. Il est difficile de dire si cette bande correspond à l'une des bandes B ou C observées précédemment, mais il est certain qu'elle ne correspond à aucune des trois protéines identifiées avec le composé **ITB₅**. La bande correspondant aux protéines cibles d'**ITB₅** est en effet située dans une région du gel contenant des protéines de masse M comprise entre 24 et 29 kDa alors que la bande observée ici a pu être située à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire dans la région des protéines de masse M comprise entre 29 et 40 kDa. D'après ce résultat, la sonde **ITB₂-P₁** permettrait donc,

comme attendu, de marquer une protéine différente des protéines marquées par les sondes basées sur **ITB₅**.

L'expérience a été réitérée dans le but de colorer les échantillons au nitrate d'argent. Etant donné que l'intensité de la bande d'intérêt est supérieure lorsque 37,5 µL de billes sont utilisés au lieu de 12,5 µL (comparaison des pistes 1 et 3), cet essai a été réalisé avec 37,5 µL de billes. La bande d'intérêt n'a cependant pas pu être observée dans ces conditions. Beaucoup de protéines non spécifiques se trouvent dans cette région du gel et il n'a par conséquent pas été possible de distinguer la bande correspondant à celle que nous avons visualisée en Western-blot.

Pour que la bande d'intérêt visualisée Figure 65 puisse être observée sur un gel coloré au nitrate d'argent, il était nécessaire d'optimiser les protocoles de lavage des billes de sorte à éliminer un maximum de protéines non spécifiques. Par manque de temps, l'étude sur le composé **ITB₂** s'est arrêtée à ce stade. Etant donné que le marquage spécifique d'une protéine pouvait clairement être visualisé en Western-blot avec la sonde **ITB₅-P₁**, nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur le composé **ITB₅**. L'objectif était de revenir sur le composé **ITB₂** dès lors qu'un protocole de lavages optimisé aurait été mis au point mais nous n'avons finalement pas eu le temps de le faire. Le protocole de lavages mis au point avec **ITB₅** (cf. Chapitre 3, partie 3.4.b) v) reste à donc être testé sur des billes ayant été incubées avec des lysats provenant de cellules irradiées en présence d'**ITB₂-P₁**.

4.4. Conclusion du chapitre 4

Les travaux que nous avons réalisés sur le composé **ITB₂** ont permis d'obtenir une sonde biotinylée photoactivable **ITB₂-P₁** capable d'inhiber le transport d'iodure avec la même efficacité que le composé **ITB₂** lui-même ($IC_{50} = 0,3 \mu M$). Des échantillons provenant de cellules irradiées en présence de cette sonde ont été analysés en Western-blot. Quelque soient la concentration de sonde ou la durée d'irradiation utilisées, aucun marquage spécifique n'a pu être observé. Néanmoins, une première expérience de capture sur billes d'agarose-Streptavidine a été effectuée afin de concentrer les échantillons en protéine(s) d'intérêt. A l'issue de cette expérience, une bande pouvant correspondre à une protéine marquée par la sonde **ITB₂-P₁** a été observée en Western-blot : cette bande est en effet la seule pour laquelle une diminution d'intensité a pu être observée en présence de compétiteur. Il est particulièrement intéressant de noter que cette bande correspond à une protéine dont la masse est comprise entre 30 et 40 kDa. Il s'agit donc d'une protéine différente des protéines identifiées avec le composé **ITB₅** dont la bande était située entre les protéines standards de masse $M = 20$ et 29 kDa. Cette bande n'a cependant pas été visualisée sur un gel coloré au nitrate d'argent du fait d'une présence trop importante de protéines non spécifiques dans la région du gel où se trouve cette bande.

Par manque de temps, les travaux portant sur la protéine cible d'**ITB₂** ont été suspendus et les recherches ont été focalisées sur le composé **ITB₅**. Ce dernier a permis d'optimiser un grand nombre de protocoles expérimentaux, dont les protocoles de lavages des billes et d'élution des protéines captées, que nous allons maintenant pouvoir appliquer au composé **ITB₂** pour tenter d'isoler sa protéine cible. Peut-être nous permettront-ils de confirmer à la fois en Western-blot et sur gel le résultat obtenu lors de notre première expérience de capture. En éliminant une grande partie des protéines non spécifiques, nous pourrions par ailleurs vérifier si ces protéines non spécifiques ne camouflent pas d'autres protéines pouvant également avoir été marquées par notre sonde. Différentes expériences pourront être menées en parallèle pour optimiser au maximum les conditions de photomarquage. D'autres temps d'irradiation et d'autres concentrations de sonde pourront par exemple être utilisés ainsi que d'autres durées d'incubation des cellules avec la sonde.

Compte-tenu des résultats obtenus avec **ITB₅**, il serait par ailleurs judicieux de synthétiser une nouvelle sonde **ITB₂-P₂** comportant un bras desthiobiotinylé à la place du bras biotinylé. Comme nous avons pu le voir précédemment, la présence de la Desthiobiotine a pour conséquence une meilleure solubilité de la sonde et par conséquent une meilleure biodisponibilité qui peut conduire au photomarquage d'une plus grande quantité de protéine. Etant donné que la protéine cible d'**ITB₂** n'a pas l'air d'être abondante dans les cellules FRTL-5, une augmentation des quantités de protéines marquées pourrait sûrement aider à observer plus clairement la ou les protéine(s) cible(s) d'**ITB₂** tant en Western-blot que sur gel.

Bibliographie

- ¹ Verhaeghe E., Etude des mécanismes d'accumulation de l'iode chez l'algue brune *Laminaria digitata* et chez les mammifères, Université Paris XI, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage du CEA Saclay, **2007**, p.220.
- ² Jiang W., Guan J., Macielag M.J., Zhang S., Qiu Y., Kraft P., Bhattacharjee S., Matthew John T., Haynes-Johnson D., Lundeen S., Sui Z., Pyrroloquinolone PDE5 inhibitors with improved pharmaceutical profiles for clinical studies on erectile dysfunction, *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 2126-2133.
- ³ Seo J.W., Srisook E., Son H.J., Hwang O., Cha Y.N., Chi D.Y., Syntheses of tetrahydroisoquinoline derivatives that inhibit NO production in activated BV-2 microglial cells, *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, *43*, 1160-1170.

Conclusion générale

Le mécanisme par lequel l'iodure est transféré à l'intérieur des cellules thyroïdiennes, la manière dont le transport est régulé au niveau cellulaire et les protéines impliquées dans la régulation post-traductionnelle du symporteur restent encore largement inconnus. La compréhension de l'ensemble de ces mécanismes permettrait pourtant d'améliorer le traitement d'un grand nombre de patients. Le transport d'iodure est en effet impliqué dans différentes pathologies de la thyroïde, dans les contaminations à l'iode radioactif consécutives aux accidents nucléaires et dans de prometteuses stratégies de thérapie génique anticancéreuses.

Afin de mieux comprendre les mécanismes qui gouvernent le transport d'iodure, notre laboratoire a mis en place une stratégie de génétique chimique directe qui a permis dans un premier temps au Dr. Nathalie Lecat-Guillet de découvrir 10 molécules capables d'inhiber le transport d'iodure. Des expériences d'électrophysiologie et de flux isotopique ont montré que 7 d'entre elles affectent rapidement le transport d'iodure tandis que les 3 autres ont un effet retardé. Le travail de cette thèse a consisté à identifier les protéines cibles de deux de ces molécules, appelées **ITB₅** ($IC_{50} = 0,04 \mu M$) et **ITB₂** ($IC_{50} = 0,3 \mu M$). Ces deux composés ont été choisis pour la simplicité de leur synthèse et parce qu'ils correspondent aux deux molécules les plus actives de chacune des catégories citées ci-dessus.

Une étude structure-activité du composé **ITB₅** a permis de déterminer l'importance relative des différents groupements présents sur ce composé pour son activité biologique. L'activité des analogues synthétisés par Lucie Pillette en vue de cette étude a été déterminée à l'aide d'un test cellulaire non radioactif mis au point au début de ma thèse. Les résultats obtenus ont été utilisés pour concevoir et synthétiser une sonde basée sur **ITB₅**. Cette sonde, appelée **ITB₅-P₁**, comporte à la fois un groupement photoactivable, afin de créer sous irradiation lumineuse une liaison covalente avec les protéines cibles d'**ITB₅**, et une molécule de Biotine permettant d'extraire ces protéines depuis des lysats cellulaires.

L'irradiation de cellules vivantes en présence d'**ITB₅-P₁** ($IC_{50} = 0,9 \mu M$), a permis d'observer le marquage d'une protéine. Nous avons montré que ce marquage est spécifique puisqu'il n'est observé ni en absence de lumière, ni en absence de sonde, qu'il est fortement diminué en présence d'**ITB₅** et qu'il augmente avec le temps d'irradiation lumineuse et avec la concentration de sonde. La protéine marquée a été extraite des lysats cellulaires grâce à des billes d'agarose fonctionnalisées par de la Streptavidine. L'utilisation d'un marqueur de poids moléculaire et d'une gamme de trypsine ont permis d'évaluer la masse de la protéine entre 25 et 30 kDa et d'estimer la quantité de cible isolée à partir de 500 μg de lysat protéique à ~10 ng.

Cette faible quantité de protéine s'est révélée être liée à des difficultés pour décrocher la protéine cible des billes. Plusieurs conditions d'éluion différentes ont été testées avec la sonde **ITB₅-P₁** mais aucune n'a permis de décrocher davantage de cible. Une sonde **ITB₅-P₂** a alors été synthétisée. Cette sonde comporte une molécule de Desthiobiotine à la place de la Biotine et possède ainsi une affinité moindre pour la Streptavidine. Elle s'est avérée être 30 fois plus active qu'**ITB₅-P₁** ($IC_{50} = 0,03 \mu M$) et a permis d'isoler ~30 ng de protéine cible à partir d'1 mg de protéines totales. Cette quantité s'étant encore révélée insuffisante pour que la protéine cible puisse être identifiée par spectrométrie de masse, l'expérience de capture sur billes a été réalisée en partant de 4 mg de protéines totales. Cela a conduit à l'isolement d'un peu plus de 100 ng de protéine d'intérêt qui ont pu être colorés au bleu de Coomassie sur un gel d'électrophorèse.

Après digestion trypsique, l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des peptides issus de la bande d'intérêt nous a permis d'identifier trois protéines appartenant toutes à la même famille de transporteurs mitochondriaux : deux isoformes d'une ADP/ATP translocase (ADT1 et ADT2) et un transporteur de phosphate (MPCP). Différents éléments nous ont permis d'affirmer que ces protéines sont toutes les trois marquées spécifiquement par la sonde **ITB₅-P₂**, ce qui suggère fortement l'existence d'une interaction physique entre elles et **ITB₅**. D'autres expériences (FRET, expériences de compétition avec un ligand radiomarqué, résonance plasmonique de surface, titration calorimétrique isotherme) pourront être réalisées suite à cette thèse pour le confirmer.

Les résultats que nous avons obtenus avec le composé **ITB₅** sont les premiers à suggérer un lien direct entre les protéines ADT1, ADT2 et MPCP et le transport d'iodure dans les cellules thyroïdiennes. Dans un premier temps, diverses expériences de validation (utilisation d'inhibiteurs spécifiques ou de SiRNAs, surexpression des protéines...) devront être réalisées pour vérifier l'existence de ce lien. Des études seront ensuite effectuées afin de comprendre par quel mécanisme cellulaire l'interaction d'**ITB₅** et de ces protéines pourrait conduire à une modulation du transport d'iodure.

Les travaux que nous avons réalisés sur le composé **ITB₂** ont permis eux aussi d'obtenir une sonde biotinylée photoactivable (**ITB₂-P₁**) capable d'inhiber le transport d'iodure. L'irradiation de cellules thyroïdiennes en présence de cette sonde n'a pas permis d'observer le marquage spécifique de protéines. Néanmoins, une première expérience de capture sur billes d'agarose-Streptavidine, effectuée afin de concentrer les échantillons en protéine(s) d'intérêt, a permis de visualiser une bande pouvant correspondre à une protéine marquée par la sonde **ITB₂-P₁**. Il est particulièrement intéressant de noter que cette bande correspond très probablement à une protéine différente des protéines identifiées avec le composé **ITB₅**. Cette bande n'a toutefois pas pu être visualisée sur gel du fait d'une présence trop importante de protéines non spécifiques.

Par manque de temps, les travaux portant sur la protéine cible d'**ITB₂** ont été suspendus à ce stade et les recherches ont été focalisées sur le composé **ITB₅**. Les conditions expérimentales que nous avons mises au point pour isoler et identifier les cibles d'**ITB₅** vont maintenant pouvoir être appliquées au composé **ITB₂**. Sans doute permettront-elles d'obtenir des gels plus propres sur lesquels la bande d'intérêt pourra être observée plus facilement. Différentes expériences pourront également être menées pour optimiser au maximum les conditions de photomarquage. D'autres temps d'irradiation, d'autres concentrations de sonde ainsi que d'autres durées d'incubation des cellules avec la sonde pourront par exemple être utilisés. Compte-tenu des résultats obtenus avec **ITB₅**, nous envisageons également de synthétiser une nouvelle sonde **ITB₂-P₂** comportant une étiquette Desthiobiotine. La présence de la Desthiobiotine devrait en effet permettre de photomarquer, et donc d'isoler, une plus grande quantité de protéine cible.

Partie expérimentale

Synthèse organique

Méthodes analytiques et solvants

Chromatographies sur couche mince (CCM)

Les chromatographies analytiques sur couche mince (CCM) sont réalisées sur des plaques de silice MERCK 60 F254 de 0,25 mm d'épaisseur sur support en verre. Les taches sont révélées par illumination ultraviolette à 254 nm et/ou en présence d'une solution d'acide phosphomolybdique à 5 % en masse dans l'éthanol. Le facteur de rétention frontal (Rf) est indiqué pour chaque produit, suivi entre parenthèses de la nature de l'éluant.

Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ^1H et ^{13}C ont été enregistrés sur un spectromètre à ondes pulsées BRUKER DPX 400 MHz équipé d'un ordinateur Avance et analysés grâce au logiciel X-WIN NMR, version 3.5. Les fréquences de résonance sont de 400,13 MHz pour le proton et de 100,61 MHz pour le carbone 13. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport au solvant de référence :

Solvant	δ (^1H)	δ (^{13}C)
Chloroforme	7,26 ppm	77,0 ppm
Diméthylsulfoxyde	2,50 ppm	39,5 ppm

Les déplacements chimiques (δ) sont présentés en ordre croissant et l'attribution des différents signaux correspond à celle indiquée sur la structure des produits. Le déplacement est suivi de la multiplicité du signal, de la ou des constante(s) de couplage (J) en Hertz, de la valeur de l'intégration puis de l'attribution.

La multiplicité des signaux est abrégée de la manière suivante :

s	singulet	dd	doublet dédoublé
s.e	singulet élargi	ddd	doublet dédoublé dédoublé
d	doublet	dt	doublet détriplé
t	triplet	td	triplet dédoublé
t.e	triplet élargi	m	multiplet
q	quartet		
quint	quintuplet		

Des expériences complémentaires d'HSQC ont été systématiquement réalisées pour aider à l'attribution des carbones et dans quelques cas, des expériences de NOESY ont également été réalisées pour attribuer certains protons.

Chromatographie liquide haute performance couplée à la masse (LC/MS)

Les analyses ont été effectuées sur une chaîne CL-ESI-QUAD (Waters) munie d'un détecteur à barrette de diode (UV 210-400 nm, Waters), d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (PL-ELS 1000, Polymer Laboratory) et d'un spectromètre de masse à électrospray positif (ESI⁺) et négatif (ESI⁻) MICROMASS ZQ (105-1000 UMA). La colonne utilisée est une CX-Bridge C18 3,5 μm x 4,6 mm x 100 mm. Le débit de la phase mobile est de 1 mL/min et le volume injecté de 20 μL . L'éluant est constitué d'un mélange de deux solutions :

A : H₂O + 0,1 % d'acide formique
B : Acétonitrile + 0,1 % d'acide formique

Profil d'élution :

Temps (min)	% B
0,0	5
8,0	100
13,0	100

Le temps de rétention t_R est indiqué pour chaque produit.

Spectrométrie de masse

Les spectres ont été obtenus grâce à un spectromètre MARINER ESI-TOF (Perspectives Biosystems) ionisant les échantillons par électrospray et séparant les ions obtenus dans un analyseur temps de vol.

Spectres d'absorption infrarouge (IR)

Les spectres sont réalisés au moyen d'un spectromètre Perkin Elmer System 2000 FT-IR. Une pastille de KBr a été préparée pour chaque composé. Les nombres d'onde des bandes IR sont exprimés en cm^{-1} à leur maximum d'intensité.

Spectres ultraviolet (UV)

Les spectres d'absorption UV ont été effectués sur un spectrophotomètre UVIKON 860 KONTRON avec le système d'acquisition Victor VPC IIc.

Spectrométrie de masse haute résolution (HR-MS)

Ces analyses ont été réalisées par le service de spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS sur la plateforme Imagif située à Gif-sur-Yvette. Les analyses ont été effectuées au moyen d'un spectromètre de masse ESI-TOF.

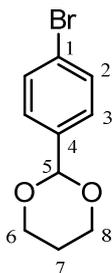
Chromatographie sur colonne

Les purifications ont été réalisées sur un appareil RediSep (Serlabo Technologies, Teledyn ISCO) en utilisant des colonnes commerciales (Redisep, Biotage SNAP Cartridge ou Interchim) en phase normale (SiO₂).

Solvants anhydres

Les solvants anhydres sont obtenus par distillation sous atmosphère d'azote en présence d'agents desséchants : l'hydrure de calcium pour le dichlorométhane et le mélange sodium/benzophénone pour le tétrahydrofurane.

4-(2-(1,3-dioxanyl))-bromobenzène¹ **16**



Formule brute : C₁₀H₁₁O₂Br

PM : 241,99 g.mol⁻¹

Rf : 0,64 (cyclohexane/AcOEt : 5/1)

Solide blanc

Protocole :

10,06 g (54,69 mmol) de 4-bromobenzaldéhyde sont dissous dans du benzène anhydre (100 mL). 1,51 g d'Amberlyst 15 activé puis 8,5 mL (117,61 mmol, 2,2 éq) de 1,3-propanediol sont ajoutés. Un montage Dean Stark est appliqué et le mélange réactionnel agité à reflux sous argon pendant 5 h 30. Le mélange benzène-eau présent dans le Dean Stark est retiré plusieurs fois au cours de la réaction.

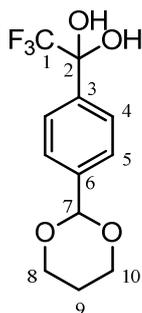
Après un retour à température ambiante, la solution est filtrée sur coton et le solvant évaporé. Le résidu obtenu est repris dans du dichlorométhane (300 mL) et lavé à l'eau distillée (2 x 150 mL). La phase organique est séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton et le solvant évaporé pour obtenir 13,13 g (54,26 mmol) de 4-(2-(1,3-dioxanyl))-bromobenzène **16** (99 %). Le produit est suffisamment pur pour être engagé dans la réaction suivante sans autre purification.

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,46 (m, 1H, H₇) ; 2,22 (m, 1H, H₇) ; 3,98 (td, ²J = 12,4 Hz, ³J = 2,4 Hz, 2H, H₆ et H₈) ; 4,26 (dd, ²J = 11,6 Hz, ³J = 5,2 Hz, 2H, H₆ et H₈) ; 5,46 (s, 1H, H₅) ; 7,36 (d, J_{AB} = 7,2 Hz, 2H, H₂ ou H₃) ; 7,50 (d, J_{AB} = 8,8 Hz, 2H, H₂ ou H₃)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 8,27 min, m/z : 243 (50), 245 (50) ([M+H⁺])

1-(4-(2-(1,3-dioxanyl))phényl)-2,2,2-trifluoroéthan-1-one hydratée¹ **17**



Formule brute : C₁₂H₁₃O₄F₃

PM : 278,08 g.mol⁻¹

Rf : 0,38 (cyclohexane/AcOEt : 1/5)

Solide blanc

Protocole :

12,23 g (50,54 mmol) de 4-(2-(1,3-dioxanyl))-bromobenzène **16** sous argon sont solubilisés dans du tétrahydrofurane anhydre (250 mL) dans un ballon tricol, « grillé » au préalable sous vide. La température du milieu est abaissée à -78 °C et 37 mL (74,0 mmol, 1,5 éq) de *n*-butyllithium 2 M dans le pentane sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une ampoule de coulée. Le mélange est agité à -78 °C et sous argon pendant 2 h 30. 12 mL (100,86 mmol, 2 éq) de trifluoroacétate d'éthyl sont alors ajoutés sur 10 min, le mélange est agité encore 15 min à -78 °C puis à température ambiante 15 h.

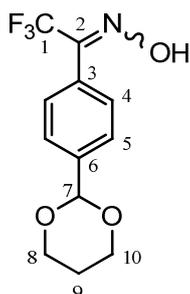
La réaction est quenchée par ajout d'une solution de NH₄Cl saturée (200 mL). La phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (250 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées avec de l'eau distillée (150 mL), séchées (Na₂SO₄), filtrées sur coton et le solvant est évaporé. Une purification par chromatographie flash sur colonne Redisep 330 g en phase normale (cyclohexane/AcOEt : 95/5, 80/20 puis 0/100) permet d'obtenir 8,22 g (29,56 mmol) de 1-(4-(2-(1,3-dioxanyl))phényl)-2,2,2-trifluoroéthan-1-one hydratée **17** (58 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,49 (m, 1H, H₉) ; 2,24 (m, 1H, H₉) ; 4,02 (dt, ²J = 12,4 Hz, ³J = 2,4 Hz, 2H, H₈ et H₁₀) ; 4,30 (dd, ²J = 12,4 Hz, ³J = 5,2 Hz, 2H, H₈ et H₁₀) ; 5,57 (s, 1H, H₇) ; 7,67 (d, J_{AB} = 8,4 Hz, 2H, H₄ ou H₅) ; 8,08 (d, J_{AB} = 8,0 Hz, 2H, H₄ ou H₅)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 6,33 min, m/z : 279 ([M+H⁺])

1-(4-(2-(1,3-dioxanyl))phényl)-2,2,2-trifluoro-1-éthanone oxime¹ **18**



Formule brute : C₁₂H₁₂O₃NF₃

PM : 275,08 g.mol⁻¹

Rf : 0,47 (cyclohexane/AcOEt : 1/3)

Solide beige

Protocole :

6,42 g (23,09 mmol) de 1-(4-(2-(1,3-dioxanyl))phényl)-2,2,2-trifluoroéthane-1-one hydratée **17** et 3,20 g (46,05 mmol, 1,9 éq) d'hydroxylamine chlorhydratée sont solubilisés dans un mélange pyridine/éthanol absolu 2/1 (42 mL). 16 g de tamis moléculaire 4Å sont ajoutés et le mélange agité à 60 °C sous argon pendant 16 h.

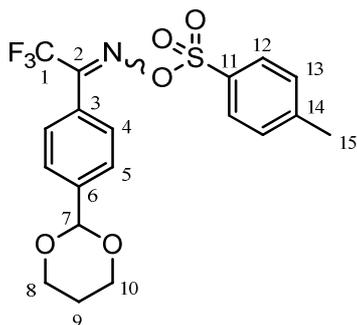
Le brut réactionnel est filtré sur cellite. Après évaporation des solvants, l'huile obtenue est lavée avec de l'éthanol absolu : 3 x (50 mL + évaporation) avant d'être reprise dans du dichlorométhane (100 mL) et lavée à l'eau distillée (100 puis 50 mL). La phase organique est séchée (MgSO₄), filtrée sur coton et le solvant évaporé pour obtenir 6,34 g (23,05 mmol) de 1-(4-(2-(1,3-dioxanyl))phényl)-2,2,2-trifluoro-1-éthanone oxime **18** (99 %). Le produit est suffisamment pur pour être engagé dans la réaction suivante sans autre purification.

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,48 (m, 1H, H₉) ; 2,24 (m, 1H, H₉) ; 4,01 (td, ²J = 12,4 Hz, ³J = 2,4 Hz, 2H, H₈ et H₁₀) ; 4,29 (dd, ²J = 11,6 Hz, ³J = 4,8 Hz, 2H, H₈ et H₁₀) ; 5,54 (s, 1H, H₇) ; 7,50 (d, J_{AB} = 8,0 Hz, 2H, H₄ ou H₅) ; 7,60 (d, J_{AB} = 8,0 Hz, 2H, H₄ ou H₅) ; 8,01 (s.e., 1H, OH)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 7,60 min, m/z : 276 ([M+H⁺])

1-(4-(2-(1,3-dioxanyl))phényl)-2,2,2-trifluoro-1-éthanone *O*-(*p*-tolylsulfonyl)oxime¹ **19**



Formule brute : C₁₉H₁₈O₅NSF₃

PM : 429,09 g.mol⁻¹

Rf : 0,48 (cyclohexane/AcOEt : 1/3)

Solide blanc

Protocole :

6,34 g (23,05 mmol) de 1-(4-(2-(1,3-dioxanyl))phényl)-2,2,2-trifluoro-1-éthanone oxime **18**, 140,42 mg (1,15 mmol, 0,05 éq) de diméthylaminopyridine et 8 mL (57,42 mmol, 2,5 éq) de triéthylamine sont solubilisés dans du dichlorométhane anhydre (30 mL) et agités sous argon. Au moyen d'une seringue, 4,80 g (25,26 mmol, 1,1 éq) de chlorure de tosylé solubilisés au préalable dans du dichlorométhane anhydre (30 mL) sont ajoutés sur 5 min. Le mélange est agité à température ambiante et sous argon 15 h.

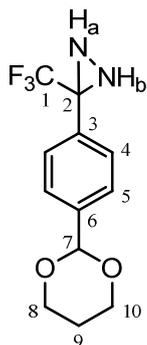
La solution est filtrée sur coton puis lavée à l'eau distillée (60 mL). La phase organique est complétée à 150 mL avec du dichlorométhane puis lavée encore une fois à l'eau (75 mL). Elle est ensuite séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton et le solvant est évaporé. Une purification par chromatographie flash sur colonne Biotage SNAP Cartridge 340 g en phase normale (cyclohexane/AcOEt : 95/5, 85/15, puis 80/20) permet d'obtenir 7,46 g (17,39 mmol) de 1-(4-(2-(1,3-dioxanyl))phényl)-2,2,2-trifluoro-1-éthanone *O*-(*p*-tolylsulfonyl)oxime **19** (75 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,48 (m, 1H, H₉) ; 2,22 (m, 1H, H_{9'}) ; 2,48 (s, 3H, H₁₅) ; 4,0 (td, ²J = 12,4 Hz, ³J = 2,4 Hz, 2H, H₈ et H₁₀) ; 4,29 (dd, ²J = 11,6 Hz, ³J = 4,8 Hz, 2H, H_{8'} et H_{10'}) ; 5,54 (s, 1H, H₇) ; 7,38 (d, J_{AB} = 8,0 Hz, 2H, H₄ ou H₅) ; 7,39 (d, J_{AB} = 8,0 Hz, 2H, H₄ ou H₅) ; 7,60 (d, J_{AB} = 8,4 Hz, 2H, H₁₂ ou H₁₃) ; 7,87 (d, J_{AB} = 8,4 Hz, 2H, H₁₂ ou H₁₃)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 9,63 min, m/z : 430 ([M+H⁺])

3-(4-(2-(1,3-dioxanyl))phényl)-3-(trifluorométhyl)diaziridine¹ **20**



Formule brute : C₁₂H₁₃O₂N₂F₃

PM : 274,09 g.mol⁻¹

Rf : 0,4 (cyclohexane/AcOEt : 1/3)

Huile translucide légèrement jaunâtre

Protocole :

7,28 g (16,97 mmol) de 1-(4-(2-(1,3-dioxanyl))phényl)-2,2,2-trifluoro-1-éthanone *O*-(*p*-tolylsulfonyl)oxime **19** sont solubilisés dans du dichlorométhane (10 mL) et de l'ammoniac condensé à -80 °C (20 mL) dans un tube en verre. Le tube est fermé (bouchon à vis), le mélange laissé revenir à température ambiante et agité 18 h.

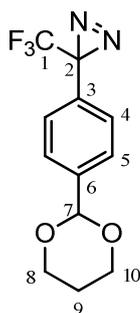
La solution est refroidie à nouveau à -80 °C, le bouchon remplacé par un septum piqué d'une aiguille et la solution dégazée en revenant progressivement à température ambiante. Du dichlorométhane (90 mL) et de l'eau distillée (100 mL) sont ajoutés. La phase organique est séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton et le solvant évaporé pour obtenir 4,55 g (16,60 mmol) de 3-(4-(2-(1,3-dioxanyl))phényl)-3-(trifluorométhyl)diaziridine **20** (98 %). Le produit est suffisamment pur pour être engagé dans la réaction suivante sans autre purification.

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,47 (m, 1H, H₉) ; 1,55 (s.e., 1H, NH_a ou NH_b) ; 2,23 (m, 1H, H_{9'}) ; 2,78 (s.e., 1H, NH_a ou NH_b) ; 4,0 (td, ²J = 12,4 Hz, ³J = 2,4 Hz, 2H, H₈ et H₁₀) ; 4,28 (dd, ²J = 11,6 Hz, ³J = 5,2 Hz, 2H, H_{8'} et H_{10'}) ; 5,52 (s, 1H, H₇) ; 7,55 (d, J_{AB} = 8,0 Hz, 2H, H₄ ou H₅) ; 7,63 (d, J_{AB} = 8,4 Hz, 2H, H₄ ou H₅)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 6,93 min, m/z : 275 ([M+H⁺])

3-(4-(2-(1,3-dioxanyl))phényl)-3-(trifluorométhyl)diazirine¹ **21**



Formule brute : C₁₂H₁₁O₂N₂F₃

PM : 272,08 g.mol⁻¹

Rf : 0,48 (cyclohexane/AcOEt : 1/5)

Solide beige

Protocole (à réaliser en limitant l'exposition directe à la lumière) :

4,45 g (16,24 mmol) de 3-(4-(2-(1,3-dioxanyl))phényl)-3-(trifluorométhyl)diaziridine **20** et 6,8 mL (48,72 mmol, 3 éq) de triéthylamine sont solubilisés dans du méthanol (36 mL). 53,6 mL (21,12 mmol, 1,3 éq) d'une solution d'iode à 10 % dans le méthanol sont ajoutés goutte à goutte au moyen d'une ampoule à brome. Le mélange est agité 2 h 30 sous argon à température ambiante.

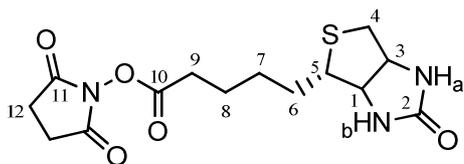
Après évaporation du solvant, le résidu est repris dans du dichlorométhane (100 mL). Il est lavé à l'eau distillée (100 mL), avec du Na₂S₂O₃ 1 M (100 puis 50 mL) puis à nouveau à l'eau distillée (50 mL). La phase organique est séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton et le solvant évaporé. Une purification par chromatographie flash sur colonne Biotage SNAP Cartridge 100 g en phase normale (cyclohexane/AcOEt : 100/0, 95/5, puis 90/10) permet d'obtenir 3,77 g (13,86 mmol) de 3-(4-(2-(1,3-dioxanyl))phényl)-3-(trifluorométhyl)diazirine **21** (85 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,46 (m, 1H, H₉) ; 2,22 (m, 1H, H₉) ; 3,93 (td, ²J = 12,4 Hz, ³J = 2,4 Hz, 2H, H₈ et H₁₀) ; 4,13 (dd, ²J = 11,6 Hz, ³J = 4,8 Hz, 2H, H₈ et H₁₀) ; 5,54 (s, 1H, H₇) ; 7,20 (d, J_{AB} = 8,4 Hz, 2H, H₄ ou H₅) ; 7,52 (d, J_{AB} = 8,4 Hz, 2H, H₄ ou H₅)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 8,90 min, m/z : 273 ([M+H⁺])

Succinimido biotinate² **23**



Formule brute : C₁₄H₁₉N₃O₅S

PM : 341,10 g.mol⁻¹

Solide blanc

Protocole :

1,12 g (4,59 mmol) de Biotine sont solubilisés dans du diméthylformamide (30 mL) et agités sous argon. 945,18 mg (4,58 mmol, 1 éq) de dicyclohexylcarbodiimide préalablement solubilisés dans du diméthylformamide (12 mL) sont ajoutés puis après une dizaine de minutes 531,87 mg (4,62 mmol, 1 éq) de *N*-hydroxysuccinimide également solubilisés dans du diméthylformamide (13 mL). Le mélange est laissé à agiter 5 jours à température ambiante et sous argon.

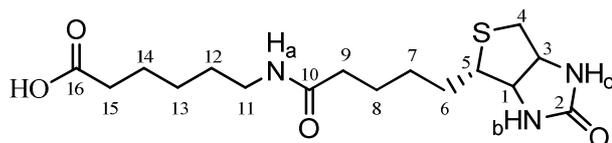
Le mélange est filtré sur fritté n°3 et le filtrat évaporé sous pression réduite à 60 °C pour obtenir du succinimido biotinate **23** avec un rendement quantitatif. Le produit est suffisamment pur pour être engagé dans la réaction suivante sans autre purification.

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 1,38-1,69 (m, 6H, H₆, H₇ et H₈) ; 2,56 (d, ²J = 12,4 Hz, 1H, H₄) ; 2,66 (t, ³J = 8,0 Hz, 2H, H₉) ; 2,80 (s, 4H, H₁₂) ; 2,82 (dd, ²J = 12,4 Hz, ³J = 4,8 Hz, 1H, H_{4'}) ; 3,09 (ddd, ³J = 8,4 Hz, ³J = 6,0 Hz, ³J = 4,4 Hz, 1H, H₅) ; 4,13 (ddd, ³J = 7,2 Hz, ³J = 4,4 Hz, ⁴J = 2,0 Hz, 1H, H₁) ; 4,29 (dd, ³J = 7,6 Hz, ³J = 5,2 Hz, 1H, H₃) ; 6,34 (s.e., 1H, NH_a ou NH_b) ; 6,40 (s.e., 1H, NH_a ou NH_b)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 5,37 min, m/z : 342 ([M+H⁺])

Acide 6-(biotinylamino)caproïque² **24**



Formule brute : C₁₆H₂₇N₃O₄S

PM : 357,17 g.mol⁻¹

Solide blanc

Protocole :

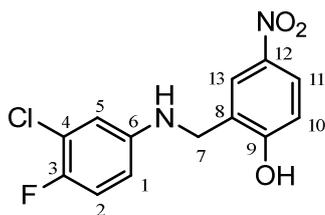
1,56 g (4,57 mmol) de succinimido biotinate **23** et 614,80 mg (4,69 mmol, 1 éq) d'acide ε amino-n-caproïque sont solubilisés dans du diméthylformamide (45 mL). 750 μL (5,38 mmol, 1,2 éq) de triéthylamine sont ajoutés et le mélange est agité à température ambiante 17 h. Le précipité formé est filtré sur fritté n°3, lavé avec de l'éther diéthylique et séché sous pression réduite pour obtenir 1,01 g (2,83 mmol) d'acide 6-(biotinylamino)caproïque **24** (62 %). Le produit est suffisamment pur pour être engagé dans la réaction suivante sans autre purification.

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 1,21-1,63 (m, 12H, H₆, H₇, H₈, H₁₂, H₁₃ et H₁₄) ; 2,02 (t, ³J = 7,6 Hz, 2H, H₉) ; 2,17 (t, ³J = 7,6 Hz, 2H, H₁₅) ; 2,56 (d, ²J = 13,2 Hz, 1H, H₄) ; 2,80 (dd, ²J = 12,4 Hz, ³J = 5,2 Hz, 1H, H_{4'}) ; 2,99 (dt, ³J = 7,2 Hz, ³J = 5,6 Hz, 2H, H₁₁) ; 3,08 (ddd, ³J = 8,8 Hz, ³J = 6,4 Hz, ³J = 4,4 Hz, 1H, H₅) ; 4,11 (ddd, ³J = 7,8 Hz, ³J = 4,4 Hz, ⁴J = 2,0 Hz, 1H, H₁) ; 4,29 (dd, ³J = 7,6 Hz, ³J = 5,2 Hz, 1H, H₃) ; 6,34 (s.e., 1H, NH_b ou NH_c) ; 6,40 (s.e., 1H, NH_b ou NH_c) ; 7,71 (t.e., ³J = 5,6 Hz, 1H, NH_a) ; 11,85 (s.e., 1H, OH)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 4,92 min, m/z : 358 ([M+H⁺])

2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénol (ITB₅)



Formule brute : C₁₃H₁₀N₂O₃ClF

PM : 296,04 g.mol⁻¹

Rf : 0,54 (CH₂Cl₂ 100 %)

Poudre jaune vif

Protocole :

3,02 g (18,08 mmol) de 2-hydroxy-5-nitrobenzaldéhyde et 3,21 g (22,14 mmol, 1,2 éq) de 3-chloro-4-fluoroaniline sont solubilisés dans du dichlorométhane (250 mL). 1,2 mL d'acide acétique sont ajoutés au goutte à goutte puis, après 10 min d'agitation, 7,62 g (35,97 mmol, 2 éq) de triacétoxyborohydrure de sodium. Le mélange est agité à température ambiante 3 h. La réaction est quenchée par ajout d'une solution d'HCl 1 M (150 mL). La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane (75 mL). Les phases organiques réunies sont séchées (Na₂SO₄), filtrées sur coton et le solvant est évaporé. Une purification par chromatographie flash sur colonne Rediseq 330 g en phase normale (DCM/MeOH : 98/2) permet d'obtenir 4,2 g (14,19 mmol) de 2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénol (ITB₅) (78 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 4,21 (s, 2H, H₇) ; 6,44 (s.e., 1H, NH) ; 6,51 (ddd, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 4,0 Hz, ⁴J = 2,8 Hz, 1H, H₁) ; 6,66 (dd, ⁴J = 6,0 Hz, ⁴J = 2,8 Hz, 1H, H₅) ; 6,99 (d, ³J = 8,9 Hz, 1H, H₁₀) ; 7,08 (t, ³J = 9,2 Hz, 1H, H₂) ; 8,02 (dd, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 2,8 Hz, 1H, H₁₁) ; 8,06 (d, ⁴J = 2,8 Hz, 1H, H₁₃) ; 11,33 (s.e., 1H, OH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 49,0 (C₇) ; 112,2 (d, ³J = 6 Hz, C₁) ; 112,8 (C₅) ; 115,6 (C₁₀) ; 117,4 (d, ²J = 21 Hz, C₂) ; 119,8 (d, ²J = 18 Hz, C₄) ; 124,2 (C₁₃) ; 124,8 (C₁₁) ; 127,2 (C₈) ; 140,0 (C₁₂) ; 146,2 (d, ⁴J = 2 Hz, C₆) ; 149,6 (d, ¹J = 234 Hz, C₃) ; 162 (C₉)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 7,98 min, m/z : 297 (100), 299 (36) ([M+H⁺])

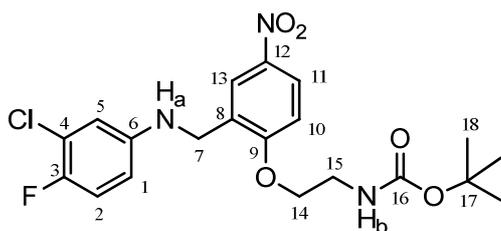
Spectrométrie de masse (ESI/TOF) : m/z : 297 (100), 299 (36) ([M+H⁺])

IR (pastille KBr) ν (cm⁻¹) : 3270 (N-H ν) ; 3077-2562 (O-H ν) ; 1616, 1592 (N-H δ) ; 1525, 1342 (NO₂ ν) ; 1456, 1402 (C=C ν) ; 1269 (=C-N ν) ; 872, 842, 821, 753 (=C-H δ)

UV λ (nm) : 224, 315

HRMS : calculée pour C₁₃H₁₁N₂O₃ClF ([M+H]⁺) : 297,0442, mesurée : 297,0445

N*-boc-2-(2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénoxy)éthylamine **25*



Formule brute : C₂₀H₂₃N₃O₅ClF

PM : 439,13 g.mol⁻¹

Rf : 0,42 (cyclohexane/AcOEt : 1/2)

Solide jaune

Protocole³ :

Dans un ballon bicol, 500,0 mg (1,69 mmol) de 2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénol **ITB₅** sont solubilisés dans de l'acétonitrile (100 mL) et agités sous argon. 1,10 g (3,38 mmol, 2 éq) de carbonate de césium sont ajoutés à contre courant d'argon puis après 10 min, 1,89 g (8,47 mmol, 5 éq) de *N*-Boc-2-bromoéthylamine. Le mélange est agité 4 h à reflux et sous argon.

La solution est filtrée sur coton et le solvant évaporé. Le résidu est repris dans du dichlorométhane (50 mL) et de l'eau distillée (50 mL). La phase organique est séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton et le solvant est évaporé. Une purification par chromatographie flash sur colonne Rediseq 80 g en phase normale (cyclohexane/AcOEt : 95/5, 80/20, 70/30 puis 0/100) permet d'obtenir 614,78 mg (1,40 mmol) de *N*-boc-2-(2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénoxy)éthylamine **25** (83 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 1,35 (s, 9H, H₁₈) ; 3,40 (dt, ³J = 5,2 Hz, 2H, H₁₅) ; 4,15 (t, ³J = 4,8 Hz, 2H, H₁₄) ; 4,28 (d, ³J = 6,0 Hz, 2H, H₇) ; 6,44 (t.e., ³J = 6,0 Hz, 1H, NH_a) ; 6,52 (dt, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 3,6 Hz, 1H, H₁) ; 6,66 (dd, ⁴J = 6,4 Hz, ⁴J = 2,4 Hz, 1H, H₅) ; 7,08 (t, ³J = 9,2 Hz, 1H, H₂) ; 7,12 (t.e., ³J = 5,6 Hz, 1H, NH_b) ; 7,21 (d, ³J = 9,2 Hz, 1H, H₁₀) ; 8,09 (d, ⁴J = 2,8 Hz, 1H, H₁₃) ; 8,13 (dd, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 2,8 Hz, 1H, H₁₁)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 28,6 (C₁₈, C₁₉ et C₂₀) ; 40,6 (C₁₅) ; 41,4 (C₇) ; 68,7 (C₁₄) ; 78,2 (C₁₇) ; 112,10 (C₁₀) ; 112,3 (d, ³J = 7 Hz, C₁) ; 112,9 (C₅) ; 117,4 (d, ²J = 21 Hz, C₂) ; 119,8 (d, ²J = 18 Hz, C₄) ; 123,3 (C₁₃) ; 124,9 (C₁₁) ; 129,3 (C₈) ; 141,0 (C₁₂) ; 146,1 (d, ⁴J = 2 Hz, C₆) ; 149,6 (d, ¹J = 233 Hz, C₃), 156,2 (C₁₆) ; 161,9 (C₉)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 9,27 min, m/z : 440 (100), 442 (27) ([M+H⁺])

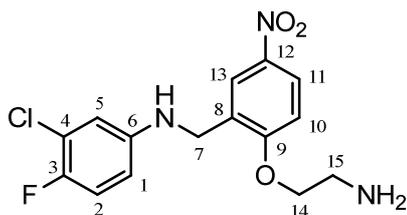
Spectrométrie de masse (ESI/TOF) : m/z : 440 (100), 442 (27) ([M+H⁺])

IR (pastille KBr) ν (cm⁻¹) : 3408, 3371 (N-H ν) ; 2981, 2933 (C-H ν) ; 1681 (C=O ν) ; 1613, 1596 (N-H δ) ; 1526, 1339 (NO₂ ν) ; 1489, 1456, 1399, 1368 (C=C ν) ; 1263 (=C-N ν) ; 1221 (C-O-C ν) ; 1172 (N-C(=O)-O ν) ; 1138 (C-N ν) ; 1067 (C-O-C ν) ; 1050 (O-C-C ν) ; 933, 818, 804, 761, 748 (=C-H δ)

UV λ (nm) : 204, 242, 308

HRMS : calculée pour C₂₀H₂₃N₃O₅ClFNa ([M+Na⁺]) : 462,1208, mesurée : 462,1219

2-(2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénoxy)éthylamine **26**



Formule brute : C₁₅H₁₅N₃O₃ClF

PM : 339,08 g.mol⁻¹

Rf : 0,26 (DCM/MeOH : 9/1)

Huile jaune

Protocole :

1,56 g (3,55 mmol) de *N*-*boc*-2-(2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénoxy)éthylamine **25** sont solubilisés à 0 °C dans une solution d'HCl 4 M dans le dioxane (75 mL) et agités sous argon pendant 45 min.

La solution est dégazée à température ambiante et le solvant évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans du dichlorométhane (150 mL) et lavé avec une solution de NaHCO₃ 5 % (150 mL). La phase organique est séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton et le solvant évaporé pour obtenir 967,22 mg (2,85 mmol) de 2-(2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénoxy)éthylamine **26** (80 %). Le produit est engagé tel quel dans la réaction suivante mais 100 mg ont été purifiés par chromatographie flash sur colonne Rediseq 12 g en phase normale (DCM/MeOH : 100/0, 95/5 puis 90/10) pour analyses. 79,30 mg (0,23 mmol) de 2-(2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénoxy)éthylamine **26** ont été obtenus suite à cette purification.

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 2,95 (t, ³J = 5,2 Hz, 2H, H₁₅) ; 4,13 (t, ³J = 5,6 Hz, 2H, H₁₄) ; 4,30 (d, ³J = 5,2 Hz, 2H, H₇) ; 6,47 (t.e., ³J = 5,6 Hz, 1H, NH) ; 6,53 (ddd, ³J = 9,2 Hz, ⁴J = 4,0 Hz, ⁴J = 3,2 Hz, 1H, H₁) ; 6,69 (dd, ⁴J = 6,4 Hz, ⁴J = 3,2 Hz, 1H, H₅) ; 7,08 (t, ³J = 9,2 Hz, 1H, H₂) ; 7,21 (d, ³J = 9,2 Hz, 1H, H₁₀) ; 8,09 (d, ⁴J = 3,2 Hz, 1H, H₁₃) ; 8,15 (dd, ³J = 9,2 Hz, ⁴J = 3,2 Hz, 1H, H₁₁)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 41,1 (C₁₅) ; 41,5 (C₇) ; 71,9 (C₁₄) ; 112,2 (C₁₀) ; 112,3 (C₁) ; 112,8 (C₅) ; 117,4 (d, ²J = 21 Hz, C₂) ; 119,8 (d, ²J = 18 Hz, C₄) ; 123,4 (C₁₃) ; 124,9 (C₁₁) ; 129,3 (C₈) ; 140,9 (C₁₂) ; 146,3 (d, ⁴J = 2 Hz, C₆) ; 149,6 (d, ¹J = 234 Hz, C₃) ; 162,2 (C₉)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 5,73 min, m/z : 340 (100), 342 (26) ([M+H⁺])

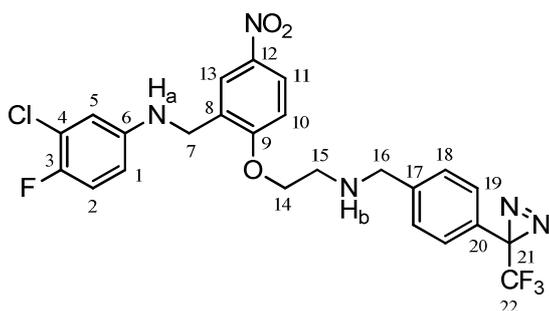
Spectrométrie de masse (ESI/TOF) : m/z : 340 (100), 342 (26) ([M+H⁺])

IR (pastille KBr) ν (cm⁻¹) : 3380, 3318 (N-H ν) ; 3085 (=C-H ν) ; 2958, 2927 (C-H ν) ; 1612, 1591 (N-H δ) ; 1503, 1333 (NO₂ ν) ; 1458 (C=C ν) ; 1262 (=C-N ν) ; 1217 (C-O-C ν) ; 1109 (C-N ν) ; 1078 (C-O-C ν) ; 1005 (C-H δ) ; 930, 896, 856, 811, 765, 749 (=C-H δ)

UV λ (nm) : 204, 242, 308

HRMS : calculée pour C₁₅H₁₆N₃O₃ClF ([M+H⁺]) : 340,0864, mesurée : 340,0861

3-chloro-4-fluoro-N-(5-nitro-2-(2-(4-(3-(trifluorométhyl)diazirinyl)benzylamino)éthoxy)benzyl)aniline 27



Formule brute : C₂₄H₂₀N₅O₃ClF₄

PM : 537,12 g.mol⁻¹

Rf : 0,5 (DCM/MeOH : 95/5)

Huile jaune brun

Protocole (à réaliser en limitant l'exposition directe à la lumière) :

530,1 mg (1,95 mmol) de 3-(4-(2-(1,3-dioxanyl))phényl)-3-(trifluorométhyl)diazirine **21** sont solubilisés dans du tétrahydrofurane (9,5 mL) et de l'eau distillée (0,5 mL). 535,3 mg d'Amberlyst 15 sont ajoutés. Le mélange est agité à 40 °C une nuit puis filtré sur coton. Le solvant est évaporé (P ≥ 150 mbar, température ambiante), le résidu repris dans du dichlorométhane (20 mL) et lavé avec une solution de NaHCO₃ 5 % (10 mL). La phase organique est séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton et le solvant évaporé (P ≥ 150 mbar, température ambiante) pour donner une huile jaunâtre (mélange aldéhyde/acétal : 50/50).

L'huile obtenue (0,98 mmol d'aldéhyde) et 399,38 mg de 2-(2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénoxy)éthylamine **26** (1,18 mmol, 1,2 éq) sont solubilisés dans du dichlorométhane (15 mL). 10 min plus tard, 417,36 mg de NaBH(OAc)₃ (1,97 mmol, 2 éq) sont ajoutés et le mélange est agité 19 h à température ambiante. Du dichlorométhane (25 mL) et une solution de NaHCO₃ 5 % (25 mL) sont ajoutés au mélange. La phase organique est séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton et le solvant évaporé. Une chromatographie flash sur colonne Rediseq 12 g en phase normale (DCM/MeOH : 100/0, 98/2, 95/5 puis 90/10) permet d'obtenir 333,5 mg (0,62 mmol) de 3-chloro-4-fluoro-N-(5-nitro-2-(2-(4-(3-(trifluorométhyl)diazirinyl)benzylamino)éthoxy)benzyl)aniline **27** (32 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 2,90 (t, ³J = 5,2 Hz, 2H, H₁₅) ; 3,80 (s, 2H, H₁₆) ; 4,22 (t, ³J = 5,6 Hz, 2H, H₁₄) ; 4,28 (d, ³J = 6,4 Hz, 2H, H₇) ; 6,41 (t, ³J = 6,4 Hz, 1H, NH_a) ; 6,51 (ddd, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 3,6 Hz, ⁴J = 2,8 Hz, 1H, H₁) ; 6,65 (dd, ⁴J = 6,0 Hz, ⁴J = 2,8 Hz, 1H, H₅) ; 7,04 (t, ³J = 9,2 Hz, 1H, H₂) ; 7,15 (d, J_{AB} = 7,6 Hz, 2H, H₁₉) ; 7,45 (d, J_{AB} = 8,4 Hz, 2H, H₁₈) ; 7,19 (d, ³J = 8,8 Hz, 1H, H₁₀) ; 8,10 (d, ⁴J = 2,8 Hz, 1H, H₁₃) ; 8,13 (dd, ³J = 9,2 Hz, ⁴J = 3,2 Hz, 1H, H₁₁)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 28,4 (q, ²J = 39 Hz, C₂₁) ; 41,6 (C₇) ; 47,4 (C₁₅) ; 52,3 (C₁₆) ; 69,2 (C₁₄) ; 112,2 (C₁₀) ; 112,3 (d, ³J = 7 Hz, C₁) ; 112,8 (C₅) ; 117,4 (d, ²J = 22 Hz, C₂) ; 119,8 (d, ²J = 18 Hz, C₄) ; 122,3 (q, ¹J = 273 Hz, C₂₂) ; 123,5 (C₁₃) ; 125,0 (C₁₁) ; 126,1 (C₁₉) ; 126,5 (C₂₀) ; 129,0 (C₁₈) ; 129,2 (C₈) ; 140,9 (C₁₂) ; 143,9 (C₁₇) ; 146,3 (d, ⁴J = 2 Hz, C₆) ; 149,6 (d, ¹J = 233 Hz, C₃) ; 162,1 (C₉)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 7,38 min, m/z : 538 (100), 540 (25) ([M+H⁺])

Spectrométrie de masse (ESI/TOF) : m/z : 538 (100), 540 (25) ([M+H⁺])

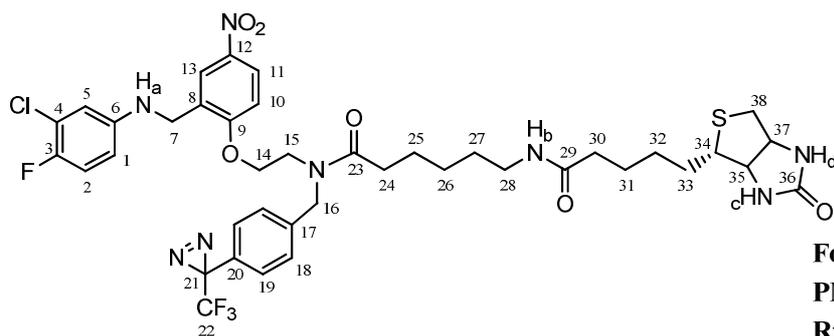
IR (pastille KBr) ν (cm⁻¹) : 3411 (N-H ν) ; 3082 (=C-H ν) ; 2929, 2852 (C-H ν) ; 1714 (bande harmonique) ; 1612, 1593 (N-H δ) ; 1513, 1341 (NO₂ ν) ; 1458 (C=C ν) ; 1266 (=C-N

ν) ; 1230 (C-O-C ν) ; 1184, 1155 (C-F ν) ; 1095 (C-N ν) ; 1069 (C-O-C ν) ; 1050 (C-H δ) ; 938, 908, 807, 750 (=C-H δ)

UV λ (nm) : 205, 243, 309

HRMS : calculée pour $C_{24}H_{21}N_5O_3ClF_4$ ($[M+H^+]$) : 538,1269, mesurée : 538,1251

***N*-2-(2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénoxy)éthyl)-*N*-(4-(3-(trifluorométhyl)diazirinyl)benzyl)-6-biotinylaminohexanamide (ITB₅-P₁)**



Formule brute : C₄₀H₄₅N₈O₆ClF₄S

PM : 876,28 g.mol⁻¹

Rf : 0,27 (DCM/MeOH : 95/5)

Huile jaune

Protocole (à réaliser en limitant l'exposition directe à la lumière) :

437,27 mg (1,22 mmol) d'acide 6-(biotinylamino)caproïque **24** et 464,98 mg (1,22 mmol, 1 éq) d'hexafluorophosphate de *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium sont solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (14 mL). Après 5 min, 329,0 mg (0,61 mmol, 0,5 éq) de 3-chloro-4-fluoro-*N*-(5-nitro-2-(2-(4-(3-(trifluorométhyl)diazirinyl)benzylamino)éthoxy)benzyl)aniline **27** préalablement solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (6 mL) et 200 µL (1,15 mmol, 0,9 éq) de *N,N*-diisopropyléthylamine sont ajoutés et le mélange est laissé à agiter 40 h à température ambiante.

Du dichlorométhane (100 mL) et une solution de NaHCO₃ 5 % (100 mL) sont ajoutés au mélange. La phase organique est lavée avec de l'HCl 1 M (2 x 100 mL), séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton et le solvant évaporé. Une chromatographie flash sur colonne Rediseq 12 g en phase normale (DCM/MeOH : 100/0, 98/2, 95/5, 92,5/7,5 puis 90/10) permet d'obtenir 300,0 mg (0,34 mmol) de *N*-2-(2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénoxy)éthyl)-*N*-(4-(3-trifluorométhyl)diazirinyl)benzyl)-6-biotinylaminohexanamide (ITB₅-P₁) (55 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm)* : 1,05-1,59 (m, 12H, H₂₅, H₂₆, H₂₇, H₃₁, H₃₂ et H₃₃) ; 2,0, 2,01 (2t, ³*J* = 7,2 Hz, 2H, H₃₀) ; 2,22, 2,53 (2t, ³*J* = 7,2 Hz, 2H, H₂₄) ; 2,55 (d, ²*J* = 12,4 Hz, 1H, H₃₈) ; 2,79 (dd, ²*J* = 12,4 Hz, ³*J* = 4,8 Hz, 1H, H_{38'}) ; 2,92, 2,95 (2dt, ³*J* = 6,8 Hz, ³*J* = 6,0 Hz, 2H, H₂₈) ; 3,06 (m, 1H, H₃₄) ; 3,74, 3,79 (2t, ³*J* = 4,8 Hz, 2H, H₁₅) ; 4,1 (m, 1H, H₃₅) ; 4,17, 4,19 (2d, ³*J* = 6,0 Hz, 2H, H₇) ; 4,22, 4,27 (2t, ³*J* = 5,2 Hz, 2H, H₁₄) ; 4,27 (dd, ³*J* = 7,6 Hz, ³*J* = 4,8 Hz, 1H, H₃₇) ; 4,64, 4,74 (2s, 2H, H₁₆) ; 6,35 (s.e., 1H, NH_c ou NH_d) ; 6,38, 6,42 (2t.e., ³*J* = 6,4 Hz, 1H, NH_a) ; 6,41 (s.e., 1H, NH_c ou NH_d) ; 6,51 (m, 1H, H₁) ; 6,63, 6,66 (2dd, ⁴*J* = 6,0 Hz, ⁴*J* = 2,8 Hz, 1H, H₅) ; 7,05, 7,09 (2t, ³*J* = 9,2 Hz, 1H, H₂) ; 7,09, 7,17 (2d, ³*J* = 9,2 Hz, 1H, H₁₀) ; 7,08, 7,21 (2d, *J*_{AB} = 8,0 Hz, 2H, H₁₉) ; 7,27, 7,29 (2d, *J*_{AB} = 8,4 Hz, 2H, H₁₈) ; 7,66, 7,69 (2t.e., ³*J* = 6,0 Hz, 1H, NH_b) ; 8,06, 8,10 (2d, ⁴*J* = 2,8 Hz, 1H, H₁₃) ; 8,11, 8,13 (2dd, ³*J* = 9,2 Hz, ⁴*J* = 2,8 Hz, 1H, H₁₁)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm)* : 24,8, 25,0, 25,7, 26,5, 26,6, 28,4, 28,6, 29,4, 29,5 (C₂₅, C₂₆, C₂₇, C₃₁, C₃₂ et C₃₃) ; 28,3 (q, ²*J* = 36 Hz, C₂₁) ; 32,7, 32,8 (C₂₄) ; 35,6 (C₃₀) ; 38,5, 38,6 (C₂₈) ; 40,3 (C₃₈) ; 41,7, 41,8 (C₇) ; 45,4, 46,8 (C₁₅) ; 48,3, 51,3 (C₁₆) ; 55,8 (C₃₄) ; 59,6 (C₃₇) ; 61,4 (C₃₅) ; 67,2 (C₁₄) ; 112,0, 112,1 (C₁₀) ; 112,2, 112,3 (C₁) ; 112,7, 112,8 (C₅) ; 117,3, 117,5 et 117,4, 117,6 (2d, ²*J* = 22 Hz, C₂) ; 119,5 (q, ¹*J* = 274 Hz, C₂₂) ; 119,7, 119,9 et 119,8, 120,0 (2d, ²*J* = 18 Hz, C₄) ; 123,3, 123,6 (C₁₃) ; 124,9, 125,0 (C₁₁) ; 126,3, 126,8 (C₂₀) ;

126,7, 127,2 (C₁₉) ; 127,5, 128,4 (C₁₈) ; 128,8, 128,9 (C₈) ; 140,9, 141,0 (C₁₂) ; 141,2, 141,6 (C₁₇) ; 146,2, 146,3 (C₆) ; 148,5, 150,8 et 148,6, 150,9 (2d, ¹J = 230 Hz, C₃) ; 161,5, 161,8 (C₉) ; 163,1 (C₃₆) ; 172,1, 172,2 (C₂₃ ou C₂₉) ; 173,2, 173,4 (C₂₃ ou C₂₉)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 8,82 min, m/z : 877 (100), 879 (36) ([M+H⁺])

Spectrométrie de masse (ESI/TOF) : m/z : 877 (67), 879 (32) ([M+H⁺]) ; 899 (100), 901 (44) ([M+Na⁺])

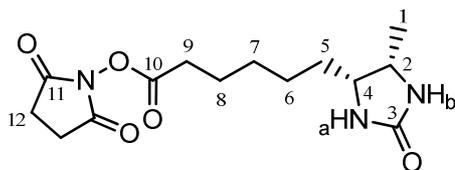
IR (pastille KBr) ν (cm⁻¹) : 3309 (N-H ν) ; 3083 (=C-H ν) ; 2932, 2861 (C-H ν) ; 1703, 1643 (C=O ν) ; 1614, 1593 (N-H δ) ; 1515, 1341 (NO₂ ν) ; 1462 (C=C ν) ; 1266 (=C-N ν) ; 1229 (C-O-C ν) ; 1182, 1154 (C-F ν) ; 1095 (C-N ν) ; 1069 (C-O-C ν) ; 1050 (C-H δ) ; 938, 806, 750 (=C-H δ)

UV λ (nm) : ϵ (202 nm) = 1,32.10⁴ L.mol⁻¹.cm⁻¹ ; ϵ (308 nm) = 5,81.10⁴ L.mol⁻¹.cm⁻¹

HRMS : calculée pour C₄₀H₄₅N₈O₆ClF₄SNa ([M+Na⁺]) : 899,2705, mesurée : 899,2690

* Le produit est obtenu sous la forme de deux conformères, d'où le dédoublement de presque tous les signaux.

Succinimido desthiobiotinate⁴ **28**



Formule brute : C₁₄H₂₁N₃O₅

PM : 311,15 g.mol⁻¹

Solide blanc

Protocole :

479,50 mg (2,24 mmol) de Desthiobiotine sont solubilisés dans du diméthylformamide (20 mL) et agités sous argon. 485,25 mg (2,35 mmol, 1,1 éq) de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide préalablement solubilisés dans du diméthylformamide (2,5 mL) sont ajoutés puis après 10 min, 268,60 mg (2,34 mmol, 1,1 éq) de *N*-hydroxysuccinimide également solubilisés dans du diméthylformamide (2,5 mL). Le mélange est laissé à agiter 5 jours à température ambiante et sous argon.

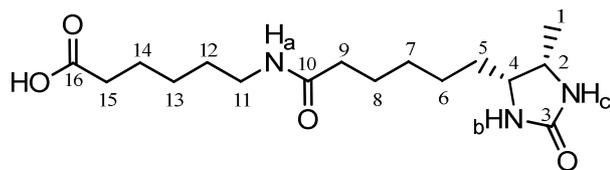
Le mélange est filtré sur fritté n°3 et le filtrat évaporé sous pression réduite à 60 °C pour obtenir du succinimido desthiobiotinate **28** avec un rendement quantitatif. Le produit est suffisamment pur pour être engagé dans la réaction suivante sans autre purification.

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 0,93 (d, ³J = 6,4 Hz, 3H, H₁) ; 1,13-1,35 (m, 8H, H₅, H₆, H₇ et H₈) ; 2,65 (t, ³J = 7,6 Hz, 2H, H₉) ; 2,79 (s, 4H, H₁₂) ; 3,46 (m, 1H, H₄) ; 3,59 (q, ³J = 6,4 Hz, 1H, H₂) ; 6,10 (s, 1H, NH_a ou NH_b) ; 6,29 (s, 1H, NH_a ou NH_b)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 5,05 min, m/z : 312 ([M+H⁺])

Acide 6-(desthiobiotinylamino)caproïque⁴ **29**



Formule brute : C₁₆H₂₉N₃O₄

PM : 327,22 g.mol⁻¹

Solide blanc

Protocole :

697,10 mg (2,24 mmol) de succinimido desthiobiotinate **28** sont solubilisés dans du diméthylformamide (20 mL). 309,8 mg (2,36 mmol, 1,1 éq) d'acide 6-amino caproïque préalablement solubilisés dans du diméthylformamide (5 mL) sont ajoutés puis 390 µL de triéthylamine (2,80 mmol, 1,3 éq). Le mélange est laissé à agiter 15 h à température ambiante et sous argon.

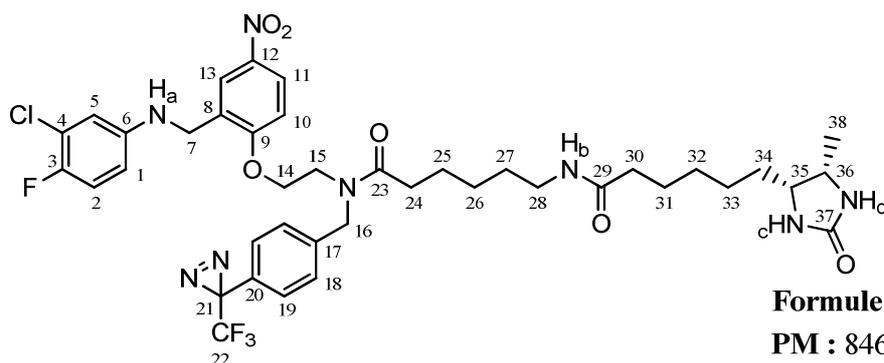
Le mélange est filtré sur fritté n°3 et le filtrat évaporé sous pression réduite à 60 °C. Le résidu est repris dans du dichlorométhane (50 mL) et une solution de NH₄Cl saturée (50 mL). Le solide qui se forme entre les deux phases est récupéré avec la phase aqueuse qui est ensuite filtrée sur fritté n°3. Le solide obtenu est séché sous pression réduite pour obtenir 254,66 mg (0,78 mmol) d'acide 6-(desthiobiotinylamino)caproïque **29** (35 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 0,93 (d, ³J = 7,6 Hz, 3H, H₁), 1,13-1,50 (m, 14H, H₅, H₆, H₇, H₈, H₁₂, H₁₃ et H₁₄) ; 2,01 (t, ³J = 7,6 Hz, 2H, H₉) ; 2,16 (t, ³J = 7,2 Hz, 2H, H₁₅) ; 2,98 (dt, ³J = 6,8 Hz, ³J = 6,4 Hz, 2H, H₁₁) ; 3,46 (m, 1H, H₄) ; 3,58 (quint, ³J = 6,4 Hz, 1H, H₂) ; 6,11 (s.e., 1H, NH_b ou NH_c) ; 6,29 (s.e., 1H, NH_b ou NH_c) ; 7,71 (t.e., ³J = 5,6 Hz, 1H, NH_a) ; 11,98 (s.e., 1H, OH)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 4,50 min, m/z : 328 ([M+H⁺])

***N*-2-(2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénoxy)éthyl)-*N*-(4-(3-(trifluorométhyl)diazirinyl)benzyl)-6-desthiobiotinylaminohexanamide (ITB₅-P₂)**



Formule brute : C₄₀H₄₇N₈O₆ClF₄

PM : 846,32 g.mol⁻¹

Rf : 0,8 (DCM/MeOH : 95/5)

Solide jaune

Protocole (à réaliser en limitant l'exposition directe à la lumière) :

120,70 mg (0,37 mmol) d'acide 6-(desthiobiotinylamino)caproïque **29** et 141,08 mg (0,37 mmol, 1 éq) d'hexafluorophosphate de *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium sont solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (2,4 mL). 45 µL (0,26 mmol, 0,7 éq) de *N,N*-diisopropyléthylamine sont ajoutés au mélange puis 103,16 mg (0,19 mmol, 0,5 éq) de 3-chloro-4-fluoro-*N*-(5-nitro-2-(2-(4-(3-(trifluorométhyl)diazirinyl)benzylamino)éthoxy)benzyl) aniline **27** préalablement solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (1,4 mL). Le mélange est laissé à agiter 18 h à température ambiante.

Du dichlorométhane (25 mL) est ajouté au mélange qui est ensuite lavé avec une solution de NaHCO₃ 5 % (2 x 12,5 mL) et de l'HCl 1 M (2 x 12,5 mL). La phase organique est séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton et le solvant évaporé. Une chromatographie flash sur colonne Rediseq 4 g en phase normale (DCM/MeOH : 100/0, 99/1, 98,5/1,5, 97,5/2,5, 97/3, 96/4, 95/5, 94/6 puis 93/7) permet d'obtenir 126,95 mg (0,15 mmol) de *N*-2-(2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénoxy)éthyl)-*N*-(4-(3-(trifluorométhyl)diazirinyl)benzyl)-6-desthiobiotinylaminohexanamide (ITB₅-P₂) (79 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm)* : 0,91, 0,92 (2d, ³*J* = 6,4 Hz, 3H, H₃₈) ; 1,12-1,52 (m, 14H, H₂₅, H₂₆, H₂₇, H₃₁, H₃₂, H₃₃ et H₃₄) ; 1,98, 1,99 (2t, ³*J* = 7,2 Hz, 2H, H₃₀) ; 2,21, 2,50 (2t, ³*J* = 7,2 Hz, 2H, H₂₄) ; 2,91, 2,95 (2dt, ³*J* = 7,2 Hz, ³*J* = 6,0 Hz, 2H, H₂₈) ; 3,44 (m, 1H, H₃₅) ; 3,56 (m, 1H, H₃₆) ; 3,73, 3,78 (2t, ³*J* = 4,8 Hz, 2H, H₁₅) ; 4,16, 4,18 (2d, ³*J* = 5,6 Hz, 2H, H₇) ; 4,21, 4,27 (2t, ³*J* = 4,8 Hz, 2H, H₁₄) ; 4,63, 4,74 (2s, 2H, H₁₆) ; 6,11 (s.e., 1H, NH_c ou NH_d) ; 6,29 (s.e., 1H, NH_c ou NH_d) ; 6,39, 6,42 (2t.e., ³*J* = 6,4 Hz, 1H, NH_a) ; 6,51 (m, 1H, H₁) ; 6,63, 6,66 (2dd, ⁴*J* = 6,0 Hz, ⁴*J* = 2,4 Hz, 1H, H₅) ; 7,05, 7,09 (2t, ³*J* = 9,2 Hz, 1H, H₂) ; 7,09, 7,17 (2d, ³*J* = 9,2 Hz, 1H, H₁₀) ; 7,07, 7,21 (2d, *J*_{AB} = 8,0 Hz, 2H, H₁₉) ; 7,27, 7,29 (2d, *J*_{AB} = 8,4 Hz, 2H, H₁₈) ; 7,65, 7,68 (2t, ³*J* = 6,0 Hz, 1H, NH_b) ; 8,05, 8,09 (2d, ⁴*J* = 2,8 Hz, 1H, H₁₃) ; 8,11, 8,13 (2dd, ³*J* = 9,2 Hz, ⁴*J* = 2,8 Hz, 1H, H₁₁)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm)* : 15,8 (C₃₈) ; 24,8, 24,9, 25,6, 25,9, 26,4, 26,6, 29,1, 29,4, 29,5, 29,9 (C₂₅, C₂₆, C₂₇, C₃₁, C₃₂, C₃₃ et C₃₄) ; 28,3 (q, ²*J* = 36 Hz, C₂₁) ; 32,6, 32,7 (C₂₄) ; 35,7 (C₃₀) ; 38,5, 38,6 (C₂₈) ; 41,8 (C₇) ; 45,4, 46,8 (C₁₅) ; 48,3, 51,3 (C₁₆) ; 50,5 (C₃₆) ; 55,3 (C₃₅) ; 67,2 (C₁₄) ; 112,0, 112,1 (C₁₀) ; 112,2, 112,3 (C₁) ; 112,7, 112,8 (C₅) ; 117,3, 117,5 et 117,4, 117,6 (2d, ²*J* = 21 Hz, C₂) ; 119,7, 119,9 et 119,8, 120,0 (2d, ²*J* = 18 Hz, C₄) ; 123,3, 123,6 (C₁₃) ; 124,9, 125,0 (C₁₁) ; 126,3, 126,7 (C₂₀) ; 126,7, 127,2 (C₁₉) ; 127,5, 128,4

(C₁₈) ; 128,8, 128,9 (C₈) ; 140,9, 141,0 (C₁₂) ; 141,2, 141,6 (C₁₇) ; 146,2, 146,3 (C₆) ; 148,5, 150,9 et 148,6, 151,0 (2d, ¹J = 240 Hz, C₃) ; 161,5, 161,8 (C₉) ; 163,2 (C₃₇) ; 172,2 (C₂₃ ou C₂₉) ; 173,1, 173,4 (C₂₃ ou C₂₉)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 8,63 min, m/z : 847 (100), 849 (37) ([M+H⁺])

Spectrométrie de masse (ESI/TOF) : m/z (%) : 847 (56), 849 (21) ([M+H⁺]) ; 869 (100), 871 (46) ([M+Na⁺])

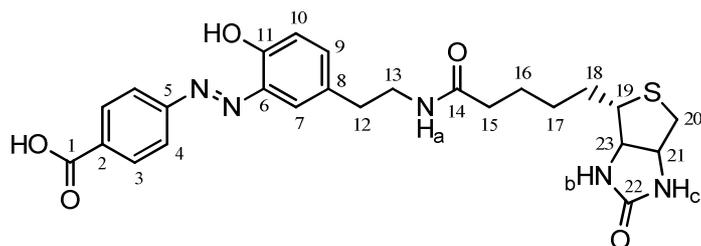
IR (pastille KBr) ν (cm⁻¹) : 3309 (N-H ν) ; 3083 (=C-H ν) ; 2936, 2861 (C-H ν) ; 1701, 1643 (C=O ν) ; 1593 (N-H δ) ; 1516, 1341 (NO₂ ν) ; 1463 (C=C ν) ; 1266 (=C-N ν) ; 1229 (C-O-C ν) ; 1183, 1155 (C-F ν) ; 1096 (C-N ν) ; 1070 (C-O-C ν) ; 1050 (C-H δ) ; 937, 844, 806, 750 (=C-H δ)

UV λ (nm) : ε(309 nm) = 1,17.10⁴ L. mol⁻¹.cm⁻¹

HRMS : calculée pour C₄₀H₄₈N₈O₆ClF₄ ([M+H⁺]) : 847,3321, mesurée : 847,3304

* Le produit est obtenu sous la forme de deux conformères, d'où le dédoublement de presque tous les signaux.

Acide 4-((E)-(2-hydroxy-5-((N-biotinyl)-2-aminoéthyl)phényl)diazényl)benzoïque **30**



Formule brute : C₂₅H₂₉N₅O₅S

PM : 511,19 g.mol⁻¹

Solide jaune orangé

Protocole⁵ :

972,0 mg (7,09 mmol) d'acide 4-aminobenzoïque sont dissous dans de l'HCl 6 M (14 mL) et refroidis à 4 °C. 1,22 g (17,68 mmol, 2,5 éq) de nitrite de sodium préalablement dissous dans de l'eau (3 mL) sont ajoutés goutte à goutte. Après 20 min, le mélange est lentement additionné, à 4 °C, à une solution de 619,0 mg (3,55 mmol, 0,5 éq) de tyramine chlorhydratée dans du NaHCO₃ saturé (9 mL). Une solution de NaHCO₃ saturée est ajoutée au fur et à mesure de l'addition afin de maintenir le mélange réactionnel à un pH basique. Après 10 min, le bain de glace est retiré et le mélange laissé à agiter 16 h à température ambiante.

Une solution de 1,33 g (3,90 mmol, 0,5 éq) de succinimido biotinate **23** dans du diméthylsulfoxyde (20 mL) est ajoutée au mélange réactionnel qui est encore laissé à agiter 3 h à température ambiante. De l'HCl 12 M est ajouté jusqu'à obtention d'un pH acide. Après ajout d'acétate d'éthyle (200 mL), le solide formé est filtré sur fritté n°4, lavé avec de l'éther diéthylique (2 x 100 mL) puis séché sous vide. Le résidu est repris dans du diméthylsulfoxyde (15 mL) et de l'éthanol absolu (70 mL) puis filtré sur fritté n°3. Le précipité est lavé à l'éthanol absolu (3 x 10 mL) et les lavages additionnés au filtrat, lequel est lyophilisé pour obtenir 1,73 g (3,38 mmol) d'acide 4-((E)-(2-hydroxy-5-((N-biotinyl)-2-aminoéthyl)phényl)diazényl)benzoïque **30** (95 %).

Le produit est engagé tel quel dans la réaction suivante mais 100 mg ont été purifiés par HPLC pour analyses. La purification a été réalisée sur une colonne Waters X-Bridge Phényl 5 µm, 19 x 150 mm avec un débit de 17 mL/min et un éluant constitué du mélange entre une solution A (H₂O + 0,1 % d'acide formique) et une solution B (acétonitrile + 0,1 % d'acide formique). Les proportions de solutions A/B sont de 95/5 à t = 0 min et de 50/50 à t = 24 min. 6,33 mg d'acide 4-((E)-(2-hydroxy-5-((N-biotinyl)-2-aminoéthyl)phényl)diazényl)benzoïque **30** purs à plus de 95 % ont ainsi été obtenus.

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 1,21-1,58 (m, 6H, H₁₆, H₁₇ et H₁₈) ; 2,01 (t, ³J = 7,6 Hz, 2H, H₁₅) ; 2,54 (d, ²J = 12,4 Hz, 1H, H₂₀) ; 2,69 (t, ³J = 6,8 Hz, 2H, H₁₂) ; 2,77 (dd, ²J = 12,4 Hz, ³J = 5,2 Hz, 1H, H_{20'}) ; 3,01 (m, 1H, H₁₉) ; 3,26 (dt, ³J = 7,2 Hz, ³J = 6,0 Hz, 2H, H₁₃) ; 4,06 (m, 1H, H₂₃) ; 4,25 (m, 1H, H₂₁) ; 6,33 (s.e., 1H, NH_b ou NH_c) ; 6,38 (s.e., 1H, NH_b ou NH_c) ; 7,0 (d, ³J = 8,4 Hz, 1H, H₁₀) ; 7,28 (dd, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 2,4 Hz, 1H, H₉) ; 7,56 (d, ⁴J = 2,0 Hz, 1H, H₇) ; 7,83 (t.e., ³J = 5,6 Hz, 1H, NH_a) ; 8,03 (d, J_{AB} = 8,4 Hz, 2H, H₄ ou H₃) ; 8,10 (d, J_{AB} = 8,8 Hz, 2H, H₄ ou H₃) ; 10,88 (s.e., 1H, OH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 25,7, 28,4, 28,5 (C₁₆, C₁₇ et C₁₈) ; 34,5 (C₁₂) ; 35,6 (C₁₅) ; 40,3 (C₂₀) ; 40,6 (C₁₃) ; 55,8 (C₁₉) ; 59,6 (C₂₁) ; 61,4 (C₂₃) ; 118,6 (C₁₀) ; 122,2 (C₇) ; 122,9 (C₄) ; 130,9 (C₃) ; 131,4 (C₆) ; 135,3 (C₉) ; 138,8 (C₂ et C₈) ; 154,0 (C₁₁ ou C₅) ; 154,3 (C₁₁ ou C₅) ; 163,1 (C₂₂) ; 167,3 (C₁) ; 172,4 (C₁₄)

LC/MS (X-bridge 100 x 4,6 mm) : t_R = 5,82 min, m/z : 512 ([M+H⁺])

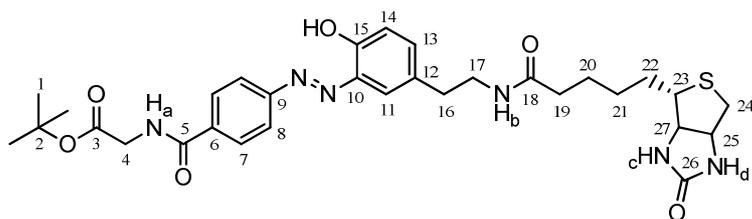
Spectrométrie de masse (ESI/TOF) : m/z : 534 ([M+Na⁺])

IR (pastille KBr) ν (cm⁻¹) : 3283 (N-H ν) ; 3074 (=C-H ν) ; 2927, 2859 (C-H ν) ; 2670-2361 (O-H ν) ; 1700, 1641 (C=O ν) ; 1549 (N-H δ) ; 1497, 1425 (C=C ν) ; 1277 (=C-N ν) ; 1141 (C-N ν) ; 864, 778 (=C-H δ)

UV λ (nm) : 251, 329

HRMS : calculée pour C₂₅H₂₉N₅O₅SNa ([M+Na⁺]) : 534,1787, mesurée : 534,1791

tert*-butyl 2-(4-((*E*)-(2-hydroxy-5-((*N*-biotinyl)-2-aminoéthyl)phényl)diazényl)benzamido)acétate **31*



Formule brute : C₃₁H₄₀N₆O₆S

PM : 624,27 g.mol⁻¹

Rf : 0,38 (DCM/MeOH : 90/10)

Solide jaune orangé

Protocole :

896,3 mg (1,75 mmol) d'acide 4-((*E*)-(2-hydroxy-5-((*N*-biotinyl)-2-aminoéthyl)phényl)diazényl)benzoïque **30** sont dissous dans du diméthylsulfoxyde (10 mL). 850 µL (4,88 mmol, 2,8 éq) de *N,N*-diisopropyléthylamine sont ajoutés puis 501,16 mg (1,32 mmol, 0,8 éq) d'hexafluorophosphate de *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium et 146,8 mg (0,88 mmol, 0,5 éq) de glycine *tert*-butyl ester, tous deux solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (3,5 mL). Le mélange est laissé à agiter 16 h à température ambiante.

Du dichlorométhane (200 mL) et une solution de NaHCO₃ 5 % (200 mL) sont ajoutés au mélange. La phase organique est lavée avec du NaHCO₃ 5 % (100 mL) puis avec de l'HCl 1 M (200 puis 100 mL). Elle est séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton et le solvant évaporé. Une chromatographie flash sur colonne Interchim 12 g en phase normale (DCM/MeOH : 100/0, 98/2, 97/3, 95,5/4,5, 96/4, 92,5/7,5 puis 91/9) permet d'obtenir 75,0 mg (0,12 mmol) de *tert*-butyl 2-(4-((*E*)-(2-hydroxy-5-((*N*-biotinyl)-2-aminoéthyl)phényl)diazényl)benzamido)acétate **31** (14 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 1,21-1,56 (m, 6H, H₂₀, H₂₁ et H₂₂) ; 1,42 (s, 9H, H₁) ; 2,01 (t, ³*J* = 7,2 Hz, 2H, H₁₉) ; 2,54 (d, ²*J* = 12,4 Hz, 1H, H₂₄) ; 2,68 (t, ³*J* = 6,8 Hz, 2H, H₁₆) ; 2,77 (dd, ²*J* = 12,4 Hz, ³*J* = 5,2 Hz, 1H, H_{24'}) ; 3,01 (m, 1H, H₂₃) ; 3,26 (dt, ³*J* = 7,2 Hz, ³*J* = 6,0 Hz, 2H, H₁₇) ; 3,92 (d, ³*J* = 6,0 Hz, 2H, H₄) ; 4,06 (m, 1H, H₂₇) ; 4,26 (m, 1H, H₂₅) ; 6,34 (s.e., 1H, NH_c ou NH_d) ; 6,40 (s.e., 1H, NH_c ou NH_d) ; 7,0 (d, ³*J* = 8,4 Hz, 1H, H₁₄) ; 7,28 (dd, ³*J* = 8,4 Hz, ⁴*J* = 2,0 Hz, 1H, H₁₃) ; 7,56 (d, ⁴*J* = 2,4 Hz, 1H, H₁₁) ; 7,84 (t.e., ³*J* = 5,6 Hz, 1H, NH_b) ; 8,05 (2d, *J*_{AB} = 8,8 Hz, *J*_{AB} = 8,8 Hz, 4H, H₇ et H₈) ; 9,02 (t.e., ³*J* = 6,0 Hz, 1H, NH_a) ; 10,85 (s.e., 1H, OH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 25,7, 28,4, 28,5 (C₂₀, C₂₁ et C₂₂) ; 28,1 (C₁) ; 34,5 (C₁₆) ; 35,6 (C₁₉) ; 40,3 (C₂₄) ; 40,6 (C₁₇) ; 42,4 (C₄) ; 55,8 (C₂₃) ; 59,6 (C₂₅) ; 61,4 (C₂₇) ; 81,1 (C₂) ; 118,6 (C₁₄) ; 122,1 (C₁₁) ; 122,9 (C₈) ; 128,9 (C₇) ; 131,3 (C₁₀) ; 135,2 (C₁₃) ; 135,9 (C₆) ; 138,7 (C₁₂) ; 153,6 (C₉ ou C₁₅) ; 154,0 (C₉ ou C₁₅) ; 163,1 (C₂₆) ; 166,2 (C₅) ; 169,3 (C₃) ; 172,4 (C₁₈)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 6,32 min, m/z : 625 ([M+H⁺])

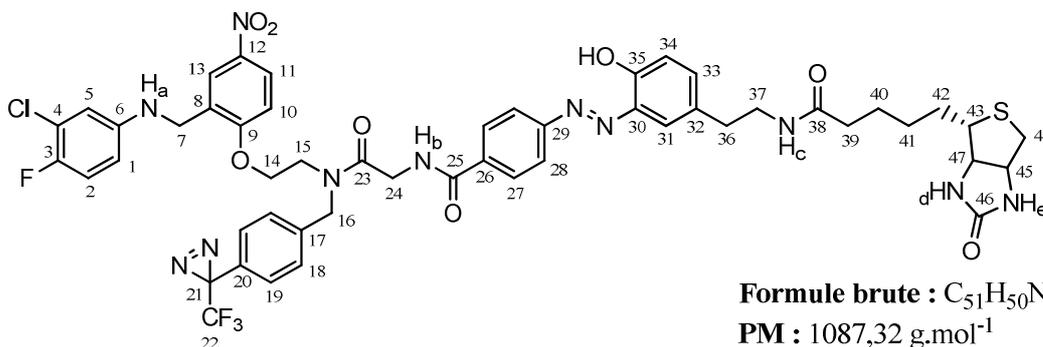
Spectrométrie de masse (ESI/TOF) : m/z : 625 ([M+H⁺]) ; 647 ([M+Na⁺])

IR (pastille KBr) ν (cm⁻¹) : 3292 (N-H ν) ; 3075 (=C-H ν) ; 2975, 2930 (C-H ν) ; 1703, 1647 (C=O ν) ; 1542 (N-H δ) ; 1493, 1458, 1425, 1368 (C=C ν) ; 1228 (=C-N ν) ; 1154 (C-N ν) ; 856, 755 (=C-H δ)

UV λ (nm) : 220, 332

HRMS : calculée pour C₃₁H₄₁N₆O₆S ([M+H⁺]) : 625,2808, mesurée : 625,2798

***N*-2-((2-(2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénoxy)éthyl)-*N*-(4-(3-(trifluorométhyl)diaziriny)benzyl)-2-(4-((*E*)-2-hydroxy-5-((*N*-biotinyl)-2-aminoéthyl)phényl)diazényl)benzamido)acétamide (**ITB₅-P₃**)**



Formule brute : C₅₁H₅₀N₁₁O₈SClF₄

PM : 1087,32 g.mol⁻¹

Rf : 0,39 (DCM/MeOH : 97/3)

Solide orange

Protocole (à réaliser en limitant l'exposition directe à la lumière) :

105,75 mg (0,19 mmol) d'acide 2-(4-((*E*)-2-hydroxy-5-((*N*-biotinyl)-2-aminoéthyl)phényl)diazényl)benzamido)acétique **32** sont dissous dans du diméthylsulfoxyde (2 mL). 70 µL (0,40 mmol, 2,1 éq) de *N,N*-diisopropyléthylamine sont ajoutés puis 84,51 mg (0,22 mmol, 1,2 éq) d'hexafluorophosphate de *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium et 121,63 mg (0,23 mmol, 1,2 éq) de 3-chloro-4-fluoro-*N*-(5-nitro-2-(2-(4-(3-(trifluorométhyl)diaziriny)benzylamino)éthoxy)benzyl)aniline **27**, tous deux préalablement solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (750 µL). Le mélange est laissé à agiter 16 h à température ambiante.

Du dichlorométhane (50 mL) et une solution de NaHCO₃ 5 % (2,5 mL) sont ajoutés au mélange. La phase organique est lavée avec de l'HCl 1 M (2 x 50 mL), séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton et le solvant est évaporé. Une chromatographie flash sur colonne Interchim 12 g en phase normale (DCM/MeOH : 100/0, 98,6/1,4, 96/4, puis 90/10) permet d'obtenir 76,95 mg (0,07 mmol) de *N*-2-((2-(2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénoxy)éthyl)-*N*-(4-(3-(trifluorométhyl)diaziriny)benzyl)-2-(4-((*E*)-2-hydroxy-5-((*N*-biotinyl)-2-aminoéthyl)phényl)diazényl)benzamido)acétamide (**ITB₅-P₃**) (37 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm)* : 1,20-1,56 (m, 6H, H₄₀, H₄₁, H₄₂) ; 2,01 (t, ³*J* = 7,6 Hz, 2H, H₃₉) ; 2,54 (d, ²*J* = 12,4 Hz, 1H, H₄₄) ; 2,69 (t, ³*J* = 7,2 Hz, 2H, H₃₆) ; 2,77 (dd, ²*J* = 12,4 Hz, ³*J* = 5,2 Hz, 1H, H_{44'}) ; 3,02 (m, 1H, H₄₃) ; 3,26 (dt, ³*J* = 6,8 Hz, ³*J* = 6,4 Hz, 2H, H₃₇) ; 3,78, 3,91 (2t, ³*J* = 5,2 Hz, 2H, H₁₅) ; 4,06 (ddd, ⁴*J* = 1,6 Hz, ³*J* = 4,4 Hz, ³*J* = 7,6 Hz, 1H, H₄₇) ; 4,11-4,42 (d, m, d, ³*J* = 5,6 Hz, ³*J* = 5,2 Hz, 7H, H₇, H₁₄, H₂₄ et H₄₅) ; 4,70, 4,85 (2s, 2H, H₁₆) ; 6,33 (s.e., 1H, NH_d ou NH_e) ; 6,39 (s.e., 1H, NH_d ou NH_e) ; 6,38, 6,42 (2t, ³*J* = 6,4 Hz, 1H, NH_a) ; 6,52 (m, 1H, H₁) ; 6,68 (m, 1H, H₅) ; 7,0 (d, ³*J* = 8,4 Hz, 1H, H₃₄) ; 7,05, 7,08 (2t, ³*J* = 9,2 Hz, 1H, H₂) ; 7,09, 7,16 (2d, ³*J* = 9,2 Hz, 1H, H₁₀) ; 7,11, 7,22 (2d, *J*_{AB} = 7,6 Hz, 2H, H₁₉) ; 7,36, 7,41 (2d, *J*_{AB} = 8,4 Hz, 2H, H₁₈) ; 7,28 (dd, ³*J* = 8,4 Hz, ⁴*J* = 2,4 Hz, 1H, H₃₃) ; 7,57 (s, 1H, H₃₁) ; 7,84 (t.e., ³*J* = 5,6 Hz, 1H, NH_c) ; 8,0 (d, *J*_{AB} = 6,0 Hz, 2H, H₂₇ ou H₂₈) ; 8,03 (s, 2H, H₂₇ ou H₂₈) ; 8,09 (2d, ⁴*J* = 2,8 Hz, 1H, H₁₃) ; 8,14 (2dd, ⁴*J* = 3,2 Hz, ³*J* = 9,2 Hz, 1H, H₁₁) ; 8,83, 8,85 (2t.e., ³*J* = 5,6 Hz, 1H, NH_b) ; 10,87, 10,88 (2s.e., 1H, OH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm)* : 25,7, 28,4, 28,5 (C₄₀, C₄₁ et C₄₂) ; 34,5 (C₃₆) ; 35,6 (C₃₉) ; 40,3 (C₄₄) ; 40,6 (C₃₇) ; 41,6, 41,7 (C₇) ; 41,8 (C₂₄) ; 46,1, 46,4 (C₁₅) ; 48,9, 51,1 (C₁₆) ; 55,8 (C₄₃) ; 59,6 (C₄₅) ; 61,4 (C₄₇) ; 67,5 (C₁₄) ; 111,9, 112,1 (C₁₀) ; 112,3, 112,4 (C₁) ; 112,8, 112,9 (C₅) ; 117,4 (d, ²*J* = 22 Hz, C₂) ; 118,6 (C₃₄) ; 119,9 (d, ²*J* = 18 Hz, C₄) ; 122,2

(C₃₁) ; 122,8 (C₂₈) ; 123,3, 123,6 (C₁₃) ; 124,8, 125,0 (C₁₁) ; 126,5, 126,9 (C₂₀) ; 126,7, 127,1 (C₁₉) ; 127,7, 128,5 (C₁₈) ; 128,8, 128,9 (C₈) ; 129,1, 129,2 (C₂₇) ; 131,3 (C₃₀) ; 135,2 (C₃₃) ; 136,1 (C₂₆) ; 138,7 (C₃₂) ; 140,5, 141,06 (C₁₂ ou C₁₇) ; 141,06, 141,3 (C₁₂ ou C₁₇) ; 146,3 (C₆) ; 149,6 (d, ¹J = 232 Hz, C₃) ; 153,5 (C₂₉ ou C₃₅) ; 153,9 (C₂₉ ou C₃₅) ; 161,6, 161,8 (C₉) ; 163,0 (C₄₆) ; 166,1, 166,2 (C₂₅) ; 169,6, 169,8 (C₂₃) ; 172,4 (C₃₈)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 10,08 min, m/z : 1088 (100), 1090 (40) ([M+H⁺])

Spectrométrie de masse (ESI/TOF) : m/z : 1088 (17), 1090 (7) ([M+H⁺]) ; 1110 (100), 1112 (53) ([M+Na⁺])

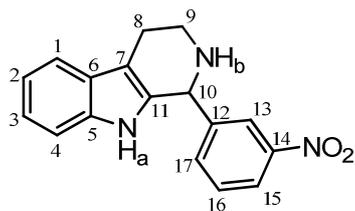
IR (pastille KBr) ν (cm⁻¹) : 3339 (N-H ν) ; 3078 (=C-H ν) ; 2929 (C-H ν) ; 1701, 1644 (C=O ν) ; 1516, 1341 (NO₂ ν) ; 1465, 1427 (C=C ν) ; 1265 (=C-N ν) ; 1186, 1148 (C-F ν) ; 1101 (C-N ν) ; 1049 (C-O-C ν) ; 936, 804, 749 (=C-H δ)

UV λ (nm) : ε(321 nm) = 2,24.10⁴ L. mol⁻¹.cm⁻¹

HRMS : calculée pour C₅₁H₅₁N₁₁O₈SClF₄ ([M+H⁺]) : 1088,3267, mesurée : 1088,3247

* Le produit est obtenu sous la forme de deux conformères, d'où le dédoublement de nombreux signaux.

1-(3-nitrophényl)-2,3,4,9-tétrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indole (ITB₂)



Formule brute : C₁₇H₁₅N₃O₂

PM : 293,12 g.mol⁻¹

Rf : 0,25 (DCM/MeOH : 97/3)

Poudre orangée

Protocole⁶ :

1,23 g (7,68 mmol) de tryptamine et 926,3 mg (6,13 mmol, 0,8 éq) de 3-nitrobenzaldéhyde sont solubilisés dans du dichlorométhane (23 mL). 590 µL (7,66 mmol, 1 éq) d'acide trifluoroacétique sont ajoutés et le mélange est laissé à agiter 15 h sous argon à 40 °C.

Le précipité obtenu est filtré sur fritté n°3, lavé avec du dichlorométhane puis séché sous vide. Il est repris dans une solution de NaHCO₃ 5 % (200 mL) qui est extraite avec du dichlorométhane (2 x 100 mL). Les phases organiques réunies sont séchées (Na₂SO₄), filtrées sur coton et le solvant est évaporé sous pression réduite pour obtenir 1,63 g (5,56 mmol) de 1-(3-nitrophényl)-2,3,4,9-tétrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indole (ITB₂) (91 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 2,71 (m, 2H, H₈) ; 3,0 (m, 2H, H₉) ; 5,25 (s, 1H, H₁₀) ; 6,95 (ddd, ³J = 7,6 Hz, ³J = 6,9 Hz, ⁴J = 0,8 Hz, 1H, H₃) ; 7,01 (ddd, ³J = 8,0 Hz, ³J = 6,9 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, 1H, H₂) ; 7,21 (d, ³J = 8,0 Hz, 1H, H₁) ; 7,42 (d, ³J = 7,7 Hz, 1H, H₄) ; 7,63 (dd, ³J = 7,8 Hz, ³J = 8,0 Hz, 1H, H₁₆) ; 7,77 (d, ³J = 7,7 Hz, 1H, H₁₇) ; 8,13 (s, 1H, H₁₃) ; 8,15 (d, ³J = 8,8 Hz, 1H, H₁₅) ; 10,56 (s.e., 1H, NH_a)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) : 22,4 (C₈) ; 41,6 (C₉) ; 56,1 (C₁₀) ; 109,0 (C₇) ; 111,5 (C₁) ; 118,1 (C₄) ; 118,8 (C₃) ; 121,2 (C₂) ; 122,6 (C₁₅) ; 123,3 (C₁₃) ; 127,1 (C₆) ; 130,1 (C₁₆) ; 134,7 (C₁₁) ; 135,7 (C₁₇) ; 136,4 (C₅) ; 146,0 (C₁₂) ; 148,0 (C₁₄)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 5,62 min, m/z : 294 ([M+H⁺])

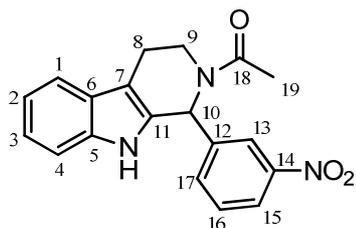
Spectrométrie de masse (ESI/TOF) : m/z : 294 ([M+H⁺])

IR (pastille KBr) ν (cm⁻¹) : 3398 (N-H ν) ; 3057 (=C-H ν) ; 2917, 2843 (C-H ν) ; 1527, 1349 (NO₂ ν) ; 1450 (C=C ν) ; 807, 737 (=C-H δ)

UV λ (nm) : 219, 266

HRMS : calculée pour C₁₇H₁₆N₃O₂ ([M+H⁺]) : 294,1243, mesurée : 294,1240

1-(1-(3-nitrophényl)-3,4-dihydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-yl)éthanone **33**



Formule brute : C₁₉H₁₇N₃O₃

PM : 335,13 g.mol⁻¹

Rf : 0,43 (DCM/MeOH : 98/2)

Solide jaune

Protocole⁷ :

257,9 mg (0,88 mmol) de 1-(3-nitrophényl)-2,3,4,9-tétrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indole (**ITB**₂) sont solubilisés dans du dichlorométhane (10,5 mL). 70 µL (0,74 mmol, 0,8 éq) d'anhydride acétique et 210 µL (1,56 mmol, 1,8 éq) de triéthylamine sont ajoutés et le mélange laissé à agiter 3 h à température ambiante.

Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu repris dans du dichlorométhane (20 mL) et de l'eau distillée (20 mL). La phase organique est lavée avec de l'HCl 0,1 M (10 mL), séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton et le solvant est évaporé. Une chromatographie flash sur colonne Redisep 4 g en phase normale (DCM/MeOH : 100/0, 99/1, 98/2 puis 97/3) permet d'obtenir 202 mg (0,60 mmol) de 1-(1-(3-nitrophényl)-3,4-dihydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-yl)éthanone **33** (81 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 2,17 (s, 3H, H₁₉) ; 2,85 (m, 2H, H₈) ; 3,22 (ddd, ²J = 14,4 Hz, ³J = 11,6 Hz, ³J = 4,8 Hz, 1H, H₉) ; 4,01 (dd, ²J = 13,6 Hz, ³J = 4,8 Hz, 1H, H₉) ; 6,91 (s, 1H, H₁₀) ; 7,02 (ddd, ³J = 8,0 Hz, ³J = 7,2 Hz, ⁴J = 0,8 Hz, 1H, H₃) ; 7,10 (ddd, ³J = 8,0 Hz, ³J = 7,2 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, 1H, H₂) ; 7,33 (d, ³J = 8,0 Hz, 1H, H₁) ; 7,49 (d, ³J = 8,0 Hz, 1H, H₄) ; 7,66 (m, 2H, H₁₆ et H₁₇) ; 8,02 (d, ⁴J = 1,2 Hz, 1H, H₁₃) ; 8,18 (m, 1H, H₁₅) ; 11,0 (s.e., 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 21,8 (C₈) ; 21,9 (C₁₉) ; 40,9 (C₉) ; 50,8 (C₁₀) ; 109,4 (C₇) ; 111,8 (C₁) ; 118,5 (C₄) ; 119,2 (C₃) ; 122,0 (C₂) ; 122,8 (C₁₃) ; 123,2 (C₁₅) ; 126,5 (C₆) ; 130,5 (C₁₆) ; 131,1 (C₁₁) ; 134,9 (C₁₇) ; 136,7 (C₅) ; 143,1 (C₁₂) ; 148,2 (C₁₄) ; 169,6 (C₁₈)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 8,15 min, m/z : 336 ([M+H⁺])

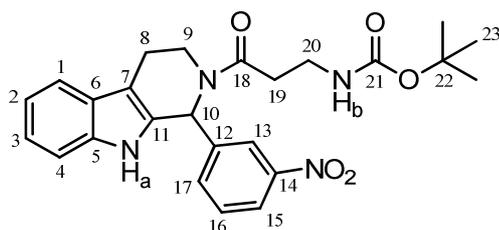
Spectrométrie de masse (ESI/TOF) : m/z : 358 ([M+Na⁺])

IR (pastille KBr) ν (cm⁻¹) : 3261 (N-H ν) ; 3114, 3019 (=C-H ν) ; 2981, 2929, 2858 (C-H ν) ; 1707 (bande harmonique) ; 1614 (C=O ν) ; 1524, 1352 (NO₂ ν) ; 1470, 1439, 1326, 1301 (C=C ν) ; 1282, 1253 (=C-N ν) ; 1230, 1192 (C-N ν) ; 1158, 1143, 1099, 1027 (C-H δ) ; 994, 909, 824, 812, 759, 745, 708 (=C-H δ)

UV λ (nm) : 203, 222, 268

HRMS : calculée pour C₁₉H₁₇N₃O₃Na ([M+Na⁺]) : 358,1168, mesurée : 358,1183

***N*-*boc*-3-(1-(3-nitrophényl))-3,4-dihydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-yl)-3-oxopropyl amine 34**



Formule brute : C₂₅H₂₈N₄O₅

PM : 464,21 g.mol⁻¹

Rf : 0,47 (cyclohexane/AcOEt : 1/1)

Poudre jaune

Protocole :

1,22 g (4,16 mmol) de 1-(3-nitrophényl)-2,3,4,9-tétrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indole (**ITB₂**) sont solubilisés dans du tétrahydrofurane anhydre (30 mL) et placés sous argon. 1,18 g (6,24 mmol, 1,5 éq) de *N*-*boc*-β-alanine et 1,28 g (6,20 mmol, 1,5 éq) de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide préalablement solubilisés dans du tétrahydrofurane anhydre (10 mL) sont ajoutés et le mélange laissé à agiter 16 h à température ambiante et sous argon. Le mélange est filtré sur coton et le solvant du filtrat évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans du dichlorométhane (50 mL) et une solution de NaHCO₃ 5 % (50 mL). La phase organique est lavée avec du NaHCO₃ 5 % (25 mL), séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton puis le solvant est évaporé. Une chromatographie flash sur colonne Rediseq 40 g en phase normale (cyclohexane/AcOEt : 95/5, 75/25, 70/30, 65/35 puis 55/45) permet d'obtenir 1,29 g (2,78 mmol) de *N*-*boc*-3-(1-(3-nitrophényl))-3,4-dihydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-yl)-3-oxopropylamine **34** (67 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 1,33 (s, 9H, H₂₃) ; 2,63 (t, ³*J* = 6,8 Hz, 2H, H₁₉) ; 2,87 (m, 2H, H₈) ; 3,20 (dt, ³*J* = 6,4 Hz, ³*J* = 6,0 Hz, 3H, H₂₀ et H₉) ; 4,04 (dd, ³*J* = 3,2 Hz, ²*J* = 13,6 Hz, 1H, H₉) ; 6,73 (t.e., ³*J* = 5,2 Hz, 1H, NH_b) ; 6,92 (s, 1H, H₁₀) ; 7,02 (ddd, ³*J* = 8,0 Hz, ³*J* = 6,8 Hz, ⁴*J* = 1,2 Hz, 1H, H₃) ; 7,10 (ddd, ³*J* = 8,0 Hz, ³*J* = 6,8 Hz, ⁴*J* = 1,2 Hz, 1H, H₂) ; 7,33 (d, ³*J* = 8,0 Hz, 1H, H₁) ; 7,49 (d, ³*J* = 8,0 Hz, 1H, H₄) ; 7,65 (m, 2H, H₁₆ et H₁₇) ; 8,02 (m, 1H, H₁₃) ; 8,18 (dt, ³*J* = 6,8 Hz, ⁴*J* = 2,4 Hz, 1H, H₁₅) ; 11,0 (s.e., 1H, NH_a)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 21,9 (C₈) ; 28,6 (C₂₃) ; 33,3 (C₁₉) ; 36,7 (C₂₀) ; 40,3 (C₉) ; 51,0 (C₁₀) ; 78,0 (C₂₂) ; 109,3 (C₇) ; 111,8 (C₁) ; 118,5 (C₄) ; 119,2 (C₃) ; 122,0 (C₂) ; 122,8 (C₁₃) ; 123,2 (C₁₅) ; 126,5 (C₆) ; 130,6 (C₁₆) ; 131,1 (C₁₁) ; 134,9 (C₁₇) ; 136,7 (C₅) ; 143,0 (C₁₂) ; 148,2 (C₁₄) ; 155,8 (C₂₁) ; 170,5 (C₁₈)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 8,63 min, m/z : 465 ([M+H⁺])

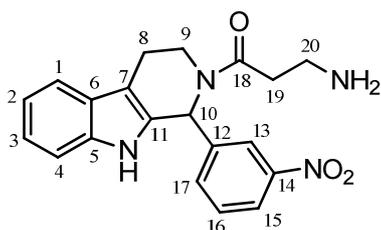
Spectrométrie de masse (ESI/TOF) : m/z : 487 ([M+Na⁺])

IR (pastille KBr) ν (cm⁻¹) : 3441, 3302 (N-H ν) ; 3054 (=C-H ν) ; 2977, 2931 (C-H ν) ; 1715, 1628 (C=O ν) ; 1531, 1347 (NO₂ ν) ; 1467, 1446, 1406, 1366 (C=C ν) ; 1279, 1248 (=C-N ν) ; 1226, 1203 (C-N ν) ; 1164 (N-C(=O)-O ν) ; 1064 (O-C-C ν) ; 999, 979, 894, 852, 805, 780, 749, 725 (=C-H δ)

UV λ (nm) : 204, 222, 268

HRMS : calculée pour C₂₅H₂₈N₄O₅Na ([M+Na⁺]) : 487,1957, mesurée : 487,1976

3-amino-1-(1-(3-nitrophényl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-2(9H)-yl)propan-1-one
35



Formule brute : C₂₀H₂₀N₄O₃

PM : 364,15 g.mol⁻¹

Rf : 0,39 (DCM/MeOH : 90/10)

Solide jaune orangé

Protocole :

1,50 g (3,23 mmol) de *N*-*boc*-3-(1-(3-nitrophényl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-*b*]indol-2(9H)-yl)-3-oxopropyl amine **34** sont solubilisés à 0 °C dans du dioxane (5 mL) et placés sous argon. Une solution d'HCl 4 M dans le dioxane (50 mL) est ajoutée et le mélange laissé à agiter 2 h 30 à 0 °C.

La solution est dégazée à température ambiante et le solvant évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans du dichlorométhane (50 mL) et une solution de NaHCO₃ 5 % (50 mL). La phase organique est séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton et le solvant évaporé. Une chromatographie flash sur colonne Redisep 24 g en phase normale (DCM/MeOH : 100/0, 97,5/2,5, 95/5, 92/8 puis 90/10) permet d'obtenir 956 mg (2,63 mmol) de 3-amino-1-(1-(3-nitrophényl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-*b*]indol-2(9H)-yl)propan-1-one **35** (81 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 2,57 (dt, ³*J* = 6,8 Hz, ³*J* = 6,4 Hz, 2H, H₂₀) ; 2,80 (t, ³*J* = 6,8 Hz, 2H, H₁₉) ; 2,82 (m, 2H, H₈) ; 3,19 (ddd, ²*J* = 14 Hz, ³*J* = 10,8 Hz, ³*J* = 5,6 Hz, 1H, H₉) ; 4,08 (dd, ²*J* = 13,6 Hz, ³*J* = 4,4 Hz, 1H, H₉) ; 6,94 (s, 1H, H₁₀) ; 7,02 (ddd, ³*J* = 8,0 Hz, ³*J* = 7,2 Hz, ⁴*J* = 1,2 Hz, 1H, H₃) ; 7,10 (ddd, ³*J* = 8,4 Hz, ³*J* = 7,2 Hz, ⁴*J* = 1,2 Hz, 1H, H₂) ; 7,33 (d, ³*J* = 8,0 Hz, 1H, H₁) ; 7,49 (d, ³*J* = 8,0 Hz, 1H, H₄) ; 7,65 (m, 2H, H₁₆ et H₁₇) ; 8,01 (m, 1H, H₁₃) ; 8,17 (dt, ³*J* = 7,2 Hz, ⁴*J* = 2,4 Hz, 1H, H₁₅) ; 11,03 (s.e., 1H, NH)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 21,9 (C₈) ; 36,9 (C₂₀) ; 38,4 (C₁₉) ; 40,3 (C₉) ; 50,9 (C₁₀) ; 109,3 (C₇) ; 111,8 (C₁) ; 118,5 (C₄) ; 119,2 (C₃) ; 122,0 (C₂) ; 122,8 (C₁₃) ; 123,2 (C₁₅) ; 126,5 (C₆) ; 130,6 (C₁₆) ; 131,1 (C₅) ; 134,9 (C₁₇) ; 136,7 (C₁₁) ; 143,1 (C₁₂) ; 148,2 (C₁₄) ; 171,4 (C₁₈)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 5,85 min, m/z : 365 ([M+H⁺])

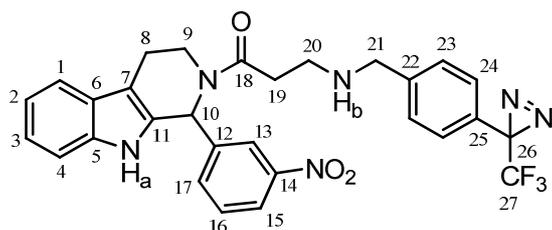
Spectrométrie de masse (ESI/TOF) : m/z : 365 ([M+H⁺])

IR (pastille KBr) ν (cm⁻¹) : 3372, 3289 (N-H ν) ; 3061 (=C-H ν) ; 2930, 2851 (C-H ν) ; 1636 (C=O ν) ; 1528, 1349 (NO₂ ν) ; 1439, 1303 (C=C ν) ; 1278, 1255 (=C-N ν) ; 1217, 1193 (C-N ν) ; 1158, 1143, 1094, 1048 (C-H δ) ; 987, 924, 894, 825, 807, 744, 700 (=C-H δ)

UV λ (nm) : 204, 222, 269

HRMS : calculée pour C₂₀H₂₁N₄O₃ ([M+H⁺]) : 365,1614, mesurée : 365,1629

1-(1-(3-nitrophényl)-3,4-dihydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-yl)-3-(4-(3-trifluorométhyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzylamino)propan-1-one 36



Formule brute : C₂₉H₂₅N₆O₃F₃

PM : 562,19 g.mol⁻¹

Rf : 0,45 (DCM/MeOH : 95/5)

Solide jaune

Protocole (à réaliser en limitant l'exposition directe à la lumière) :

503,45 mg (1,85 mmol) de 3-(4-(2-(1,3-dioxanyl))phényl)-3-(trifluorométhyl)diazirine **21** et 522,61 mg d'Amberlyst 15 sont solubilisés dans du tétrahydrofurane (9,5 mL) et de l'eau distillée (0,5 mL). Le mélange est agité 16 h à 50 °C puis filtré sur coton. Le solvant est évaporé ($P \geq 150$ mbar, température ambiante), le résidu repris dans du dichlorométhane (10 mL) et une solution de NaHCO₃ 5 % (5 mL). La phase organique est séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton et le solvant évaporé ($P \geq 150$ mbar, température ambiante) pour donner une huile transparente incolore (mélange aldéhyde/acétal : 70/30).

L'huile obtenue (1,30 mmol d'aldéhyde) et 468,16 mg (1,29 mmol, 1 éq) de 3-amino-1-(1-(3-nitrophényl)-3,4-dihydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-yl)propan-1-one **35** sont solubilisés dans du dichlorométhane (15 mL). 10 min plus tard, 832,90 mg (3,93 mmol, 3 éq) de NaBH(OAc)₃ et 100 µL d'acide acétique (1,80 mmol, 1,4 éq) sont ajoutés et le mélange est agité 20 h à température ambiante sous argon. Le mélange est filtré sur coton, puis du dichlorométhane (30 mL) et une solution de NaHCO₃ 5 % (30 mL) sont ajoutés. La phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (15 mL). Les phases organiques réunies sont séchées (Na₂SO₄), filtrées sur coton et le solvant est évaporé. Une chromatographie flash sur colonne Redisep 12 g en phase normale (DCM/MeOH 100/0, 98/2 puis 96/4) permet d'obtenir 370,0 mg (0,66 mmol) de 1-(1-(3-nitrophényl)-3,4-dihydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-yl)-3-(4-(3-trifluorométhyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzylamino)propan-1-one **36** (36 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 2,65 (t, ³*J* = 5,2 Hz, 2H, H₁₉) ; 2,73 (dt, ³*J* = 6,8 Hz, ³*J* = 6,4 Hz, 2H, H₂₀) ; 2,82 (m, 2H, H₈) ; 3,18 (ddd, ²*J* = 14,4 Hz, ³*J* = 10,4 Hz, ³*J* = 5,6 Hz, 1H, H₉) ; 3,72 (s, 2H, H₂₁) ; 4,06 (dd, ²*J* = 12,8 Hz, ³*J* = 4,0 Hz, 1H, H_{9'}) ; 6,92 (s, 1H, H₁₀) ; 7,02 (ddd, ³*J* = 7,6 Hz, ³*J* = 7,2 Hz, ⁴*J* = 0,8 Hz, 1H, H₃) ; 7,10 (ddd, ³*J* = 8,0 Hz, ³*J* = 6,8 Hz, ⁴*J* = 1,2 Hz, 1H, H₂) ; 7,15 (d, *J*_{AB} = 8,0 Hz, 2H, H₂₄) ; 7,41 (d, *J*_{AB} = 8,4 Hz, 2H, H₂₃) ; 7,32 (d, ³*J* = 8,0 Hz, 1H, H₁) ; 7,48 (d, ³*J* = 7,6 Hz, 1H, H₄) ; 7,64 (m, 2H, H₁₆ et H₁₇) ; 8,0 (m, 1H, H₁₃) ; 8,17 (dt, ³*J* = 7,2 Hz, ⁴*J* = 2,4 Hz, 1H, H₁₅) ; 11,01 (s.e., 1H, NH_a)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 21,9 (C₈) ; 28,4 (q, ²*J* = 39 Hz, C₂₆) ; 33,5 (C₁₉) ; 40,3 (C₉) ; 45,1 (C₂₀) ; 51,0 (C₁₀) ; 52,6 (C₂₁) ; 109,3 (C₇) ; 111,8 (C₁) ; 118,5 (C₄) ; 119,2 (C₃) ; 122,0 (C₂) ; 122,3 (q, ¹*J* = 273 Hz, C₂₇) ; 122,8 (C₁₃) ; 123,1 (C₁₅) ; 126,0 (C₂₅) ; 126,5 (C₂₄ et C₆) ; 129,0 (C₂₃) ; 130,5 (C₁₆) ; 131,1 (C₅) ; 134,9 (C₁₇) ; 136,7 (C₁₁) ; 143,1 (C₁₂) ; 144,0 (C₂₂) ; 148,2 (C₁₄) ; 171,3 (C₁₈)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : t_R = 7,38 min, m/z : 563 ([M+H⁺])

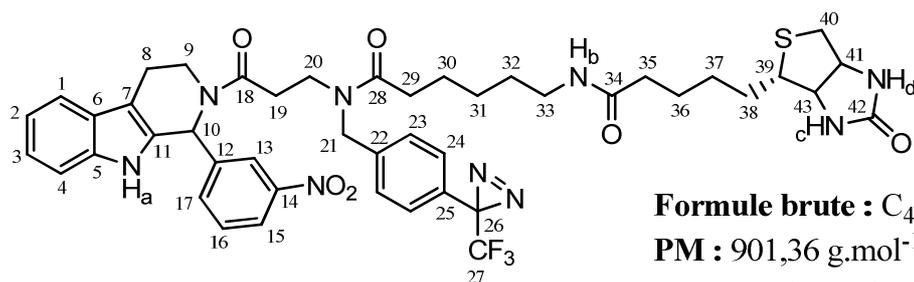
Spectrométrie de masse (ESI/TOF) : m/z : 563 ([M+H⁺])

IR (pastille KBr) ν (cm⁻¹) : 3396, 3298 (N-H ν) ; 3064 (=C-H ν) ; 2931, 2850 (C-H ν) ; 1636, 1618 (C=O ν) ; 1531, 1349 (NO₂ ν) ; 1452, 1439, 1303 (C=C ν) ; 1232 (=C-N ν) ; 1185, 1155 (C-F ν) ; 1097, 1050 (C-H δ) ; 938, 898, 808, 743, 700 (=C-H δ)

UV λ (nm) : 202, 222, 268

HRMS : calculée pour C₂₉H₂₆N₆O₃F₃ ([M+H⁺]) : 563,2018, mesurée : 563,2020

***N*-(3-(1-(3-nitrophényl)-3,4-dihydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-yl)-3-oxopropyl)-*N*-(4-(3-trifluorométhyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzyl)-6-biotinylaminohexanamide (ITB₂-P₁)**



Formule brute : C₄₅H₅₀N₉O₆F₃S

PM : 901,36 g.mol⁻¹

Rf : 0,31 (DCM/MeOH : 95/5)

Solide jaune

Protocole (à réaliser en limitant l'exposition directe à la lumière) :

254,25 mg (0,71 mmol) d'acide 6-(biotinylamino)caproïque **24** et 269,9 mg (0,71 mmol, 1 éq) d'hexafluorophosphate de *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium sont dissous dans du diméthylsulfoxyde (7,5 mL). 200,57 mg (0,36 mmol, 0,5 éq) de 1-(1-(3-nitrophényl)-3,4-dihydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-yl)-3-(4-(3-trifluorométhyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzylamino)propan-1-one **36** préalablement solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (2,5 mL) puis 200 µL (1,48 mmol, 2 éq) de *N,N*-diisopropyléthylamine sont ajoutés. Le mélange est laissé à agiter 15 h à température ambiante et sous argon.

Du dichlorométhane (70 mL) et une solution de NaHCO₃ 5 % (70 mL) sont ajoutés au mélange. La phase organique est lavée avec une solution d'HCl 1 M (2 x 70 mL), séchée (Na₂SO₄), filtrée sur coton et le solvant évaporé. Une chromatographie flash sur colonne Redisep 12 g en phase normale (DCM/MeOH : 100/0, 99/1, 98/2) permet d'obtenir 179,64 mg (0,2 mmol) de *N*-(3-(1-(3-nitrophényl)-3,4-dihydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-yl)-3-oxopropyl)-*N*-(4-(3-trifluorométhyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzyl)-6-biotinylaminohexanamide (ITB₂-P₁) (56 %).

Données spectrales :

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆)* δ (ppm) : 1,15-1,68 (m, 12H, H₃₀, H₃₁, H₃₂, H₃₆, H₃₇ et H₃₈) ; 2,02 (2t, ³*J* = 7,2 Hz, 2H, H₃₅) ; 2,20, 2,44 (2t, ³*J* = 7,2 Hz, 2H, H₂₉) ; 2,55 (d, ²*J* = 12,4 Hz, 1H, H₄₀) ; 2,68 (m, 2H, H₁₉) ; 2,78 (dd, ²*J* = 12,8 Hz, ³*J* = 5,2 Hz, 1H, H_{40'}) ; 2,82 (m, 2H, H₈) ; 2,94, 2,99 (2dt, ³*J* = 6,4 Hz, ³*J* = 6,0 Hz, 2H, H₃₃) ; 3,06 (m, 1H, H₃₉) ; 3,14 (m, 1H, H₉) ; 3,55 (m, 2H, H₂₀) ; 3,99 (m, 1H, H_{9'}) ; 4,09 (m, 1H, H₄₃) ; 4,27 (m, 1H, H₄₁) ; 4,59, 4,65 (2s, 2H, H₂₁) ; 6,35 (s.e., 1H, NH_c ou NH_d) ; 6,42 (s.e., 1H, NH_c ou NH_d) ; 6,88 (2s, 1H, H₁₀) ; 7,02 (t, ³*J* = 7,6 Hz, 1H, H₃) ; 7,10 (td, ³*J* = 8,4 Hz, ⁴*J* = 1,2 Hz, 1H, H₂) ; 7,14, 7,25 (2d, *J*_{AB} = 8,0 Hz, 2H, H₂₄) ; 7,28 (d, *J*_{AB} = 8,4 Hz, 2H, H₂₃) ; 7,32 (d, ³*J* = 8,0 Hz, 1H, H₁) ; 7,49 (d, ³*J* = 7,6 Hz, 1H, H₄) ; 7,65 (t, ³*J* = 6,8 Hz, 1H, H₁₆) ; 7,65 (d, ³*J* = 7,2 Hz, 1H, H₁₇) ; 7,70 (2t.e., ³*J* = 5,2 Hz, 1H, NH_b) ; 7,99 (s, 1H, H₁₃) ; 8,18 (m, 1H, H₁₅) ; 10,97, 10,99 (2s.e., 1H, NH_a)

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)* δ (ppm) : 21,69 (C₈) ; 24,8, 25,0, 25,7, 26,5, 26,6, 28,4, 28,6, 29,4, 29,5 (C₃₀, C₃₁, C₃₂, C₃₆, C₃₇ et C₃₈) ; 31,4, 32,0 (C₁₉) ; 32,2, 32,7 (C₂₉) ; 35,6 (C₃₅) ; 38,6, 38,7 (C₃₃) ; 40,0 (C₉) ; 40,3 (C₄₀) ; 43,7 (C₂₀) ; 47,7 (C₂₁) ; 51,1 (C₁₀) ; 55,8 (C₃₉) ; 59,6 (C₄₁) ; 61,3, 61,4 (C₄₃) ; 109,3, 109,4 (C₇) ; 111,8 (C₁) ; 118,5 (C₄) ; 119,2 (C₃) ; 120,9 (C₂) ; 122,0 (C₁₃) ; 122,8, 122,9 (C₁₅) ; 123,2, 123,7 (C₂₅) ; 126,4, 126,5 (C₆) ; 126,8, 127,2 (C₂₄) ; 127,8, 128,5 (C₂₃) ; 130,6 (C₁₆) ; 130,9 (C₅) ; 134,9, 135,0 (C₁₇) ; 136,7 (C₁₁) ; 141,0, 141,6 (C₂₂) ; 142,8 (C₁₂) ; 148,2 (C₁₄) ; 163,0, 163,1 (C₄₂) ; 170,2, 170,4 (C₁₈) ; 172,1 (C₂₈ ou C₃₄) ; 172,8 (C₂₈ ou C₃₄)

LC/MS (X-bridge 100 × 4,6 mm) : $t_R = 8,38$ min, $m/z : 902$ ($[M+H^+]$)

Spectrométrie de masse (ESI/TOF) : $m/z : 924$ ($[M+Na^+]$)

IR (pastille KBr) ν (cm⁻¹) : 3287 (N-H ν) ; 3085 (=C-H ν) ; 2931, 2860 (C-H ν) ; 1701, 1640 (C=O ν) ; 1530, 1348 (NO₂ ν) ; 1452, 1304 (C=C ν) ; 1232, 1213 (=C-N ν) ; 1187, 1155 (C-F ν) ; 1096, 1050 (C-H δ) ; 938, 895, 808, 733, 700 (=C-H δ)

UV λ (nm) : $\epsilon(202) = 5,10 \cdot 10^4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ ; $\epsilon(222 \text{ nm}) = 4,57 \cdot 10^4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ ; $\epsilon(267 \text{ nm}) = 1,07 \cdot 10^4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹

HRMS : calculée pour C₄₅H₅₀N₉O₆F₃SNa ($[M+Na^+]$) : 924,3455, mesurée : 924,3468

* Le produit est obtenu sous la forme de conformères, d'où le dédoublement de nombreux signaux.

Biologie, biochimie et spectrométrie de masse

Appareillage

- Système de purification d'eau :

L'eau du réseau potable est d'abord traitée à l'aide d'un appareil ELIX 35 (Millipore). Cela fournit une eau déminéralisée de type II qui est ensuite traitée à l'aide d'un appareil SYNERGY UV (Millipore). Ce dernier est équipé d'une lampe UV pour diminuer la teneur en molécules organiques, d'une cartouche filtrante pour éliminer les ions et d'un filtre permettant d'éliminer les particules telles que les bactéries. Toutes les expériences décrites ici ont été réalisées en utilisant une eau traitée de cette façon (eau milli Q).

- Hotte à flux laminaire Hera Safe HS (Heraeus) :

Dans la hotte à flux laminaire, l'air circule du haut vers le bas après être passé au travers d'un filtre HEPA de 0,2 micron afin d'éviter la contamination des cellules et du matériel par des micro-organismes. La hotte doit néanmoins être nettoyée avec de l'éthanol 70 % avant et après chaque utilisation et par irradiation UV une fois par semaine. L'opérateur doit en outre porter une blouse propre, des gants nettoyés régulièrement à l'éthanol 70 % et éviter au maximum de perturber le flux laminaire au cours des opérations de culture. Sous cette hotte sont réalisées les différentes opérations de culture cellulaire.

- Centrifugeuse 5810 R (Eppendorf) :

Cette centrifugeuse comporte 4 nacelles permettant la centrifugation de tubes Falcon de 15 et 50 mL, à raison de 400 mL maximum par nacelle. Elle permet de moduler la température (de -9 à + 40 °C), la vitesse de rotation (jusqu'à 14 000 RPM) ainsi que le temps de centrifugation.

- Incubateur à CO₂ Hera Cell (Heraeus) :

Cet appareil permet de maintenir les conditions nécessaires à la culture de cellules et de tissus grâce à la régulation de la température, de la teneur en CO₂ et du taux d'humidité. Il est également équipé d'une fonction de désinfection automatique.

- Microscope inversé DMIL (Leica)

Le microscope est un binoculaire permettant l'examen en routine de cellules, de tissus, de liquides ou de sédiments grâce à différents grossissements : x 4, x 10, x 20 et x 40. Le microscope a été utilisé pour la culture de cellules FRTL-5 et pour le comptage de ces cellules en cellule de Malassez.

- Autoclave Prater (Subtil Crépieux)

Cet appareil permet la stérilisation à 100 °C et 1,33 bar du matériel nécessaire à la culture cellulaire. Avant la stérilisation, le matériel est enveloppé dans du papier aluminium et la vanne d'eau ouverte jusqu'à ce que le bac situé sous la grille soit rempli. Lorsque la stérilisation est terminée, l'appareil est éteint et la vanne d'eau ouverte pour que l'eau soit évacuée dans un réservoir situé à l'arrière de l'appareil. Une fois l'évacuation terminée et la pression revenue à pression atmosphérique, la vanne est refermée et la porte ouverte. L'autoclave a surtout été utilisé pour stériliser le matériel nécessaire à l'ensemencement de plaques 96 puits, le reste du matériel de culture étant acheté directement stérile.

- Laveur de plaques Power Washer 384 (Tecan) :

L'appareil sert à laver des microplaques : il retire le surnageant des puits et peut remplacer la solution aspirée par une autre. Il peut être équipé de têtes de lavage adaptées soit à des microplaques 384 puits, soit à des microplaques 96 puits, avec dans les deux cas, une aiguille d'aspiration et une aiguille de distribution par puit. 5 vitesses de distribution sont utilisables et le positionnement de la tête de lavage par rapport à la microplaque modulable afin d'éviter de trop forts remous qui décrocheraient les cellules.

- Liquidator 96

Le Liquidator est un système manuel de pipetage équipé d'une « tête à 96 canaux ». Il permet de transférer entre 1 et 200 μL de solutions d'une plaque 96 puits à une autre ou d'un réservoir à une microplaque. Il comporte deux plaques coulissantes permettant l'utilisation simultanée de 4 contenants : 1 boîte de cônes spécifiques au Liquidator, 1 à 3 microplaque(s) et/ou 1 à 2 réservoir(s).



- Distributeur automatique Multidrop 384 (Thermolabsystems)

Le Multidrop est une pompe péristaltique à 8 canaux. Il permet de distribuer jusqu'à 8 réactifs différents dans les 96 ou 384 puits d'une microplaque. Pour un volume de 20 μL /puits, 5 s sont nécessaires pour remplir une microplaque 96 puits et 20 s pour une microplaque 384 puits. L'appareil permet également de sélectionner le nombre de colonnes à remplir (de 1 à 12 pour une microplaque 96 puits, de 1 à 24 pour une microplaque 384 puits). Les cassettes distributrices, comportant 8 canules, sont amovibles et autoclavables. Une cassette a été réservée à la distribution des suspensions cellulaires et une à la distribution des solutions chimiques.

- Spectrophotomètre UV-Vis SPECTRAMax[®] GEMINI XS (Molecular devices)

Le spectrophotomètre permet de mesurer simultanément les absorbances dans les 96 puits d'une microplaque à un instant t ou de suivre une cinétique d'absorbance dans chaque puit à une longueur d'onde comprise entre 250 et 850 nm. L'appareil utilise un monochromateur et la source est une lampe au Xénon. Les résultats sont traités après exportation dans un fichier Excel.

- Lampe UV Black-Ray[®] B100AP

La lampe délivre une lumière ultraviolette de haute intensité de longueur d'onde $\lambda \sim 365$ nm. Equipée d'une ampoule au mercure de 100 W, elle permet d'obtenir une puissance de 21,7 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ à une distance de 5 cm et une puissance de 8,9 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ à une distance de 25 cm. Elle nous a permis de réaliser le photomarquage de protéines sur cellules entières et sur lysats en présence de sondes photoactivables.

- Centrifugeuse 5417 R (Eppendorf) :

Cette centrifugeuse permet la centrifugation de tubes coniques de type « Eppendorf » de 2, 1,5 et 0,5 mL. Sa température est modulable (de -9 à 40 °C), ainsi que sa vitesse de rotation (entre 500 et 16 400 RPM) et la durée de centrifugation.

- Etuve d'incubation de type B 20 (Heraeus) :

L'étuve permet le traitement thermique d'échantillons à des températures allant de 5 à 70 °C. Elle a permis de maintenir les microplaques utilisées pour les dosages protéiques à 37 °C pendant 30 min.

- pH mètre inoLab pH Level 1 :

Le pH mètre permet de mesurer des pH compris entre -2 et +16 pour des solutions aqueuses ayant des températures comprises entre -5 et +100 °C. Il a permis la préparation de différents tampons nécessaires à la lyse cellulaire et à la préparation des gels d'électrophorèse.

- Système d'électrophorèse Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad)

Le système d'électrophorèse Mini-PROTEAN II permet de couler un ou deux gels de polyacrylamide 7 cm x 8 cm de 0,5 ou 1 mm d'épaisseur et de faire migrer simultanément 5, 10 ou 20 échantillons. Il est constitué d'une cuve, d'un couvercle avec câbles, d'un support de coulée, de deux supports à vis pour la réalisation des sandwichs plaque de verre-espaceur-plaque de verre, d'un support à électrodes en forme de U, de peignes 5 et 10 puits, d'espaceurs de 0,5 mm d'épaisseur et de plaques de verre 8,3 x 10,2 cm et 7,3 x 10,2 cm.

- Système de transfert sur membrane Mini Trans-Blot® (Bio-Rad)

Le système de transfert Mini Trans-Blot permet le transfert de protéines depuis 1 ou 2 mini-gel(s) vers 1 ou 2 membrane(s) PVDF, dans la cuve déjà utilisée pour l'électrophorèse. Le système est constitué d'une cuve et d'un couvercle avec câbles mais aussi de deux cassettes où sont réalisés les sandwichs gel – membrane et d'un module à électrodes.

- Thermomixeur (Eppendorf)

Le thermomixeur permet entre autres d'agiter des tubes Eppendorf de 1,5 mL à une fréquence comprise entre 300 et 1500 RPM et une température comprise entre 13 °C de moins que la température ambiante et +99 °C. Il sert, entre autres, à effectuer les trypsinolyses à 37 °C.

- Spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF, série 4800 (Applied Biosystems/MDS SCIEX)

Le spectromètre de masse, propriété du Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines, a été utilisé selon les conseils de Robert Thai et de Sarah Bregant. Il permet d'analyser en quelques secondes des biomolécules dont la masse est comprise entre 1 et 500 kDa avec une sensibilité de l'ordre du subnanomolaire et une résolution de 1000 en mode linéaire et de 15 à 20 000 en mode réflecteur. Il est équipé d'une source MALDI (Désorption Ionisation Laser Assistée par Matrice), permettant d'ioniser des mélanges échantillon-matrice *via* un laser UV, et d'un analyseur TOF (Time of Flight), mesurant pour chaque ion produit le temps mis pour traverser l'analyseur. L'analyseur étant sous vide et aucun champ n'y étant appliqué, les ions conservent durant toute la traversée de l'analyseur l'énergie cinétique qu'ils avaient en y entrant. Or, les ions sont accélérés dans la source de sorte à pénétrer tous dans l'analyseur avec une même énergie cinétique. La vitesse d'un ion dans cet analyseur est donc inversement proportionnelle à la racine carré de son rapport masse/charge (ou m/z). Et par conséquent, le temps de traversée est directement reliable au rapport m/z par la relation suivante :

$$t = L \sqrt{\frac{m}{2zeV}}$$

z : charge de l'ion

e : charge de l'électron ($1,602 \cdot 10^{-29} \text{C}$)

V : différence de potentiel entre la cible et la grille d'extraction

m : masse de l'ion (kg)

Les ions parviennent ainsi au détecteur dans l'ordre croissant de leur masse.

Deux modalités disponibles sur cet appareil ont été systématiquement utilisées lors de nos analyses pour augmenter la résolution des spectres obtenus : l'extraction retardée qui permet aux ions formés dans la source de partir d'une énergie similaire avant d'être accélérés et le mode réflectron qui refocalise les ions en énergie avant leur arrivée sur le détecteur.

Plusieurs techniques sont utilisables avec un analyseur TOF pour réaliser des expériences de fragmentation de peptides (ou MS-MS). Dans le cadre de nos analyses seul le mode PSD (Post Source Decay) a été utilisé. Il est basé sur la dissociation dans le tube de vol des ions ayant accumulé trop d'énergie lors de l'ionisation⁸. La fragmentation produit des ions appelés métastables qui conservent dans un premier temps la même vitesse que l'ion parent puisque la fragmentation se fait dans une zone sous vide et sans aucun champ électrique. L'ion parent et ses ions fils sont sélectionnés en se basant sur la masse de l'ion parent puis le réflectron sépare ces ions par une refocalisation en énergie afin qu'ils parviennent au détecteur dans l'ordre croissant de leur masse.

Liste et conservation des produits

Certains produits sont aliquotés et conservés dans des conditions particulières. Pour ces produits, les conditions de stockage sont indiquées. Les autres sont conservés à température ambiante dans leur flacon original.

Culture et tests cellulaires :

- Acétate de L-Glycine-L-Histidine-L-Lysine (Sigma : G7387) : -20 °C
- Hormone thyrotropique ou TSH bovine (Sigma : T8931) : 0 °C
- Insuline de pancréas de veau (Sigma : I5500) : -20 °C
- Transferrine humaine (Sigma : T8158) : -20 °C
- Hydrocortisone 98 % (Sigma : H0888) : -20 °C
- L-Glutamine (Sigma : G7513) : aliquotée par 5 mL, -20 °C
- Pénicilline/Streptomycine (Sigma : P4333) : aliquoté par 5 mL, -20 °C
- Sérum de veau fœtal inactivé (Thermo Fisher : W3387M) : aliquoté par 25 mL, -20 °C
- Coon's modified Ham's F12 medium (Biochrom : F0855) : 0 °C
- Trypsine-EDTA 0,25 % (Sigma : T4049) : aliquotée par 3, 6 ou 9 mL, -20 °C
- Bleu trypan 0,4 % (Sigma : T8154)
- Dubelcco's Phosphate Buffered Saline ou PBS (Sigma : D8537) : 0 °C

- Hépès Buffer 1 M (Sigma : H0887) : 0 °C
- Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) avec rouge de phénol (Sigma : H9269) : 0 °C
- NaI à 99,999 % (Aldrich : 409286-1G)
- Perchlorate de sodium > 98 % (Sigma : S1513)
- Diméthylsulfoxyde ou DMSO stérile (Sigma : D8418)

Photomarquage, lyse, dosage protéique, gel SDS-PAGE, colorations, Western-blot et chromatographies d'affinité :

- Hans' Balance Salt Solution (HBSS) sans rouge de phénol (Sigma : H8264) : 0 °C

- Chlorure de sodium (Pro labo : 27810.295)
- Triton X-100 (Produits Touzard & Matignon)
- Acide éthylènediaminotétracétique (EDTA) (Prolabo : 20302.180)
- Trizma[®] hydrochloride ou Tris-HCl (Sigma : T3253)
- Cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma : P8340) : aliquoté par 200 µL, -20 °C
- Solution d'acide bicinchoninique (Sigma : B9643) : 0 °C
- Solution de sulfate de cuivre (Sigma : C2284) : 0 °C
- Solution d'albumine bovine (BSA) (Sigma : P0914) : 0 °C

- Tris(hydroxyméthyl)aminométhane ou TrisBase (Sigma : 252859)
- Sodium dodécylsulfate ou SDS (Sigma : L3771)
- Acrylamide/Bis-acrylamide 30 % (Sigma : A3699) : 0 °C
- *N,N,N',N'*-tétraméthyléthylènediamine ou TEMED (Sigma : 87689)
- Persulfate d'ammonium ou APS (Sigma : A3678)
- Glycérol (Prolabo : 24387.292)
- Bleu de bromophénol (Aldrich : 114391)
- 2-mercaptoéthanol (Sigma : M7154) : 0 °C
- Marqueur de poids moléculaire (Sigma : C3312) : aliquoté par 100 µL, -20 °C
- Marqueur de poids moléculaire biotinylé (Sigma : B2787) : aliquoté par 100 µL, -20 °C
- Trypsine de pancréas bovin (Sigma : T9201) : -20 °C

- Glycine (Sigma : G7126)
- Brilliant Blue R-250 (Fluka : 27816)
- Thiosulfate de sodium pentahydraté (Prolabo : 27905.362)
- Nitrate d'argent (Prolabo : 21572.188)
- Carbonate de sodium (Prolabo : 27771.290)
- Formaldéhyde 37 % (Aldrich : 252549)
- Sulfate d'ammonium (Prolabo : 21333.296)
- Acide orthophosphorique 85 % (Merck : B855652)
- Brilliant Blue G (Sigma : B0770)
- Albumine bovine (Sigma : A3912) : 0 °C
- Tween-20 (Sigma : P7949)
- Streptavidine-HRP (Thermo Scientific : 21126) : aliquotée par 100 µL, -20 °C
- Substrats pour révélation ECL (Thermo Scientific : 32209) : 0 °C
- Révélateur photo Kodak (VWR : KODK5158621)
- Fixateur photo Kodak (VWR : KODK5158639)
- Streptavidine immobilisée sur agarose CL-48 (Sigma : 85881) : 0 °C
- Résine d'agarose-Streptavidine (Thermo Scientific : 20347) : 0 °C
- Résine d'agarose-Avidine (Thermo Scientific : 20219) : 0 °C
- Dithiothréitol (DTT) (Sigma : D0632) : 0 °C
- Biotine (Sigma : B4501) : 0 °C
- Urée (Aldrich : U2709)
- Thiourée (Sigma : T7875)
- Trypsine (Promega : V5111) : -20 °C
- Résine C18 : 0 °C
- Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique ou matrice HCCA (Sigma : C-2020) : 0 °C

Préparation de milieu de culture pour cellules FRTL-5

Les cellules FRTL-5 (Fisher Rat Thyroid Low serum 5 %) ont été obtenues à partir d'une glande normale de thyroïde de rat Fisher de 5 à 6 semaines. Ces cellules présentent les mêmes caractéristiques de différenciation que les cellules thyroïdiennes originales, excepté qu'elles ne forment pas de follicules, et possèdent les mêmes propriétés de transport d'iode que des cultures primaires : inhibition par le perchlorate, dépendance au sodium, sensibilité à la TSH (Thyroid-Stimulating Hormone). La préparation du milieu de culture de ces cellules nécessite la préparation préalable de solutions d'hormones :

Préparation des solutions d'hormones (sous hotte à flux laminaire) :

- Solution de TSH 1000× : Reconstituer un flacon de TSH lyophilisée (10 U.I) avec 10 mL de tampon HBSS stérile. Aliquoter par échantillons de 3 mL, congeler dans l'azote liquide et stocker à -20°C.
- Solution d'Insuline 1000× : Dissoudre 100 mg d'insuline dans 10 mL de tampon HBSS stérile et ajouter quelques gouttes de NaOH 1 M (0,4 g dans 10 mL d'eau) pour aider à la solubilisation de l'insuline. Aliquoter par échantillons de 3 mL, congeler dans l'azote liquide et stocker à -20°C.
- Solution de Transferrine humaine 1000× : Dissoudre 50 mg de transferrine humaine 98 % dans 10 mL de tampon HBSS stérile. Aliquoter par échantillons de 3 mL, congeler dans l'azote liquide et stocker à -20°C.
- Solution d'Hydrocortisone 1000× : Dissoudre 3,62 mg d'hydrocortisone 98 % dans 2 mL d'éthanol absolu et 8 mL de tampon HBSS stérile. Transférer 10 µL de cette solution dans 10 mL de tampon HBSS stérile. Aliquoter par échantillons de 3 mL, congeler dans l'azote liquide et stocker à -20°C.
- Solution d'acétate de L-Glycine-L-Histidine-L-Lysine 1000× : Dissoudre 0,5 mg d'acétate de L-Glycine-L-Histidine-L-Lysine dans 0,5 mL de tampon HBSS stérile. Transférer 20 µL de cette solution dans 10 mL de tampon HBSS stérile. Aliquoter par échantillons de 3 mL, congeler dans l'azote liquide et stocker à -20°C.

Préparation du cocktail d'hormones 5H (100× (sous hotte à flux laminaire) :

Dans 15 mL de tampon HBSS stérile (avec rouge de phénol), ajouter 3 mL de solution 1000× de TSH, 3 mL de solution 1000× d'insuline, 3 mL de solution 1000× de Transferrine humaine, 3 mL de solution 1000× d'hydrocortisone et 3 mL de solution 1000× d'acétate de L-Glycine-L-Histidine-L-Lysine. Aliquoter par échantillons de 5 mL et stocker à -20°C.

Préparation de milieu complet (sous hotte à flux laminaire) :

Dans 500 mL de Coon's modified Ham's F12 medium, ajouter 5 mL de L-Glutamine (concentration finale : 2 mM), 5 mL de Pénicilline/Streptomycine (concentration finale : 1 mg/mL), 5 mL de cocktail d'hormones 5H 100× (équivalent dans le milieu à 10 µg/mL d'Insuline, 10 nM d'Hydrocortisone, 10 ng/mL d'acétate de L-Glycine-L-Histidine-L-Lysine, 1 mU/mL de TSH et 5 µg/mL de Transferrine), puis 25 mL de sérum de veau fœtal inactivé (milieu à 5 %). Ajouter 5 mL de cocktail d'hormones et 5 mL de L-Glutamine une fois par semaine et conserver 2 semaines maximum à 0 °C.

Décongélation de cellules

A réaliser sous hotte à flux laminaire

Produits : du milieu complet et du tampon HBSS (avec rouge de phénol) préalablement chauffés au bain-marie à 37 °C, un lot de cellules congelées (4 à 10 x 10⁶ cellules).

Protocole :

- Préparer 10 mL de milieu dans un tube Falcon de 50 mL
- Préparer une flasque de 25 cm² (Corning 734-1712, VWR) : inscrire la date, le nom de la lignée et le nombre de passages et ajouter 3 mL de milieu
- Sortir 1 lot de cellules de l'azote liquide, le chauffer dans ses mains jusqu'à ce que le glaçon se détache des parois
- Verser le glaçon dans le tube Falcon de 50 mL sans toucher les bords
- Après disparition du glaçon, centrifuger les cellules à 1500 RPM à température ambiante pendant 5 min
- Retirer le surnageant
- Resuspendre doucement le culot dans 2 mL de milieu par des « allers-retours » à la micropipette
- Ajouter la suspension cellulaire à la flasque préparée précédemment
- Placer la flasque dans l'incubateur à 37 °C et 5 % CO₂

Procéder le lendemain à un changement de milieu simple (sans lavage à l'HBSS) et 2 jours plus tard à un changement de milieu complet (avec lavage) :

- Retirer le milieu
- Ajouter 5 mL d'HBSS stérile
- Faire passer doucement sur les cellules par inclinaisons de la flasque
- Retirer le tampon
- Ajouter 5 mL de milieu

Trypsinolyser les cellules lorsqu'elles arrivent à confluence et ensemercer ces cellules dans une nouvelle flasque plus grande (cf. protocole de passage). En attendant, effectuer un changement de milieu complet tous les 3 à 4 jours.

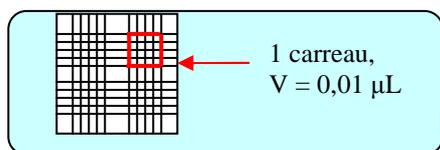
Passage de cellules FRTL-5

A réaliser sous hotte à flux laminaire avec des produits et du matériel stérile, à l'exception du comptage en cellule de Malassez

Produits : de la trypsine-EDTA (0,25 %), du tampon HBSS (avec rouge de phénol) et du milieu complet préalablement chauffés au bain-marie à 37 °C, du PBS (non stérile) et une solution de bleu Trypan à 0,4 % (non stérile)

Protocole :

- Préparer des flasques de 75 cm² (Corning 734-1713, VWR) ou des boîtes de Pétri de 55 cm² (Corning 734-1705, VWR) stériles : inscrire le nom de la lignée, la date et le nombre de passages et ajouter 10 mL de milieu par récipient
- Aspirer le milieu de la flasque sortie de l'incubateur à l'aide d'une pipette sérologique
- Ajouter 5 mL de tampon HBSS sur la paroi opposée à celle des cellules, faire passer doucement sur les cellules par inclinaisons de la flasque puis retirer le tampon
- Ajouter de la trypsine-EDTA (0,25 %) directement sur le tapis cellulaire (1,5 mL pour une flasque de 25 cm², 3 mL pour une de 75 cm²)
- Placer la flasque dans l'incubateur à 37 °C et 5 % CO₂ jusqu'au décollement des cellules (5 à 10 min pour une flasque de 25 cm², 15 à 20 min pour une de 75 cm²)
- Ajouter rapidement du milieu (3 x le volume de trypsine-EDTA utilisé)
- Prélever la suspension et la reverser sur la paroi des cellules 3-4 fois pour entraîner les dernières cellules encore accrochées
- Transférer la suspension dans un tube Falcon de 50 mL
- Centrifuger les cellules à 1500 RPM pendant 5 min à température ambiante
- Retirer le surnageant
- Resuspendre doucement le culot dans 4 mL de milieu avec une micropipette
- Ajouter 6 mL de milieu avec une pipette et homogénéiser par plusieurs « allers-retours »
- Procéder au comptage en cellule de Malassez :



Cellule de Malassez

- Prélever 20 µL de suspension cellulaire et les ajouter dans un tube Eppendorf 0,5 mL à 20 µL de Bleu Trypan 0,4 % et 160 µL de tampon PBS
- Homogénéiser par des allers-retours à la micropipette
- Faire couler 20 µL de cette solution entre une lamelle de verre et la plage de lecture de la cellule de Malassez
- Attendre 1 min que les cellules sédimentent
- Compter au microscope le nombre de cellules présent dans chaque carreau
- Calculer la moyenne n de cellules par carreaux

Nombre de cellules par µL dans la solution de comptage : $n' = n / 0,01$

Nombre de cellules par µL dans la suspension cellulaire : $n'' = n' \times 10$

- Connaissant la concentration cellulaire de la suspension, ajouter le nombre de cellules nécessaire dans chaque flasque ou boîte de Pétri : soit 4×10^6 de cellules par flasque et 6×10^6 par boîte de Pétri pour obtenir 80 % de confluence en 7 et 5 jours, respectivement
- Placer les flasques et/ou les boîtes de Pétri dans l'incubateur à 37 °C et 5 % CO₂

Congélation de cellules

A réaliser sous hotte à flux laminaire avec des produits et du matériel stérile, à l'exception du comptage en cellule de Malassez.

Produits : du milieu complet et du tampon HBSS (avec rouge de phénol) préchauffés au bain-marie à 37 °C, de la trypsine-EDTA (0,25 %), du PBS (non stérile), une solution de bleu Trypan à 0,4 % (non stérile), du DMSO (> 99,7 %) et du sérum de veau fœtal inactivé

Protocole (pour 4 flasques 75 cm² à confluence) :

- Aspirer le milieu des flasques à l'aide d'une pipette sérologique
- Ajouter 5 mL de tampon HBSS sur la paroi opposée à celle des cellules, faire passer doucement sur les cellules par inclinaisons de la flasque puis retirer le tampon
- Ajouter 3 mL de trypsine-EDTA (0,25 %) par flasque, directement sur le tapis cellulaire
- Placer les flasques dans l'incubateur à 37 °C et 5 % CO₂ 15 à 20 minutes
- Ajouter rapidement 9 mL de milieu par flasque
- Récupérer un maximum de cellules encore accrochées en les entraînant au moyen de la suspension
- Transférer les suspensions dans un tube Falcon de 50 mL
- Centrifuger les cellules à 1500 RPM pendant 5 min à température ambiante
- Retirer le surnageant
- Resuspendre doucement le culot dans 2 mL de sérum de veau fœtal par plusieurs « allers-retours » à la micropipette
- Ajouter 3 mL de sérum de veau fœtal et homogénéiser par plusieurs « allers-retours » à la pipette
- Déterminer la concentration de la suspension cellulaire obtenue par comptage en cellule de Malassez (cf. protocole de passage)
- Diluer, si nécessaire, la suspension cellulaire avec du sérum de veau fœtal de sorte à obtenir une concentration comprise entre 4 et 10 x 10⁶ de cellules / mL

- Préparer des vials cryogéniques de 2 mL (Nalgène 5000-0020) : dater, indiquer le nom de la lignée et le nombre de passages, remplir avec 200 µL de DMSO et 800 µL de sérum de veau fœtal
- Ajouter 1 mL de suspension cellulaire par vial
- Mettre les vials dans une boîte à isopropanol (Nalgène), placer le tout dans une boîte en polystyrène contenant de la carboglace, placer un peu de carboglace sur le couvercle de la boîte à isopropanol, fermer la boîte en polystyrène et laisser refroidir 1 h 30
- Plonger les vials quelques secondes dans un bain d'éthanol et de carboglace (-80 °C) puis transférer rapidement dans l'azote liquide

Le lendemain, décongeler l'un des aliquots selon le protocole de décongélation et cultiver les cellules deux à trois semaines pour voir si elles ont bien supporté le processus de congélation. Si ce n'est pas le cas, jeter l'ensemble des aliquots congelés.

Ensemencement de cellules dans des microplaques 96 puits

A réaliser sous hotte à flux laminaire avec des produits et du matériel stérile, 3 jours avant les tests d'accumulation d'iodure. Le distributeur automatique est nettoyé à l'éthanol avant d'être introduit sous la hotte. La cassette distributrice, une pince métallique et une bouteille en verre munie d'un barreau aimanté sont stérilisés dans l'autoclave.

Produits : du milieu complet et du tampon HBSS (avec rouge de phénol) préchauffés au bain-marie à 37 °C, de la trypsine-EDTA (0,25 %), du PBS (non stérile) et une solution de bleu Trypan à 0,4 % (non stérile).

Protocole :

Les cellules sont trypsinolysées, resuspendues dans 10 mL de milieu complet et comptées en cellule de Malassez comme indiqué dans le protocole de passage.

Le nombre de cellules à ensemercer dans les microplaques (Costar 3628, VWR) pour être à environ 80 % de confluence le jour du test est de 50 000 cellules par puit pour un volume de 200 µL. La suspension cellulaire obtenue précédemment est donc diluée dans du milieu complet de sorte à obtenir une concentration de 250 000 cellules/mL. Cette dilution est effectuée dans la bouteille en verre munie d'un barreau aimanté.

La bouteille est placée sur un agitateur magnétique et la suspension cellulaire agitée doucement. La suspension est distribuée dans les puits des colonnes 2 à 11 des microplaques au moyen du distributeur automatique (Multidrop 384), à raison de 200 µL/puit. Les microplaques sont ensuite placées dans l'incubateur à 37 °C et 5 % CO₂ pendant 3 jours.

Remarque : Manipuler les canaux de la cassette de distribution le plus possible au moyen de la pince métallique pour limiter les contaminations. Eviter le contact des canaux avec la paillasse au cours de l'ensemencement et laver les canaux à l'eau et à l'éthanol une fois l'ensemencement terminé.

Dosage des ions iodures par détection spectrophotométrique

Cette méthode de dosage est basée sur la réaction d'oxydoréduction qui a lieu entre des sels cériques et de l'acide arsénieux. Cette réaction, très lente en conditions normales, est catalysée par les ions iodures et la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration de ces ions quand ils sont à des concentrations très faibles.

Les sels cériques étant jaunes et les sels céreux incolores, la réaction est suivie par spectrophotométrie. Les dosages se font dans des microplaques 96 puits (stériles ou non) dans lesquelles on peut doser jusqu'à 80 échantillons.

Solutions :

Solution d'arsénite de sodium 4× (96 mM)

Dissoudre 4,75 g d'As₂O₃ (M = 197,8 g.mol⁻¹) dans 50 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium 2 M dans une fiole jaugée de 500 mL, sur plaque chauffante (~40 °C) et sous agitation magnétique (attendre la dissolution complète, parfois plusieurs heures). Laisser refroidir, ajouter 24 g de NaCl, attendre la dissolution complète puis compléter la solution à 500 mL avec de l'eau. Conserver à température ambiante et à l'abri de la lumière (6 mois maximum) et diluer par 4 avant d'effectuer les dosages.

Solution de sulfate de cérium (IV) et d'ammonium 4× (42 mM)

Dissoudre 12,53 g de Ce(SO₄)₄(NH₄)₄ · 2 H₂O (M = 632,6 g.mol⁻¹) dans 200 mL d'eau, dans une fiole jaugée de 500 mL et sous agitation magnétique. Placer la fiole dans un bain de glace, ajouter 50 mL d'acide sulfurique 98 % et attendre une dizaine de minutes. Laisser la solution revenir à température ambiante puis attendre la dissolution complète. Compléter la solution à 500 mL avec de l'eau. Conserver à 4 °C et à l'abri de la lumière (6 mois maximum). Laisser la solution reposer à 4 °C pendant une semaine avant la première utilisation et diluer par 4 avant d'effectuer les dosages.

Solutions étalons d'iodure de sodium NaI

Solution mère à 2 mM :

Dissoudre 29,95 mg d'iodure de sodium avec de l'eau dans une fiole jaugée de 100 mL et ajuster le volume.

Solution intermédiaire à 20 µM :

Prélever 1 mL de solution mère à 2 mM et ajuster le volume à 100 mL dans une fiole jaugée.

Gamme étalon (ajustements à la fiole jaugée avec de l'eau) :

	Etalon E ₁	Etalon E ₂	Etalon E ₃	Etalon E ₄	Etalon E ₅	Etalon E ₆	Etalon E ₇	Etalon E ₈
Concentration (nM)	0	100	200	300	400	500	600	700
Volume de solution intermédiaire (µL)	0	250	500	750	1000	1250	1500	1750
Volume total (mL)	50	50	50	50	50	50	50	50

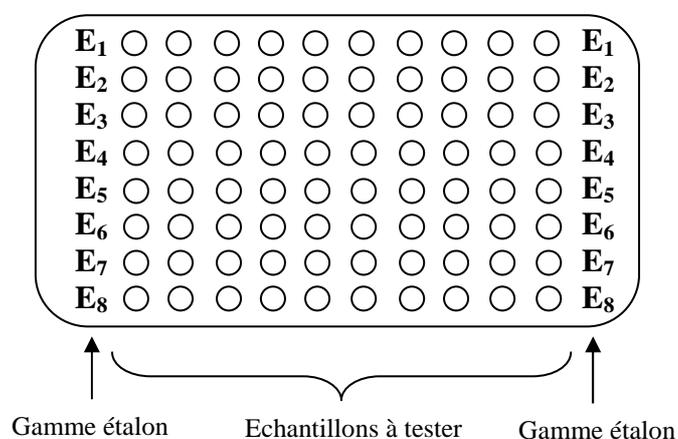
Ces solutions sont conservées à température ambiante et à l'abri de la lumière (6 mois environ).

Protocole :

Utilisation de microplaques 96 puits transparentes dans le domaine de longueur d'onde utilisé (Costar 3628, VWR ou Greiner 736-0119, VWR) et contenant les échantillons à doser dans les colonnes 2 à 11 (100 μL /puits).

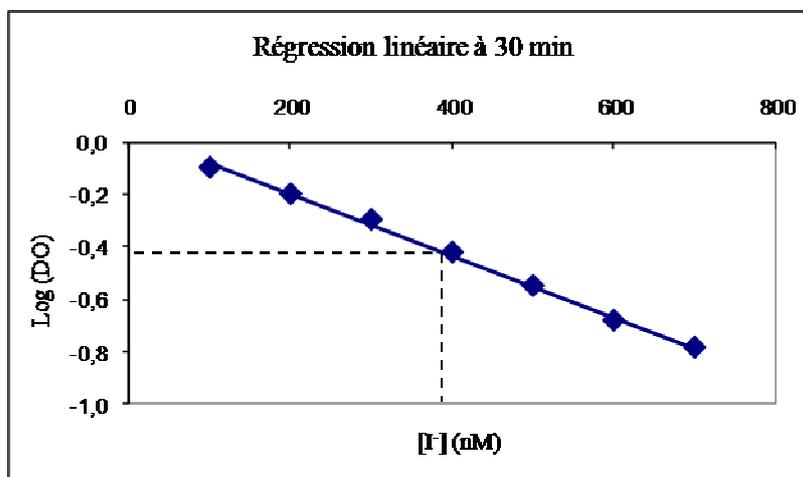
Dosage (1 microplaque 96 puits)

- Placer les solutions étalons par ordre croissant de concentration dans les colonnes 1 et 12 des microplaques comme indiqué ci-dessous (100 μL /puits)
- Ajouter, avec le Multidrop 384, 100 μL /puits de solution de Ce^{IV} 1 \times (colonnes 1 à 12)
- Laver les canaux de la cassette distributrice à l'eau (environ 10 mL en fonction rinçage)
- Ajouter, avec le Multidrop 384, 100 μL /puits de solution d' As^{III} 1 \times (colonnes 1 à 12)
- Incuber pendant 30 min à l'abri de la lumière
- Mesurer l'absorbance à 420 nm (spectrophotomètre SPECTRAmax[®] GEMINI XS)



Courbe d'étalonnage

- Tracer la droite d'étalonnage : $\log \text{DO} = f([\text{I}])$ grâce à la fonction de régression linéaire du logiciel Microsoft Excel en moyennant les valeurs d'absorbance obtenues pour chacune des solutions étalons (colonnes 1 et 12)
- Déterminer, grâce à l'équation de la droite, la concentration en iodures de chaque échantillon inconnu (colonnes 2 à 11)



Criblage d'analogues d'ITB₅

Lors de ce criblage, qui a duré 2 semaines, 183 composés ont été testés sur des cellules FRTL-5. Ces cellules sont ensemencées 3 jours avant le test dans les colonnes 2 à 11 de microplaques 96 puits stériles de sorte à être à environ 80 % de confluence le jour du test. Les mesures des IC₅₀ du perchlorate et d'ITB₅ servent de contrôle dans chaque microplaque.

Stock pour une campagne de criblage (2 semaines, 23 microplaques) :

- 16 flasques de 75 cm² de cellules FRTL-5
- 1 L de Coon's modified Ham's F12 medium, 10 mL de L-glutamine 200 mM, 10 mL de Pénicilline/Streptomycine 100 mg/mL, 10 mL de cocktail d'hormones 5H 100× et 50 mL de sérum de veau fœtal inactivé
- 50 mL de trypsine-EDTA (0,25 %), 120 mL d'HBSS stérile, 700 µL de PBS et 100 µL de Bleu Trypan 0,4 %
- 23 microplaques 96 puits (Costar 3628, VWR)
- 500 µL de NaClO₄ 20 mM et d'ITB₅ 20 mM
- 8 L de tampon HBSS (avec rouge de phénol), 80 mL de tampon Hépès 1 M, 5 mL de solution NaI à 2 mM, 5 mL de solutions étalons de NaI (cf. protocole de dosage des ions iodures), 100 mL de solution de Ce^{IV} 4× (42 mM) et de solution d'As^{III} 4× (96 mM)

Description de la chimiothèque :

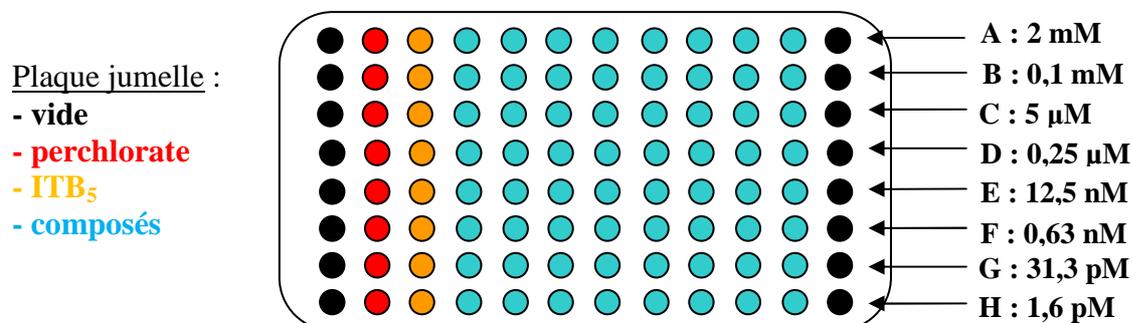
La chimiothèque est composée de 183 analogues d'ITB₅ préparés au laboratoire. Ces composés sont purs à plus de 90 % (RMN H¹ et LC/MS) et sont stockés dans des piluliers à -20 °C à une concentration de 20 mM dans le DMSO.

Solutions (pour une semaine de criblage) :

- 4 L d'Hépès 10 mM dans du tampon HBSS
- 50 mL de NaI à 100 µM dans du tampon HBSS/Hépès 10 mM
- 200 mL de Ce^{IV} 1× (10,5 mM)
- 200 mL d'As^{III} 1× (24 mM)

Préparation des plaques jumelles de composés 10× :

Les composés sont sortis du congélateur la veille et les plaques préparées le matin même à partir des solutions à 20 mM. Les dilutions sont effectuées dans du tampon HBSS /Hépès 10 mM avec une pipette à 8 canaux :

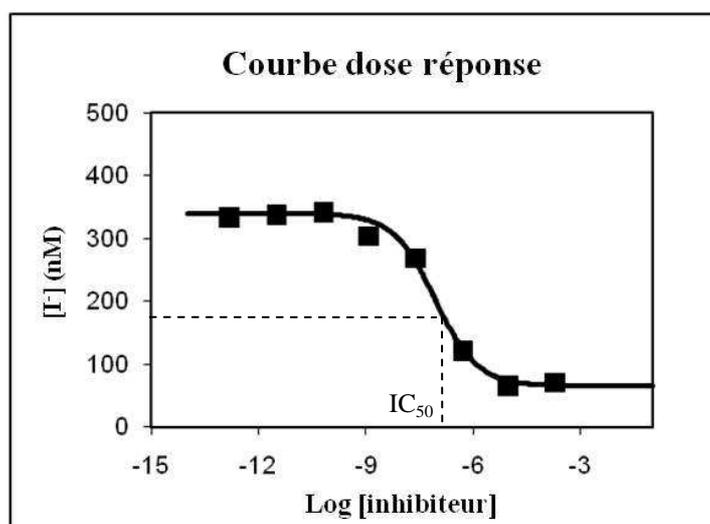


Protocole de criblage (pour une microplaque, colonnes 2 à 11) :

- Sortir la microplaque de l'incubateur
- Remplacer le milieu nutritif par 80 µL de tampon HBSS/Hépès 10 mM à température ambiante grâce au laveur de plaques

- Transférer 10 µL de composés depuis la plaque jumelle grâce au Liquidator 96
- Ajouter 10 µL de NaI 100 µM grâce au Liquidator 96
- Laisser incubé 1 h à l'abri de la lumière
- Remplacer les surnageants par 80 µL de tampon HBSS/Hépès 10 mM à 4 °C grâce au laveur de plaques
- Eliminer immédiatement le tampon en renversant la microplaque sur du papier absorbant
- Ajouter 100 µL d'eau grâce au Multidrop 384

Lors d'une journée de criblage, l'ensemble de ces opérations est effectué sur 6 microplaques avec un décalage de 5 min entre chaque plaque. La concentration en iodure dans les 100 µL d'eau est ensuite déterminée pour les 6 microplaques par dosage spectrophotométrique (cf. protocole de dosage des ions iodures) et les données traitées dans un classeur Excel. Le graphique : $[I^-] = f(\log[\text{inhibiteur}])$ est enfin tracé pour chaque composé afin de déterminer son IC_{50} .



Les IC_{50} sont calculées en utilisant une méthode de régression non-linéaire. Pour chaque inhibiteur, les données expérimentales sont ajustées à l'équation de Hill (1) théorique par la méthode des moindres carrés. Le calcul est réalisé par un classeur Excel "maison".

(1) : Equation de Hill : $[I^-] = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{10^{IC_{50}}}{10^{\log[X]}}\right)^n}$ avec

- [I⁻] : concentration d'iodure expérimentale
- max : concentration maximale d'I⁻
- min : concentration minimale d'I⁻
- [X] : concentration en inhibiteur X
- n : nombre de Hill (= 1 dans notre cas)

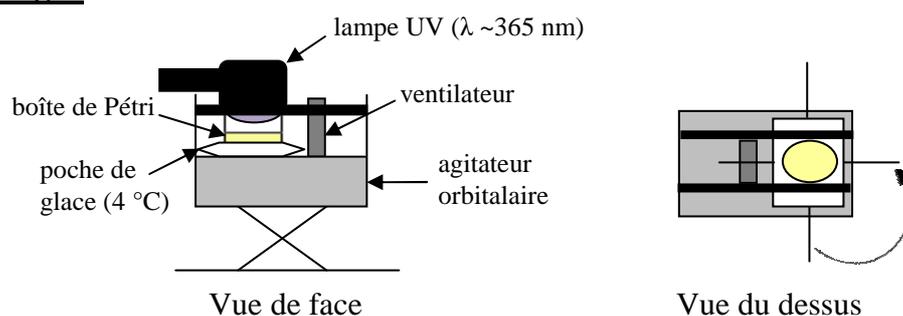
Une semaine de criblage :

Lundi	Mardi	Mercredi	Jeudi	Vendredi
- Préparation de 500 mL de milieu pour la semaine	- Passage de cellules FRTL-5 et ensemencement de 6 plaques	- Préparation de de tampon HBSS/Hépès 10 mM, d'As ^{III} 24 mM, de Ce ^{IV} 10,5 mM et de NaI 100 µM	- Criblage sur 6 plaques	- Criblage sur 6 plaques
- Passage de cellules FRTL-5 et ensemencement de 6 plaques			- Changement de milieu dans les flasques du lundi	- Changement de milieu dans les flasques du mardi

Photomarquage sur cellules et lyse cellulaire

Les expériences de photomarquage sont réalisées dans des boîtes de Pétri de 55 cm² ensemencées 5 jours auparavant avec 6×10^6 de cellules FRTL-5 de sorte à atteindre environ 80 % de confluence le jour de l'expérience. Les solutions de composés sont préparées le jour même dans du tampon HBSS (sans rouge de phénol) à partir de solutions mères à 20 mM dans le DMSO. Les conditions d'incubation et de photomarquage indiquées ici sont celles qui ont été déterminées pour les sondes **ITB₅-P₁** et **ITB₅-P₂**. L'exposition directe des échantillons (solutions de composés, cellules photomarquées, lysats) à la lumière est limitée au maximum.

Montage :



La lampe UV est allumée ~5 min avant que les expériences ne débutent. La boîte de Pétri est placée sur une poche de glace et immobilisée entre les deux barres en caoutchouc d'un agitateur orbitalaire. Un ventilateur d'ordinateur est placé à proximité pour éviter l'échauffement excessif des cellules. La lampe est posée sur les barres de l'agitateur, au-dessus de la boîte de Pétri, afin d'amener le centre de l'ampoule à une distance d'environ 5 cm de la solution. Pour un temps t de photomarquage, la lampe est tournée d'un $\frac{1}{4}$ de tour tous les $\frac{1}{4} t$ (cf. vue du dessus) pour que la dose d'UV reçue par les cellules soit aussi homogène que possible sur l'ensemble de la surface de la boîte de Pétri.

Photomarquage contrôle en absence de composé (1 boîte de Pétri) :

- **Solutions :**
 - tampon HBSS (sans rouge de phénol) : 10 mL
 - tampon PBS à 4 °C : 10 mL
- **Protocole :**
 - Retirer le milieu de culture avec une pipette sérologique
 - Ajouter délicatement 10 mL de tampon HBSS en s'appuyant sur le rebord de la boîte
 - Immobiliser la boîte de Pétri sur la poche de glace et mettre en route l'agitateur
 - Placer la lampe et déclencher le chronomètre
 - Photomarquer les cellules 4 min
 - Retirer le tampon avec une pipette sérologique
 - Ajouter 5 mL de PBS à 4 °C directement sur les cellules
 - Détacher les cellules au moyen d'un grattoir à cellules stérile
 - Transférer les cellules dans un tube Falcon de 15 mL avec une pipette sérologique
 - Conserver le tube Falcon dans de la glace

Photomarquage en présence de sonde seule (1 boîte de Pétri) :

- **Solutions :**
 - solution de sonde à 5 μ M : 10 mL
 - tampon PBS à 4 °C : 10 mL

- **Protocole :**
 - Retirer le milieu de culture avec une pipette sérologique
 - Ajouter délicatement 10 mL de sonde à 5 μ M en s'appuyant sur le rebord de la boîte
 - Incuber 10 min à l'abri de la lumière et à température ambiante
 - Placer la boîte de Pétri sur l'agitateur puis la lampe, déclencher le chronomètre
 - Photomarquer les cellules 4 min
 - Retirer la solution avec une pipette sérologique
 - Gratter les cellules et les transférer dans un tube Falcon de 15 mL grâce à 2 x 5 mL de PBS à 4 °C (comme ci-dessus)
 - Conserver le tube Falcon dans de la glace

Photomarquage en présence de sonde et de compétiteur (1 boîte de Pétri) :

- **Solutions :**
 - solution de sonde à 10 μ M : 5 mL
 - solution de compétiteur à 500 μ M : 5 mL
 - tampon PBS à 4 °C : 10 mL
- **Protocole :**
 - Retirer le milieu de culture avec une pipette sérologique
 - Ajouter délicatement 5 mL de compétiteur à 500 μ M
 - Incuber 10 min à l'abri de la lumière et à température ambiante
 - Ajouter délicatement 5 mL de sonde à 10 μ M
 - Incuber 10 min supplémentaires à l'abri de la lumière et à température ambiante
 - Placer la boîte de Pétri sur l'agitateur puis la lampe, déclencher le chronomètre
 - Photomarquer les cellules 4 min
 - Retirer la solution de sonde et de compétiteur avec une pipette sérologique
 - Gratter les cellules et les transférer dans un tube Falcon de 15 mL grâce à 2 x 5 mL de PBS à 4 °C (comme ci-dessus)
 - Conserver le tube Falcon dans de la glace

Lyse cellulaire (3 tubes Falcon) :

Réaliser l'ensemble de la procédure à 4 °C.

- **Solutions :**
 - tampon PBS à 4 °C : 3 mL
 - tampon de lyse : 1 mL (10 μ L de Tris-HCl 1 M à pH = 7,4, 20 μ L d'EDTA 0,25 M à pH = 8, 42 μ L de NaCl 3 M, 100 μ L de Triton X-100 à 10 %, 10 μ L de SDS 10 %, 818 μ L d'eau, 20 μ L de cocktail d'inhibiteurs de protéases)
- **Protocole :**
 - Centrifuger les tubes Falcon de 15 mL pendant 5 min à 4 °C et 1500 RPM
 - Retirer les surnageants
 - Resuspendre les culots dans 1 mL de PBS à 4 °C
 - Transférer dans des tubes Eppendorf d'1,5 mL à fond conique
 - Centrifuger 5 min à 4 °C et 1500 RPM
 - Retirer les surnageants avec une micropipette
 - Resuspendre les culots dans 200 μ L de tampon de lyse
 - Incuber 1 h à 4 °C en vortexant les échantillons toutes les 20 min
 - Centrifuger 5 min à 4 °C et 1500 RPM
 - Transférer les surnageants dans des tubes Eppendorf de 2 mL

Dosage protéique à l'acide bicinchoninique

Le dosage de protéines est réalisé en microplaque 96 puits (Greiner 736-0119, VWR). Il est basé sur la réduction des ions Cu^{2+} par les liaisons peptidiques des protéines à 37 °C. A cette température, la réduction est proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques. La réduction est suivie de la chélation de chaque ion Cu^+ formé par 2 molécules d'acide bicinchoninique, les complexes produits absorbant à 562 nm. La concentration protéique des échantillons est déterminée par mesure de l'absorbance à 562 nm et en se référant à une gamme étalon d'albumine bovine.

Solutions :

- solution étalon d'albumine bovine à 1 mg/mL
- solution R : 20 mL d'acide bicinchoninique + 400 μL de sulfate de cuivre (solutions Sigma, voir références p.175)

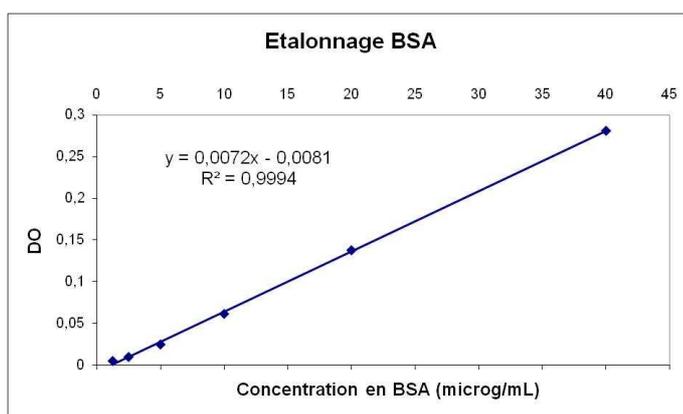
Protocole (1 microplaque, 1 échantillon) :

- Préparer la microplaque de la manière suivante :

	colonne 1 : eau	colonnes 2 et 3 : gamme BSA en duplicat (concentration en $\mu\text{g/mL}$)	colonnes 4 et 5 : échantillon en duplicat (facteur de dilution)
A	100 μL	16 μL à 1 mg/mL + 184 μL d'eau (80)	2 μL + 198 μL d'eau (100)
B	100 μL	100 μL de A + 100 μL d'eau (40)	100 μL de A + 100 μL d'eau (200)
C	100 μL	100 μL de B + 100 μL d'eau (20)	100 μL de B + 100 μL d'eau (400)
D	100 μL	100 μL de C + 100 μL d'eau (10)	
E	100 μL	100 μL de D + 100 μL d'eau (5)	
F	100 μL	100 μL de E + 100 μL d'eau (2,5)	

Remarque : 100 μL de solution sont éliminés dans la ligne F des colonnes 2 et 3 et dans la ligne C des colonnes 4 et 5 afin d'avoir dans tous les puits le même volume final de 100 μL .

- Ajouter 100 μL /puits de solution R avec une pipette à 8 canaux
- Incuber 30 min à 37 °C
- Mesurer l'absorbance à 562 nm (spectrophotomètre SPECTRAmax[®] GEMINI XS)
- Tracer la droite d'étalonnage : $\text{DO} = f([\text{BSA}])$ en moyennant les valeurs de DO obtenues
- Déterminer la concentration en protéines de l'échantillon : prendre la moyenne des deux valeurs de DO les plus élevées encore comprises dans la gamme d'étalonnage



Capture sur billes d'agarose-Streptavidine

Les expériences de capture sur billes d'agarose-Streptavidine reposent sur la forte affinité de la Biotine et de la Desthiobiotine pour la Streptavidine. Les constantes de dissociation sont de 10^{-15} M pour un complexe Biotine - Streptavidine et de 10^{-12} M pour un complexe Desthiobiotine - Streptavidine. Cette différence d'affinité implique que le traitement des échantillons soit adapté à la sonde utilisée lors des expériences de photomarquage.

Solutions :

- PBS 4 °C
- PBS-SDS (0,1 %)
- NaCl 1 M et NaCl 2 M
- Laemmli 5× (400 mg de SDS, 2,4 g de glycérol, 364 µL de β-mercaptoéthanol, 9,8 mg de bleu de bromophénol, 1 mL de Tris-HCl 1 M à pH = 6,8, 707 µL d'eau) : à diluer avec de l'eau pour obtenir du Laemmli 1×
- Solution de Biotine 3 mM dans du Laemmli 1×

Protocole :

Incubation :

- Prélever le volume nécessaire de billes (voir Tableau ci-dessous)
 - Transférer dans un contenant approprié (voir Tableau ci-dessous)
 - Ajouter du PBS à 4 °C et vortexer 10 s
 - Centrifuger 5 min à 4 °C et 3000 RPM
 - Retirer le surnageant avec une micropipette
- } 3 ×
- Diluer le lysat cellulaire à une concentration de 1 µg/µL avec du PBS-SDS (0,1 %) à 4 °C
 - Déposer la quantité de protéines souhaitée sur les billes d'agarose-Streptavidine
 - Faire tourner sur roue 1 nuit à 4 °C

	ITB₅-P₂	ITB₅-P₃
volume de billes (capacité de liaison)	15 µL (15 à 45 µg de BSA biotinylée)	120 µL (120 à 360 µg de BSA biotinylée)
contenant	tube Eppendorf d'1,5 mL	tube Falcon de 15 mL
volume des lavages au PBS	200 µL	500 µL
quantité de protéines à déposer	1 mg	4 mg

Lavages :

ITB₅-P₂

- Centrifuger 5 min à 10 °C et 3000 RPM
- Retirer le surnageant

ITB₅-P₃

- Centrifuger 5 min à 10 °C et 3000 RPM
- Retirer le surnageant

- Transférer les billes dans un tube Falcon de 15 mL avec 5 x 1 mL de PBS-SDS (0,1 %)
 - Incuber 10 min à température ambiante en vortexant l'échantillon toutes les 2 min
 - Centrifuger 5 min à 10 °C et 3000 RPM puis retirer le surnageant
- Ajouter 2,4 mL de PBS-SDS (0,1 %)
 - Vortexer 10 s
 - Centrifuger 5 min à 10 °C et 3000 RPM puis retirer le surnageant
- Transférer les billes dans un tube Eppendorf d'1,5 mL avec 4 x 250 µL de PBS-SDS (0,1 %)
 - Vortexer et centrifuger comme ci-dessus
- Ajouter 300 µL de Laemmli 1×
 - Fermer l'Eppendorf avec du parafilm
 - Incuber 15 min à 40 °C
 - Centrifuger 5 min à 20 °C et 3000 RPM
 - Retirer le surnageant
- Transférer les billes dans un tube Eppendorf d'1,5 mL avec 4 x 200 µL de PBS-SDS (0,1 %)
 - Incuber et centrifuger comme ci-dessus
 - Ajouter 400 µL de PBS-SDS (0,1 %)
 - Incuber et centrifuger comme ci-dessus
 - Ajouter 200 µL de PBS-SDS (0,1 %)
 - Incuber et centrifuger comme ci-dessus
- Ajouter 100 µL de Laemmli 1×
 - Fermer l'Eppendorf avec du parafilm
 - Incuber 15 min à 40 °C
 - Centrifuger 5 min à 20 °C et 3000 RPM puis retirer le surnageant
- Ajouter 100 µL de Laemmli 1×
 - Fermer l'Eppendorf avec du parafilm
 - Incuber 15 min à 60 °C
 - Centrifuger comme ci-dessus
 - Ajouter 100 µL de Laemmli 1×
 - Fermer l'Eppendorf avec du parafilm
 - Incuber 15 min à 80 °C
 - Centrifuger comme ci-dessus

Elution :

ITB₅-P₂

- Ajouter 70 µL de Biotine 3 mM dans du Laemmli 1×
- Incuber 15 min à 95 °C
- Laisser revenir à température ambiante

ITB₅-P₃

- Ajouter 210 µL de Biotine 3 mM dans du Laemmli 1×
- Incuber 15 min à 95 °C
- Laisser revenir à température ambiante

Remarque : les contrôles sans sonde et avec sonde + compétiteur sont traités de la même manière que la sonde à la laquelle ils se rapportent.

Electrophorèses

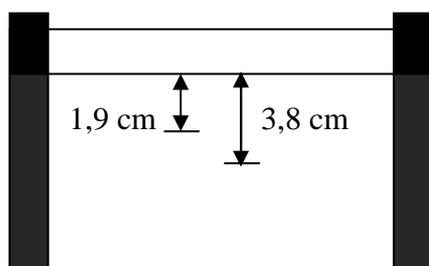
La préparation des gels ainsi que la migration des échantillons ont été réalisées grâce au système Miniprotean II de Bio-Rad. Les protocoles décrits ici sont adaptés aux expériences au cours desquelles 1 ou 4 mg de protéines ont été traités avec des billes d'agarose-Streptavidine. La hauteur du gel de concentration est d'1,9 cm pour les expériences portant sur 1 mg de protéines et de 3,8 cm pour celles portant sur 4 mg. Les échantillons devant être colorés au nitrate d'argent ou au bleu de Coomassie sont déposés sur des gels de 0,5 mm d'épaisseur, ceux devant être transférés sur une membrane sont déposés sur des gels d'1 mm d'épaisseur.

Remarque : si les échantillons sont destinés à être analysés en spectrométrie de masse, réaliser ces différentes étapes en portant des gants et une charlotte et ne travailler qu'avec du matériel parfaitement propre (nettoyé à l'éthanol ou n'ayant jamais été manipulé à mains nues)

Préparation d'un gel SDS-PAGE :

Montage

- Nettoyer le matériel avec du savon, rincer à l'eau puis à l'éthanol (plaques de verre, espaceurs, peignes)
- Réaliser un sandwich grande plaque - espaceurs - petite plaque de la manière suivante :



Superposer 2 espaceurs de 0,5 mm d'épaisseur pour obtenir un gel d'1 mm d'épaisseur

- Placer le sandwich dans l'un des supports à vis du Mini-Protean II, poser le tout perpendiculairement à la paillasse pour aligner le bas des plaques et des espaceurs puis serrer les vis
- Clipper le montage sur le support de coulée du Mini-Protean II
- Faire une marque à 1,9 ou 3,8 cm du haut de la petite plaque selon les échantillons à déposer

Solutions (doubler les volumes pour un gel d'1 mm d'épaisseur)

	Gel de concentration (5 %)	Gel de séparation (12 %)
H₂O milli Q	2,885 mL	1,675 mL
Tris-HCl 0,5 M pH = 6,8	1,25 mL	
Tris-HCl 1,5 M pH = 8,8		1,25 mL
Acrylamide-Bisacrylamide 30 %	830 µL	2 mL
SDS 10 %	50 µL	50 µL
APS 10 %	50 µL	50 µL
TEMED	10 µL	10 µL

Coulée

- Préparer les solutions décrites ci-dessus, sans APS, ni TEMED
- Ajouter l'APS et le TEMED dans le gel de séparation puis vortexer fortement
- Verser la solution entre les deux plaques de verre avec une pipette pasteur jusqu'à la marque

- Recouvrir d'isopropanol et laisser polymériser 10 min
- Retirer l'isopropanol en retournant le montage et à l'aide de papier absorbant
- Ajouter de l'eau jusqu'en haut à l'aide d'une pipette puis retirer (3×)
- Absorber l'eau résiduelle insérée dans l'espace interplaqué avec du papier Whatmann
- Ajouter l'APS et le TEMED dans le gel de concentration puis vortexer fortement
- Verser entre les deux plaques de verre jusqu'en haut
- Insérer délicatement le ou les peigne(s) souhaité(s) entre les deux plaques (1 peigne pour les gels à colorer, 2 peignes superposés pour les expériences de Western-Blot)
- Faire glisser le ou les peigne(s) jusqu'à ce que la partie en T se pose sur les espaceurs
- Laisser polymériser 5 min
- Ajouter de la solution de gel de concentration (tant que celle-ci est suffisamment liquide) au fur et à mesure que le gel se rétracte entre les dents du ou des peigne(s)

Migration des échantillons :

Solutions

- Tampon de migration 10× (TrisBase : 15 g, glycine : 72 g, SDS : 5 g, eau : 500 mL)
- Laemmli 5× (cf. protocole de capture sur billes d'agarose-Streptavidine)

Montage

- Retirer délicatement le ou les peigne(s)
- Remplir les puits d'eau puis retirer l'eau en retournant le support
- Sécher les puits avec du papier Whatmann
- Retirer le montage du support de coulée et le placer sur le support à électrodes
- Placer de l'autre côté du support à électrodes soit un deuxième montage avec gel, soit un support à vis ne contenant qu'une petite plaque de verre
- Placer le tout dans la cuve de migration
- Préparer 350 mL de tampon de migration 1× (diluer la solution 10× avec de l'eau)
- Remplir la chambre haute formée par les deux supports à vis jusqu'à ce que le tampon dépasse les petites plaques de verre de 1 à 2 cm puis verser le reste du tampon dans la cuve
- Retirer les bulles d'air du bas des plaques de verre par des mouvements de balancier

Dépôt des échantillons

- échantillons destinés à être transférés sur membrane :
 - * Additionner 10 µL de Laemmli 5× à la quantité souhaitée d'échantillon (40 µL max.)
 - * Compléter si nécessaire à 50 µL avec du tampon de lyse ou du PBS-SDS (0,1 %)
 - * Chauffer 5 min à 95 °C puis laisser revenir à température ambiante
 - * Déposer dans les puits du gel avec des cônes gel loader
- échantillons provenant du traitement sur billes d'1 mg de protéines ($V_{\text{solution}} = 70 \mu\text{L}$) :
 - * Vortexer et déposer les échantillons (surnageant + billes) avec des cônes gel loader
- échantillons provenant du traitement sur billes de 4 mg de protéines ($V_{\text{solution}} = 210 \mu\text{L}$) :
 - * Déposer en plusieurs fois et faire migrer chaque dépôt entre 1 et 5 min à 15 mA jusqu'à ce que l'échantillon effleure les billes déjà déposées (vortexer avant chaque dépôt)

Conditions de migration pour 1 gel (doubler l'ampérage pour 2 gels)

épaisseur du gel : 0,5 mm gel de concentration : 1,9 cm	épaisseur du gel : 0,5 mm gel de concentration : 3,8 cm	épaisseur du gel : 1 mm gel de concentration : 1,9 cm
15 min à 15 mA + ~ 30 min à 25 mA	25 min à 15 mA + 20 à 25 min à 25 mA	30 min à 15 mA + ~1 h à 25 mA

Transfert de protéines sur membrane PVDF et révélation par chimiluminescence

Transfert de protéines :

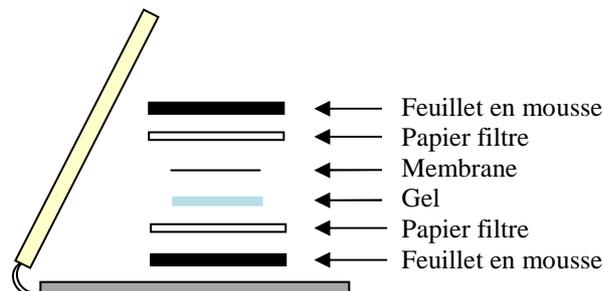
Les expériences de transfert ont été réalisées grâce au système Mini Trans-Blot de Bio-Rad.

Solutions

- Tampon de transfert 1× (TrisBase : 5,82 g, glycine : 2,93 g, eau : 1 L) à 4 °C
- Ethanol absolu

Protocole (pour 1 gel)

- Plonger 1 membrane PVDF (Bio-Rad 162-0174) dans de l'éthanol absolu quelques secondes
- Immerger la membrane dans une cuve contenant du tampon de transfert 1× (~300 mL)
- Ajouter dans la cuve le gel d'électrophorèse contenant les échantillons à transférer (éliminer au préalable les dents du gel de concentration au moyen d'un espaceur)
- Ajouter deux papiers filtres (Bio-Rad 170-3932) et deux feuillets en mousse noire
- Equilibrer 20 min
- Pendant ce temps, préparer le montage :
 - * placer la cuve de migration sur un agitateur magnétique et y ajouter un barreau aimanté
 - * placer le module à électrodes dans la cuve (borne négative au centre)
 - * remplir la cuve avec du tampon de transfert 1× à 4 °C
- Ouvrir une cassette face grise sur la paillasse et réaliser le sandwich suivant :



Remarques : la membrane doit être découpée aux dimensions exactes du gel, le gel est recouvert de tampon avant que la membrane ne soit déposée et une fois la membrane posée, une pipette pasteur est utilisée comme un rouleau à pâtisserie pour éliminer les bulles d'air

- Fermer la cassette en veillant à ne rien faire bouger
- Placer la cassette dans la cuve (face grise du côté de la borne négative, joint plastique en bas)
- Fermer la cuve et la relier à un générateur
- Transférer 1 h à 100 V sous agitation

Révélation par chimiluminescence :

Solutions

- PBS-Tween 0,1 % : 350 mL
 - PBS-Tween 0,1 % contenant 5 % de BSA : 40 mL
 - Streptavidine-HRP 1 mg/mL
 - Luminol : 2 mL
 - Peroxyde d'hydrogène : 2 mL
 - Révélateur photo dilué par 5 : 500 mL
- } Solutions du kit Pierce (voir références p.176)

- Fixateur photo dilué par 5 : 500 mL

Protocole (pour 1 membrane)

- Laver la membrane 5 min dans 40 mL de PBS-Tween 0,1 %
- Incuber dans 40 mL de PBS-Tween 0,1 % à 5 % de BSA 1 nuit à 4 °C
- Laver 3 x 10 min dans 40 mL de PBS-Tween 0,1 %
- Incuber 1 h dans une solution de Streptavidine-HRP préparée de la manière suivante :

	PBS-Tween 0,1 %	BSA	Streptavidine-HRP 1 mg/mL
Echantillons photomarqués avec ITB₅-P₂	40 mL	400 mg	10 µL
Echantillons photomarqués avec ITB₅-P₃	40 mL	400 mg	40 µL

- Laver 3 x 10 min (échantillons photomarqués avec ITB₅-P₂) ou 2 x 5 min (échantillons photomarqués avec ITB₅-P₃) avec 40 mL de PBS-Tween 0,1 %

Chambre noire :

- Préparer dans une boîte 4 mL d'une solution peroxyde d'hydrogène/luminol 50/50
- Transférer la membrane dans la boîte et l'imbiber de solution à l'aide d'une micropipette
- Egoutter la membrane sur du papier absorbant
- Envelopper la membrane dans une feuille de papier Saran
- Lisser la feuille à la main de sorte à éliminer les bulles d'air
- Placer le tout dans une cassette de révélation
- Eteindre la lumière et allumer la lumière rouge
- Sortir les films photo de leur emballage
- Recouvrir la membrane d'un film photographique (CL-XPosure Film, Pierce)
- Fermer la cassette et compter entre 25 et 40 s
- Récupérer le film en faisant attention à ne pas le faire glisser
- Immerger dans le révélateur et agiter doucement jusqu'à apparition des bandes
- Rincer à l'eau
- Immerger dans le fixateur quelques minutes
- Ranger les films photographiques avant de rallumer la lumière
- Suspendre le film et laisser sécher ~24 h

Colorations de gels SDS-PAGE

Plusieurs protocoles de coloration de gel ont été testés au cours du projet. La coloration au nitrate d'argent détaillée ici a permis de visualiser le photomarquage spécifique d'une protéine par **ITB₅-P₁** et la coloration au bleu de Coomassie est celle qui a permis d'identifier cette protéine après son photomarquage par **ITB₅-P₂**.

Remarque : si les échantillons sont destinés à être analysés en spectrométrie de masse, réaliser ces différentes étapes en portant gants, charlotte et masque et ne travailler qu'avec du matériel parfaitement propre (nettoyé à l'éthanol ou n'ayant jamais été manipulé à mains nues) afin d'éviter les contaminations par des protéines humaines.

Coloration au nitrate d'argent :

Solutions (préparées avec de l'eau)

- Solution F₁ : EtOH 50 %, Acide acétique 5 % (100 mL)
- Solution F₂ : EtOH 50 % (100 mL)
- Solution TS : Na₂S₂O₃ 0,02 % (100 mL)
- Solution Ag : AgNO₃ 0,1 % (100 mL)
- Solution cNa : Na₂CO₃ 2 %, Formaldéhyde 0,04 % (200 mL)
- Solution Ac₅ : acide acétique 5 % (100 mL)
- Solution Ac₁ : acide acétique 1 % (50 mL)

Les solutions F₁, F₂, Ac₅ et Ac₁ peuvent être conservées 3 semaines à température ambiante. Les solutions TS, Ag et cNa sont préparées le jour même.

Protocole (pour un gel)

- Eliminer les dents du gel de concentration au moyen d'un espaceur
- Fixer les protéines 20 min dans F₁ puis 10 min dans F₂
- Laver le gel 10 min dans de l'eau
- Immerger le gel 1 min dans TS
- Laver 2 x 1 min dans de l'eau
- Colorer 20 min dans Ag
- Laver rapidement dans de l'eau (2 x 5 s)
- Immerger une première fois le gel dans cNa
- Eliminer la solution lorsqu'elle devient jaune (quelques secondes)
- Terminer la révélation dans une nouvelle solution de cNa (quelques minutes)
- Stopper la coloration par incubation 30 min dans Ac₅
- Conserver le gel dans Ac₁ à 0 °C (conservation possible jusqu'à 3 mois)

Remarque : Lors de la coloration, toucher le gel au minimum et toujours au même endroit afin de ne pas laisser trop de traces de doigts.

Coloration au Blue Silver⁹ :

Solutions (préparées avec de l'eau)

- Solution de fixation : EtOH 40 %, acide acétique 10 % (100 mL)
- Solution de coloration : sulfate d'ammonium 10 %, acide orthophosphorique 10 %, EtOH 20 %, Brilliant Blue G 0,12 % (100 mL)

- Solution destain I : EtOH 25 %, acide acétique 10 % (100 mL)
- Solution destain II : EtOH 25 % (300 mL)
- Solution de conservation : sulfate d'ammonium 25 % (50 mL)

Toutes ces solutions peuvent être conservées 3 semaines à température ambiante. La solution de coloration est conservée à l'abri de la lumière et ne peut être utilisée qu'une seule fois.

Protocole (pour un gel)

- Eliminer les dents du gel de concentration au moyen d'un espaceur
- Fixer les protéines 30 min dans la solution de fixation
- Incuber le gel 2 h dans la solution de coloration
- Décolorer 1 min avec la solution destain I
- Laver 1 min avec la solution destain II
- Décolorer 30 min dans la solution destain II
- Immerger le gel dans la solution de conservation
- Conserver à 0 °C (quelques jours)

Préparation des échantillons à l'analyse par spectrométrie de masse

Une fois colorés, les gels sont déposés sur une plaque de verre nettoyée au savon et à l'éthanol. Les bandes d'intérêt sont excisées au moyen d'un scalpel, découpées en morceaux et transférées dans des tubes Eppendorf d'1,5 mL (étape à réaliser impérativement avec des gants, une charlotte et un masque et en changeant de scalpel pour chaque bande à exciser). Etant donné les intensités observées, l'utilisation d'un dispositif d'éclairage, placé sous la plaque de verre, peut être nécessaire. Les morceaux de gel récupérés sont traités selon les protocoles décrits ci-dessous.

Trypsinolyse in-gel :

Solutions (préparées avec de l'eau)

- Solution de NH_4HCO_3 100 mM
- Solution de NH_4HCO_3 50 mM / acétonitrile 50 %
- Acétonitrile 100 %
- Solution de trypsine à 400 ng/ μL dans de l'HCl 1 mM à 0 °C

Préparation des échantillons à la trypsinolyse

gels colorés au nitrate d'argent

- Ajouter dans les tubes Eppendorf 200 μL de NH_4HCO_3 100 mM
- Vortexer fortement 10 s
- Centrifuger 10 s puis retirer le surnageant

} 3×

- Ajouter 200 μL de NH_4HCO_3 50 mM / acétonitrile 50 %
- Vortexer fortement 10s
- Centrifuger 10 s puis retirer le surnageant

} 2×

- Fermer les tubes Eppendorf avec les couvercles d'autres tubes
- Percer ces couvercles avec une aiguille
- Lyophiliser les bouts de gels 1 h puis retirer les couvercles percés

gels colorés au Blue Silver

- Ajouter dans les tubes Eppendorf 200 μL de NH_4HCO_3 50 mM / acétonitrile 50 %
- Vortexer puis centrifuger 10 s
- Incuber 10 min puis retirer le surnageant

} 3×

- Recommencer 1× avec 200 μL d'acétonitrile 100 %

- Ajouter 200 μL de NH_4HCO_3 100 mM
- Vortexer puis centrifuger 10 s
- Incuber 10 min
- Ajouter 200 μL d'acétonitrile 100 %
- Vortexer puis centrifuger 10 s
- Incuber 10 min puis retirer le surnageant

- Fermer les tubes Eppendorf avec les couvercles d'autres tubes
- Percer ces couvercles avec une aiguille
- Lyophiliser les bouts de gels 5 min puis retirer les couvercles percés

Trypsinolyse (3 échantillons)

- Additionner 3,6 μL de trypsine à 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ à 120 μL de NH_4HCO_3 100 mM refroidi à 0 °C
- Recouvrir rapidement les bouts de gel avec 20 à 40 μL de cette solution
- Fermer les tubes « Eppendorf » et entourer les bouchons de parafilm
- Agiter dans le thermomixeur Eppendorf à 37 °C et 450 RPM pendant une nuit
- Laisser revenir à température ambiante
- Utiliser tel quel pour une extraction de peptides
- Ajouter 2 μL de TFA 50 % pour un dessalage du digestat sur colonne ZIP-TIP

Extraction de peptides :

Solutions (préparées avec de l'eau)

- Solution de NH_4HCO_3 100 mM
- Acétonitrile 100 %
- Acide formique 5 %

Protocole (pour un échantillon)

- Transférer le digestat dans un tube Eppendorf d'1,5 mL
- Conserver le cône et le réutiliser pour chaque transfert de surnageant

- Immerger les bouts de gel dans 100 μL d'acétonitrile 100 %
- Incuber 10 min puis centrifuger 10 s
- Transférer le surnageant dans l'Eppendorf d'1,5 mL

- Immerger les bouts de gel dans 100 μL de NH_4HCO_3 100 mM
- Incuber 10 min
- Ajouter à la solution 100 μL d'acétonitrile 100 %
- Incuber 10 min puis centrifuger 10 s
- Transférer le surnageant dans l'Eppendorf d'1,5 mL
- Répéter l'opération 2 fois en remplaçant la solution de NH_4HCO_3 100 mM par de l'acide formique 5 %

- Congeler le tube contenant la solution de peptides dans de l'azote liquide
- Fermer le tube Eppendorf avec le couvercle d'un autre tube
- Percer ce couvercle avec une aiguille
- Lyophiliser complètement la solution de peptides
- Prendre dans 40 μL de TFA 0,1 % pour un dessalage ou conserver à $-20\text{ }^\circ\text{C}$

Dessalage sur colonne ZIP-TIP C18¹⁰ :

Solutions (préparées avec de l'eau milli Q)

- Acétonitrile 100 %
- TFA 0,1 %
- Solution d'acétonitrile/TFA 0,1 % 70/30

Protocole (pour un échantillon)

- Plier à angle droit l'extrémité d'un cône epT.I.P.S GELoader de 20 μL (Eppendorf)
- Vortexer fortement la résine C18 en solution dans de l'acétonitrile et en prélever 1 μL
- Déposer la résine dans le cône et ajouter 40 μL d'acétonitrile
- Pousser la suspension jusqu'à la pliure par surpression grâce à une seringue au bout de laquelle un cône tronqué a été adapté.
- Recommencer jusqu'à avoir environ 0,3 cm de colonne
- Equilibrer la colonne avec 40 μL de TFA 0,1 %
- Déposer l'échantillon sur la colonne et récupérer l'éluat dans un tube Eppendorf de 0,5 mL
- Ajouter 40 μL de TFA 0,1 % dans l'Eppendorf d'origine de l'échantillon
- Vortexer fortement puis centrifuger 10 s
- Déposer sur la colonne et récupérer l'éluat dans le même tube Eppendorf de 0,5 mL
- Laver la colonne avec 40 μL de TFA 0,1 %
- Eluer les peptides directement sur une cible MALDI avec $2 \times 0,5\text{ } \mu\text{L}$ d'acétonitrile/TFA 0,1 % 70/30, ajouter sur le spot 0,5 μL de matrice HCCA puis laisser sécher

Spectrométrie de masse MALDI-TOF et interrogation des bases de données

Génération des spectres MS et MS-MS

Les échantillons sont déposés sur une cible MALDI selon la méthode de la goutte sèche. Cette méthode consiste à mélanger 0,5 µL d'analyte à 0,5 µL de matrice ; dans notre cas de l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique à 10 mg/mL dans un mélange eau / acétonitrile / TFA : 50/50/0,1. Cette matrice est ionisée puis sublimée grâce à un laser UV. Elle permet de désorber puis de protoner les molécules de l'analyte.

Les analyses sont toutes réalisées en mode réflecteur dans une gamme de masse allant de $m/z = 800$ à $m/z = 4000$ en fixant la Focus Mass (masse à laquelle on désire avoir la meilleure résolution) à 2000 et les analyses MS-MS sont effectuées en mode PSD. Les différents paramètres utilisés pour générés les spectres sont fixés de la manière suivante :

- Intensité du laser : entre 2800 et 3000 (MS), entre 3000 et 4000 (MS-MS)
- Nombre de tirs : 1000 (MS), entre 2500 et 10 000 (MS-MS)
- Voltage d'accélération : 25 kV
- Détection des ions en mode positif

Les spectres sont générés manuellement à l'aide du logiciel 4000 Series Explorer™ (Applied Biosystems) puis analysés grâce au logiciel Data Explorer® (Applied Biosystems). La calibration des spectres est réalisée grâce aux calibrants internes que représentent les pics d'autolyse de la trypsine, pics systématiquement observés dans cette étude du fait de la faible quantité de protéine d'intérêt.

Interrogation des bases de données

L'identification des protéines a été réalisée par confrontation des données MS et MS-MS aux entrées *All entries* et *Rattus* de la base de données Swissprot en utilisant le logiciel Mascot et en autorisant un clivage omis par la trypsine. L'oxydation des méthionines et des tryptophanes a parfois été entrée comme modification variable et une tolérance de masse de 50 ppm a été permise pour l'identification. Les interrogations ont été réalisées selon les cas sur les 50 plus grands pics, les 100 plus grands pics ou sur la liste complète des pics présents dans les spectres. Pour chacune de ces listes, les masses correspondant aux peptides d'autoprotéolyse de la trypsine ont été retirés avant de lancer l'interrogation ainsi que les masses reconnues comme appartenant à des kératines.

Chacune des protéines suggérées par le logiciel MASCOT suite à l'interrogation des bases de données est associée à un score qui représente la probabilité que cette protéine corresponde effectivement à la protéine présente dans l'échantillon étudié. Si l'interrogation a été effectuée avec des données MS, le score doit être supérieur à 50 pour être considéré comme significatif. Si elle a été effectuée avec des données MS-MS, il doit être supérieur à 20.

Bibliographie

- ¹ Delfino J.M., Schreiber S.L., Richards F.M., Design, synthesis, and properties of a photoactivatable membrane-spanning phospholipidic probe, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 3458-3474.
- ² Wang T.P., Chiou Y.J., Chen Y., Wang E.C., Hwang L.C., Chen B.H., Chen Y.H., Ko C.H., Versatile phosphoramidation reactions for nucleic acid conjugations with peptides, proteins, chromophores, and biotin derivatives, *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21*, 1642-1655.
- ³ Lee J.C., Yuk J.Y., Cho S.H., Facile synthesis of alkyl phenyl ethers using cesium carbonate, *Synth. Commun.*, **1995**, *25*, 1367-1370.
- ⁴ Hofmann K., Titus G., Montibeller J.A., Finn F.M., Avidin binding of carboxyl-substituted biotin and analogues, *Biochemistry*, **1982**, *21*, 978-984.
- ⁵ Verhelst S.H.L., Fonović M., Bogyo M., A mild chemically cleavable linker system for functional proteomic applications, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 1284-1286.
- ⁶ Jiang W., Guan J., Macielag M.J., Zhang S., Qiu Y., Kraft P., Bhattacharjee S., John T.M., Haynes-Johnson D., Lundeen S., Sui Z., Pyrroloquinolone PDE5 inhibitors with improved pharmaceutical profiles for clinical studies on erectile dysfunction, *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 2126-2133.
- ⁷ Seo J.W., Srisook E., Son H.J., Hwang O., Cha Y., Chi D.Y., Syntheses of tetrahydroisoquinoline derivatives that inhibit NO production in activated BV-2 microglial cells, *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, *43*, 1160-1170.
- ⁸ Jespersen S., Chaurand P., Van Trien F.J., Spengler B., Van Der Greef J., Direct sequencing of neuropeptides in biological tissue by MALDI-PSD mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 660-666.
- ⁹ Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G.M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P.G., Blue silver : a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis, *Electrophoresis*, **2004**, *25*, 1327-1333.
- ¹⁰ Gobom J., Nordhoff E., Mirgorodskaya E., Ekman R., Roepstorff P., Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *J. Mass. Spectrom.*, **1999**, *34*, 105-116.

Annexes

A nonradioactive iodide uptake assay for sodium iodide symporter function

Fanny Waltz, Lucie Pillette, Yves Ambroise

Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut de Biologie et Technologies de Saclay (iBiTecS), Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, Gif-sur-Yvette F-91191, France

Keywords :

Sodium iodide symporter

Colorimetric assay

Sandell–Kolthoff

Cell-based assay

Iodide uptake

FRTL5 cells

Abstract :

The standard assay for sodium iodide symporter (NIS) function is based on the measurement of radioiodide uptake (^{125}I) in NIS-expressing cells. However, cost and safety issues have limited the method from being used widely. Here we describe a simple spectrophotometric assay for the determination of iodide accumulation in rat thyroid-derived cells (FRTL5) based on the catalytic effect of iodide on the reduction of yellow cerium(IV) to colorless cerium(III) in the presence of arsenious acid (Sandell–Kolthoff reaction). The assay is fast and highly reproducible with a Z₀ factor of 0.70. This procedure allows the screening of more than 800 samples per day and can easily be adapted to robotic systems for high-throughput screening of NIS function modulators. Using this method, the potency of several known inhibitors of NIS function was evaluated in a single day with high accuracy and reliability. Measured IC₅₀ values were essentially identical to those determined using Na ^{125}I .

Analytical Biochemistry, **2010**, 396, 91–95.

Synthesis and Structure–Activity Relationships of a Class of Sodium Iodide Symporter Function Inhibitors

Fanny Waltz, Lucie Pillette, Elodie Verhaeghe, Yves Ambroise
Commissariat à l’Energie Atomique (CEA), Institut de Biologie et Technologies de Saclay (iBiTecS), Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, Gif-sur-Yvette F-91191, France

Keywords :

biological activity
drug designs
sodium iodide symporteur
structure–activity relationships
thyroid

Abstract :

Iodide capture plays a central role in many thyroid pathophysiological conditions. Here, we report the synthesis and biological evaluation of 184 *N*-benzylanilines as iodide transport inhibitors in thyroid-derived cells. Important structure–activity relationships were elucidated, and two compounds with enhanced potency were identified. These new bioactive molecules are valuable pharmacological tools to further understand how iodide is captured in the thyroid, and the SAR data may prove useful for the development of novel antithyroid agents.

ChemMedChem, **2011**, *6*, 1775-1777.