



THESE

Présentée

à l'Université de Strasbourg

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Chimie et Biologie

par

Benoît HILBOLD

Nouveaux lipides bicaténaires polyfonctionnels.

Enjeux synthétiques et analytiques.

Applications biochimiques.

Soutenue le 9 décembre 2011 devant la commission d'examen :

Professeur	Jean-Claude Gesquière	Rapporteur
Docteur	Aurélien Roux	Rapporteur
Professeur	Laurence Ehret-Sabatier	Examineur
Professeur	Line Bourel-Bonnet	Co-directeur de thèse
Docteur	Eve-Isabelle Pécheur	Co-directeur de thèse



THESE

Présentée

à l'Université de Strasbourg

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Chimie

par

Benoît HILBOLD

Nouveaux lipides bicaténaires polyfonctionnels.

Enjeux synthétiques et analytiques.

Applications biochimique.

Soutenue le 9 décembre 2011 devant la commission d'examen :

Professeur	Jean-Claude Gesquière	Rapporteur
Docteur	Aurélien Roux	Rapporteur
Professeur	Laurence Ehret-Sabatier	Examineur
Professeur	Line Bourel-Bonnet	Co-directeur de thèse
Docteur	Eve-Isabelle Pécheur	Co-directeur de thèse

*« à ma femme,
à mes parents... »*

Remerciements

Les différents travaux décrits dans ce manuscrit ont été réalisés au sein de l'équipe de Biovectorologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg sous la direction du Pr. Line Bourel-Bonnet et au sein de l'équipe RMN et virus de l'hépatite C dirigée par le Dr. François Penin à l'IBCP de Lyon sous la direction du Dr. Eve-Isabelle Pécheur. Je tiens à les remercier tous les trois très chaleureusement, et plus particulièrement Eve et Line de m'avoir accueilli et permis de travailler au sein de leur laboratoire pendant ces trois années. Line, Eve merci de m'avoir fait confiance dans mes choix, merci de m'avoir formé et transmis votre passion pour la recherche. Merci pour votre encadrement et pour les nombreuses discussions qui ont permis l'avancement du projet, merci de m'avoir soutenu dans les moments de doute. Eve, merci de m'avoir initié à l'étude et à la manipulation de biomatériaux, Line merci pour ton engagement sur les différents sujets développés durant ces trois années et pour la révision judicieuse de mon manuscrit. Merci à vous deux de m'avoir permis de réaliser ce projet, cette thèse qui me tenait à cœur depuis plusieurs années.

J'exprime toute ma gratitude au Dr. Luc Lebeau, directeur de l'UMR 7199, au Dr. Benoit Frisch, directeur de l'équipe de Biovectorologie de Strasbourg et au Pr. Gilbert Deléage, directeur de l'IBCP de Lyon de m'avoir intégré au sein de leur unité et sans qui rien n'aurait été possible.

Je tiens également à remercier tous les collaborateurs que j'ai pu rencontrer durant cette thèse et qui m'ont apporté un peu de leur savoir, de leur savoir-faire et de leur convivialité :

- merci à toute l'équipe du Dr. François Penin : Marie, Aurélie, Julie, Marie-Laure, Carole, Birgit, Jenny, Roland et Mihayl et tous les autres que j'ai croisés dans les couloirs pour leurs conseils et leurs discussions scientifiques mais aussi pour leur accueil chaleureux et tous les bons moments passés à Lyon,

- merci à l'équipe du Dr. Attilio Di Pietro de l'IBCP de Lyon et plus particulièrement au Dr. Pierre Falson, au Dr. Frédéric Huché et au Dr. Moez Rhimi pour m'avoir fourni la BmrA et pour leurs conseils techniques,
- merci au Dr. Frédéric Halgand de m'avoir accueilli à Marseille et à Jean-Marc Strub pour avoir analysé mes protéines, m'avoir conseillé et expliqué les techniques existantes en spectrométrie de masse.
- merci au Service Commun d'Analyse de la Faculté de Pharmacie, Patrick Wehrung, Cyril Antheaume et Pascale Buisine pour les analyses de mes molécules.

Je remercie également tous les permanents, thésards et stagiaires des différentes équipes de la faculté de Pharmacie pour leurs discussions et conseils scientifiques et les différents moments partagés autour d'un repas, d'une pause café...

Un grand merci à Christophe Ehret, Nicolas Zill et à tous les autres pour les moments conviviaux et scientifiques, et pour les parties de Uno partagées à la cafété de Pharma.

Une "spéciale dédicace" pour mon collègue et ami Jean-Sébastien Thomann, à sa femme ainsi qu'à son petit Willi, bon vent...

Merci aussi à mes amis et à mes amis musiciens pour tous les moments de détente durant cette thèse.

Pour finir mille mercis à ma femme Stéphanie pour son soutien inconditionnel et sa confiance, quelle magnifique et heureuse rencontre : vive la science.

Et merci à sa famille et à ma famille pour m'avoir soutenu durant ces trois années et m'avoir permis d'accomplir ce challenge.

Abréviations

5,6-CTMR	5,6-carboxytétraméthylrhodamine
9-BBN	9-Borabicyclo[3.3.1]nonane
ACN	acétonitrile
AcOEt	acétate d'éthyle
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
Biotine-SS-COOH	acide 3-[2-N-(biotinyl)aminoéthylthio]propanoïque
BmrA	<i>Bacillus</i> multidrug resistance ATP
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl-
Boc-L-Dpr-OH	acide N-alpha-t-butyloxycarbonyl-L-2,3-diaminopropionique
bR	bactériorhodopsine
BSA	bovin serum albumin
nBuLi	nButyl lithium
CES	chromatographie d'exclusion stérique
CCM	chromatographie sur couche mince
CDCl ₃	chloroforme deutéré
Chol	cholestérol
Da/kDa	dalton/kilo dalton
DAG	diacylglycérole
DIBAL	hydrure de diisobutylaluminium
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DOG	dioléylglycérole
ESI	electrospray ionisation
FC 12	dodécylphosphocholine
GCMS	gaz chromatography mass spectrometry
GE	gel d'électrophorèse
Glu-C V8	glutamyl endopeptidase
Hepes	acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N-2-éthanesulfonate
HPLC	chromatographie liquide haute performance
HRMS	spectrométrie de masse à haute résolution
Kb	kilo paires de base
LC	liquid chromatography
LC-MS	liquid chromatography mass spectrometry
LiAlH ₄	tétrahydruroaluminat de lithium
MALDI-TOF	matrix – assisted laser desorption/ionisation time of flight
MeOH	méthanol
NS2	protéine non-structurale 2 du virus de l'Hépatite C
NTA	acide nitrilotriacétique
OMS	organisation mondiale de la santé (WHO)
PBS	phosphate buffered saline
PEG	polyéthylèneglycole
PM	poids moléculaire
ppm	partie par million
PyBOP	benzotriazole-1-yl-oxy-trispyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
R ₁₈	chlorure d'octadécylrhodamine
Rdt	rendement
Rf	rapport frontal
RMN	résonance magnétique nucléaire

RP-HPLC	chromatographie liquide à haute performance en phase inverse
SDS	sodium dodécylsulfate
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SLR	sonde lipidique de référence
SRAS	syndrome respiratoire aigu sévère
SUV	small unilamellar vesicles
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
THP	tétrahydropyrane
TIPS	triisopropylsilane
TMS	tétraméthylsilane
TPCK	N-tosyl-L-phénylalanine chlorométhylcétone
VHB	virus de l'hépatite B
VHC	virus de l'hépatite C
VHC _{pp}	pseudo-particule du virus de l'hépatite C
v/v	volume à volume

Sommaire

REMERCIEMENTS	I
ABREVIATIONS	V
SOMMAIRE	IX
PREAMBULE	1
I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	7
1. Les virus	9
1.1. Les caractéristiques d'un virus (définition de Lwoff)	9
1.2. Structure générale d'un virus	11
1.2.1) <i>Le génome</i>	11
1.2.2) <i>La capside</i>	11
1.3. Le cycle de réplication virale	12
1.3.1) <i>L'attachement ou adsorption</i>	13
1.3.2) <i>La pénétration</i>	13
<i>a/ pénétration directe du génome par translocation</i>	13
<i>b/ par endocytose seule</i>	13
<i>c/ par fusion avec la membrane plasmique</i>	14
<i>d/ par endocytose puis fusion avec la membrane de l'endosome</i>	14
1.3.3) <i>La décapsidation</i>	15
1.3.4) <i>La réplication</i>	15
<i>a/ cas des virus à ADN</i>	16
<i>b/ cas des virus à ARN</i>	17
1.3.5) <i>L'assemblage et la maturation</i>	17
1.3.6) <i>La libération</i>	18
2. La fusion virale	18
2.1. Les protéines de fusion virale	19
2.1.1) <i>Les protéines de fusion de classe I</i>	19
2.1.2) <i>Les protéines de fusion de classe II</i>	20
2.1.3) <i>Les protéines de fusion de classe III</i>	21
2.2. Le peptide de fusion	21
2.3. Les étapes de la fusion virale	22
3. Le concept du projet	24
4. Le virus de l'hépatite C	26
5. Le virus de l'hépatite B	30
6. Les protéines modèles utilisées	33
6.1. La bactériorhodopsine (bR)	33
6.2. La BmrA	35
6.3. Protéine NonStructurale 2 (NS2) du virus de l'Hépatite C	37
7. Le marquage d'affinité	39
7.1. Le photomarquage d'affinité	40
7.1.1) <i>Les premiers exemples d'applications du photomarquage d'affinité</i>	42
7.1.2) <i>Caractéristiques du réactif de photomarquage</i>	43

7.2. Le Photomarquage hydrophobe de domaines protéiques membranaires	44
7.3. Chimie des carbènes et des nitrènes	46
7.3.1) Généralités	46
a/ Les azotures d'aryle	48
b/ Les azotures d'acyle	49
c/ Les azotures d'alkyle	49
7.3.3) Les carbènes	50
a/ Les composés diazo	50
b/ Les diazirines	51
7.4. Les benzophénones	52
7.4.1) Mécanisme d'activation – photoréduction du groupement carbonyle	53
7.5. Bilan	56
II. CONCEPTION ET SYNTHÈSE DES SONDÉS LIPIDIQUES	59
1. Conception générale d'une famille de sondes lipidiques	61
2. Conception et synthèse de la sonde lipidique de référence	62
2.1. La plateforme liaison (PFL)	63
2.2. Le fluorophore	66
2.3. Le dérivé photoactivable : synthèse de l'acide 6-(4-(4-n-hexyl benzoyl)phényl)hexanoïque, C ₆ -BP-C ₅ -COOH (1)	67
2.4. Ordre d'introduction des fonctionnalités de la sonde sur la plateforme	68
2.5. Synthèse de la sonde lipidique de référence Rhod-Dpr(CO-C ₅ -BP C ₆)-NH-C ₁₆ H ₃₃ (5)	69
3. Synthèse d'analogues	71
3.1. Synthèse de sondes lipidiques fluorescentes avec un groupement photoactivable à distance variable	71
3.1.1) Synthèse des acides gras contenant le groupement benzophénone	72
a/ Synthèse de l'acide 11-(4-(4-méthylbenzoyl)phényl)undécanoïque : C ₁ -BP-C ₁₀ -COOH (9)	72
b/ Synthèse de l'acide 2-(4-((4-décylphényl)(hydroxy)méthyl)phényl) acétique : C ₁₀ -BP-C ₁ -COOH (18)	77
3.1.2) Synthèse de deux nouvelles sondes lipidiques	84
3.2. Bilan	85
3.3. Synthèse d'une sonde lipidique photoactivable biotinyllée	87
3.4. Synthèse de sondes lipidiques fluorescentes avec différentes plateformes de liaison	88
4. Partie expérimentale chimique	90
4.1. Indications générales	90
4.1.1) Solvants et réactifs	90
4.1.2) Matériels et méthodes	90
a/ Chromatographie	90
b/ Spectroscopie Infrarouge	91
c/ Spectroscopie de masse	91
d/ Point de fusion	92
4.2. Synthèse de la sonde lipidique de référence	93
4.3. Synthèse des acides gras contenant un groupement benzophénone	97
4.4. Synthèse des sondes lipidiques à partir des acides gras 9 et 18	110
III. CARACTERISATION, DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION	121
1. Caractérisation de l'activité des sondes lipidiques	123

1.1. Etude de la fluorescence	123
1.2. Capacité de photomarquage des sondes lipidiques	126
1.2.1) Conditions d'irradiation	126
1.2.2) Etude du photomarquage de la sonde lipidique de référence	126
a/ en solution organique	126
b/ sur les protéines membranaires	127
1.3. Optimisation des conditions opératoires	129
1.3.1) Influence du rapport protéine/sonde lipidique	129
1.3.2) Influence du temps d'incubation entre la BmrA et la sonde lipidique	131
1.3.3) Influence du temps d'irradiation entre la BmrA et la sonde lipidique	132
1.4. Etude du photomarquage des sondes lipidiques fluorescentes sur différentes protéines	133
2. Développement d'une méthode d'étude et d'identification de protéines	137
2.1. Introduction	137
2.2. Approche middle-down	142
2.2.1) Digestion enzymatique limitée des protéines	142
a/ Cas n° 1 : la BmrA	143
b/ Cas n° 2 : la bactériorhodopsine (bR)	143
c/ Cas n° 3 : NS2, une protéine de VHC	145
2.2.2) Purification et identification	146
a/ Purification et identification par SDS-PAGE : digestion trypsique 'in-gel'	146
b/ Purification et identification 'en solution'	150
2.3. Approche "top-down" LC-ESI et MALDI-TOF	160
2.3.1) Analyse de la bR en LC-ESI et MALDI-TOF	160
2.3.2) Analyse de NS2 en LC-ESI et MALDI-TOF	161
3. Optimisation du procédé de photomarquage	163
3.1. Augmentation du rendement de photomarquage	163
3.1.1) Résultats	164
3.1.2) Discussion	166
3.2. Double purification de l'adduit de photomarquage	168
4. Partie expérimentale biochimique	172
4.1. Molécules utilisées	172
4.2. Formation des liposomes	172
4.3. Fluorimètre	173
4.4. Mesure de la fluorescence	173
4.5. Formation des micelles de détergents contenant les lipides outils	173
4.6. Irradiation	174
4.7. Digestion protéolytique des protéines membranaires photomarquées	174
4.8. Analyse des gels	175
4.9. Analyse HPLC	175
4.10. Purification de la protéine membranaire photomarquée dans un tampon	175
4.11. Spectrométrie de masse	176
4.12. Double purification	177
IV PROJETS ANNEXES	179
1. "Click Chemistry" sans cuivre sur liposome : un couplage pH-indépendant	181
1.1. Synthèse de l'ancre DOGPEG ₄ Cyclooctyne	183
1.2. Synthèse de la sonde N ₃ PEG ₃ CTMR	184
1.3. Couplage de la sonde fluorescente à la surface des liposomes	185
1.3.1) Quantification de la quantité de sonde fluorescente ayant réagi avec l'ancre	185

1.3.2) <i>Influence de la concentration de l'ancre lipidique dans les liposomes après 24 h de couplage</i>	187
1.3.3) <i>Influence du pH sur la vitesse de réaction de couplage</i>	188
1.4. Partie expérimentale	190
2. Synthèse de dérivés fluorescents de type diacylglycérole	194
2.1. Introduction	194
2.2. Résultats et discussion	196
2.3. Partie expérimentale	199
V. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	205

Préambule

De nouvelles souches de microorganismes virulents sont encore découvertes de nos jours et d'autres n'ont toujours pas de traitement efficace. Ces pathogènes notamment représentés par les virus, potentiellement mortels et dont la transmission de l'animal à l'homme ou de l'homme à l'homme est difficilement contrôlable sont de véritables menaces pour la santé humaine à travers le monde (tableau 1).

Famille	Nom	Découverte	Traitement	Taux de létalité	
<i>Coronaviridae</i>	SRAS [*] -CoV	2002	Aucun traitement ni vaccin spécifique	11%	Epidémie mondiale en 2003, 8422 cas recensés dont 916 mortels
<i>Paramyxoviridae</i>	Nipah	1999	Aucun traitement ni vaccin disponible	40 à 75 %	
	Hendra	1994	Vaccin en cours de développement	50%	
<i>Filoviridae</i>	Fièvre hémorragique à virus Ebola	1976	Aucun traitement ni vaccin spécifique	25 à 90 %	1850 cas recensés dont 1200 mortels
	Fièvre hémorragique de Marburg	1967	Aucun traitement ni vaccin spécifique	> 80 %	562 cas recensés dont 469 mortels
<i>Arénaviridae</i>	Fièvre de Lassa	1969	Traitement à l'aide de la ribavirine	1%	300000 à 500000 cas par an dont 5000 mortels en Afrique de l'Ouest
	Junin	1950	Traitement à l'aide de sérums de patients guéris	10 à 30 % si non traité, 1 % si traité	

Tableau 1 : Exemple de virus pathogènes, source : www.who.int/fr/ consultée 07/09/2011. *Syndrome Respiratoire Aigu Sévère

Or, ces virus sont insuffisamment décrits tant structurellement que fonctionnellement. La découverte de thérapies anti-infectieuses nouvelles et efficaces est absolument nécessaire dans ce contexte, et implique une définition structurale la plus détaillée possible des cibles potentielles. Malheureusement ces virus sont extrêmement difficiles à étudier du fait qu'ils doivent être manipulés dans des laboratoires de niveau de sécurité 3 ou 4. Malgré ces difficultés, la compréhension de l'interaction des protéines d'enveloppe de tels pathogènes avec les membranes cellulaires-cibles pendant l'infection est essentielle pour mieux caractériser le processus d'infection et essayer de

l'inhiber. Ces études sont indispensables pour la conception de nouveaux médicaments antiviraux.

Certaines de ces protéines d'enveloppe, les protéines de fusion virale, sont plus particulièrement impliquées dans l'étape de "fusion virale". Cette étape conduit à la libération du matériel génétique viral dans le cytoplasme de la cellule-cible. Deux éléments structurels, communs à toutes les protéines de fusion virale connues, jouent un rôle crucial lors de l'étape de fusion virale : le peptide de fusion virale et le domaine transmembranaire de la protéine de fusion virale.

La cartographie de ces régions-clés portées par la protéine de fusion virale est donc cruciale pour la compréhension des relations structure/fonction au cours du processus de fusion.

L'objectif de ce travail de thèse a été de concevoir et développer un nouvel outil et une nouvelle méthode pour l'identification de ces zones hydrophobes d'interaction, grâce à de nouvelles sondes lipidiques originales, photoactivables et fluorescentes, réalisant un marquage covalent de photoaffinité.

La première partie de ce manuscrit est une introduction bibliographique sur les virus, le marquage d'affinité et les protéines utilisées. Cette partie introduira aussi le concept à développer pour répondre à la problématique posée.

La deuxième partie de cette thèse expose les résultats obtenus. Le premier chapitre de cette partie décrit la conception et la synthèse des sondes lipidiques originales. Le deuxième chapitre est consacré à la caractérisation, à la vérification de la capacité de photomarquage des nouvelles sondes lipidiques et au développement d'une méthode d'identification des zones hydrophobes de protéines. Le troisième chapitre développe de nouvelles pistes pour améliorer cette méthode d'identification.

Dans la troisième et dernière partie de ce manuscrit sont exposés deux projets annexes développés au cours de cette thèse qui ont en commun avec le sujet principal le développement de lipides bicaténaires polyfonctionnels. D'une part, la synthèse d'une sonde fluorescente permettant le suivi d'expériences de

nanobiophysique et d'autre part la synthèse d'une ancre lipidique fonctionnalisée en vue de développer une nouvelle méthode de bioconjugaison pH-indépendant à la surface de liposome par "click chemistry" sans cuivre y sont exposées. Dans les deux cas, il s'agit du développement d'outils originaux pour comprendre et reconstituer des phénomènes biologiques.

I. Introduction bibliographique

L'inhibition de l'infection virale par des moyens thérapeutiques implique la connaissance et la caractérisation détaillée du cycle de réplication du virus, de son entrée dans une cellule-cible à sa propagation. Chaque étape de l'infection virale peut être une cible potentielle pour développer de nouvelles stratégies antivirales.

1. Les virus

Les virus sont des micro-organismes pathogènes de taille variable. Les plus gros virus infectant l'homme ont une taille comprise entre 800 et 1000 nm pour les Mimivirus et certaines formes d'Ebola virus, les plus petits comme les *Parvoviridae* n'ont que 20 nm de diamètre. La notion de maladie virale remonte à la fin du XIXe siècle. Les virus ont été identifiés pour la première fois en 1892 par un biologiste russe Dmitry Ivanovsky comme étant des agents infectieux n'étant ni des bactéries, ni des champignons et ni des parasites. Le premier virus découvert fut celui de la mosaïque du tabac en 1898 par le chimiste Martinus Beijerinck. Mais c'est seulement après la seconde guerre mondiale avec le développement du microscope électronique que ces organismes microscopiques ont pu être observés. C'est en 1957 qu'une définition claire et moderne des virus fut énoncée par André Lwoff : *«Les virus sont infectieux et potentiellement pathogènes ; ce sont des entités nucléo-protéiques possédant un seul type nucléique ; ils sont reproduits par la cellule à partir de leur matériel génétique, ils sont incapables de croître et de se diviser ; ils sont dépourvus de système enzymatique de production d'énergie»*¹.

1.1. Les caractéristiques d'un virus (définition de Lwoff)

Les virus sont des entités très hétérogènes mais ils possèdent quatre caractères communs qui les distinguent des autres micro-organismes ou organismes vivants :

¹ J. M. Hureau, J. C. Nicolas, H. Agut, H. Peigue-Lafeuille (2003). Traité de virologie Médicale

- ils ne possèdent qu'un seul type d'acide nucléique à la fois : soit de l'ARN, soit de l'ADN. Ces deux molécules ne coexistent pas ensemble dans le virus, ce qui les distingue des cellules eucaryotes et procaryotes. L'acide nucléique viral porte l'intégralité de l'information génétique du virus,

- ils se multiplient uniquement à partir de leur matériel génétique par réplication de leur génome. Ils ne se multiplient pas par scissiparité (division binaire) comme chez les bactéries ou par mitose comme chez les cellules eucaryotes,

- ils présentent une structure particulière, appelée le virion,

- ils sont doués de parasitisme intracellulaire absolu. Ils ne peuvent se multiplier que grâce à une cellule-hôte vivante. Etant dépourvus de système enzymatique ou énergétique, les virus ne peuvent pas s'autorépliquer. Ils sont obligés de détourner le métabolisme cellulaire de la cellule qu'ils parasitent pour se multiplier.

Tous les organismes vivants sont susceptibles d'être infectés par des virus mais les différents organismes ne sont pas infectés par les mêmes virus. A l'intérieur d'un organisme, les virus seront sélectifs d'un certain type cellulaire. Chaque virus ne peut infecter qu'un nombre restreint d'espèces : c'est le tropisme d'hôte. L'ensemble des cellules sensibles à un virus définit son spectre d'hôtes. Cette spécificité est due à la reconnaissance de récepteurs spécifiques de la cellule cible par le virus. Cette spécificité entre un virus et une cellule est nécessaire pour que le virus, une fois la cellule infectée, ait à disposition la bonne machinerie cellulaire pour pouvoir se répliquer.

1.2. Structure générale d'un virus

Toute particule virale est constituée d'au moins deux éléments constants et obligatoires (fig. I.1).

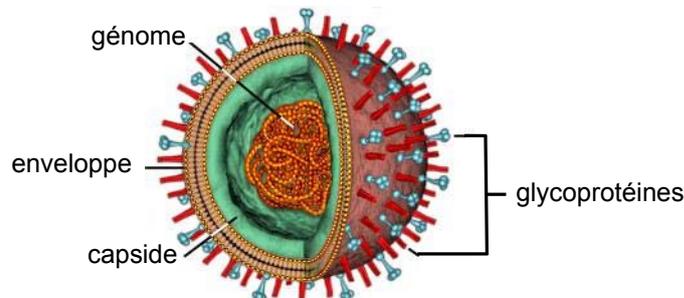


Figure I.1 : Structure générale d'un virus enveloppé d'après <http://micro.magnet.fsu.edu> consulté le 12/09/2011

1.2.1) Le génome

Le virus est toujours constitué d'un génome composé d'un filament d'acide nucléique qui est soit de l'ADN ou soit de l'ARN. Ce génome peut être monocaténaire (simple brin) ou bicaténaire (double brin). La taille du génome diffère selon le type de celui-ci de 3 à 300 kpb pour les virus à ADN et seulement 10 à 20 kpb pour les virus à ARN. Cet acide nucléique code pour les diverses protéines virales : des protéines de structure, des enzymes et des protéines de régulation.

1.2.2) La capsid

La capsid est une enveloppe protéique qui entoure le génome. Cette coque est capable d'assurer la protection et la survie du génome dans le milieu extérieur. Elle peut être de différentes géométries (tubulaire à symétrie hélicoïdale comme le virus de la mosaïque du tabac ou les myxovirus, icosaédrique à symétrie cubique comme les adenovirus) ou ne pas avoir de géométrie définie comme le virus de l'immunodéficience humaine. La structure compacte composée de la capsid entourant le génome est appelée nucléocapsid.

Il existe deux types de virus : les virus nus limités à leur simple nucléocapside comme les poliovirus et les virus enveloppés dont la nucléocapside est entourée d'une structure périphérique. Cette structure est une bicouche phospholipidique dérivée des membranes cellulaires provenant du cytoplasme, de l'appareil de Golgi ou du noyau selon les virus. Des glycoprotéines virales sont aussi ancrées dans la face externe de cette bicouche lipidique.

La particule virale, appelée virion, correspond au stade où tous les constituants structuraux du virus sont associés : elle correspond à la forme libre du virus.

1.3. Le cycle de réplication virale

Les virus sont des parasites intracellulaires absolus, ils ne se multiplient pas par division cellulaire car ce sont des entités acellulaires. La multiplication virale est donc un phénomène complexe au cours duquel le virus va détourner le métabolisme cellulaire de sa cellule hôte à son profit pour pouvoir se multiplier.

Le cycle de réplication de chaque espèce de virus est différent selon qu'il s'agit d'un virus à ADN ou d'un virus à ARN mais il peut être résumé, en général, en six étapes principales : l'attachement, la pénétration, la décapsidation, la réplication, l'assemblage et la maturation, la libération des virus (fig. I.2).

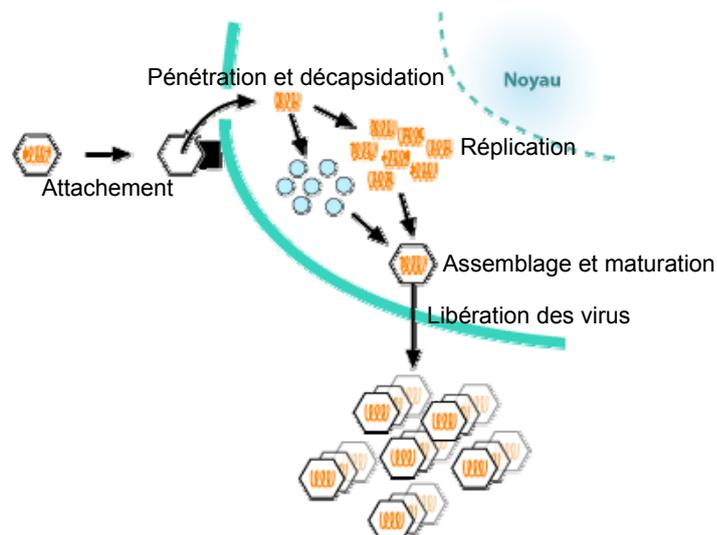


Figure I.2 : Cycle général de réplication d'un virus d'après les cours de virologie de l'Université Catholique de Louvain, http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/index.htm, consulté le 03/08/2011

1.3.1) L'attachement ou adsorption

La première étape du cycle de réplication consiste en l'attachement du virion à sa cellule-cible par liaison d'une protéine de surface du virus à des récepteurs spécifiques situés sur la membrane cytoplasmique de la cellule-hôte. Ce ligand viral est une glycoprotéine d'enveloppe dans le cas d'un virus enveloppé ou correspond à une conformation particulière des protéines de la capsidie dans le cas d'un virus nu.

1.3.2) La pénétration

Cette étape correspond à l'internalisation du virion dans la cellule hôte. Plusieurs mécanismes de pénétration du virus dans sa cellule hôte existent selon que celui-ci soit nu ou enveloppé :

a/ pénétration directe du génome par translocation

Ce procédé est plutôt rare, il est utilisé par une famille de virus nus : les picornavirus. Il consiste en une libération directe par "injection" du génome dans le cytoplasme de la cellule sans que la capsidie ne pénètre dans le cytoplasme de la cellule (fig. I.3 a).

b/ par endocytose seule

Ce mécanisme est aussi utilisé par les virus nus. Il consiste en l'endocytose du virion une fois celui-ci fixé sur son récepteur (fig. I.3 b). Le virion se retrouve alors dans une vésicule dans le cytoplasme de la cellule. La délivrance de la capsidie ou du génome dans le cytoplasme de la cellule se fait soit par franchissement de la membrane vésiculaire par le génome : comme dans le cas du virus de la poliomyélite (fig. I.3 b i), soit par rupture de l'endosome comme dans le cas des Rhinovirus (fig. I.3 b ii).

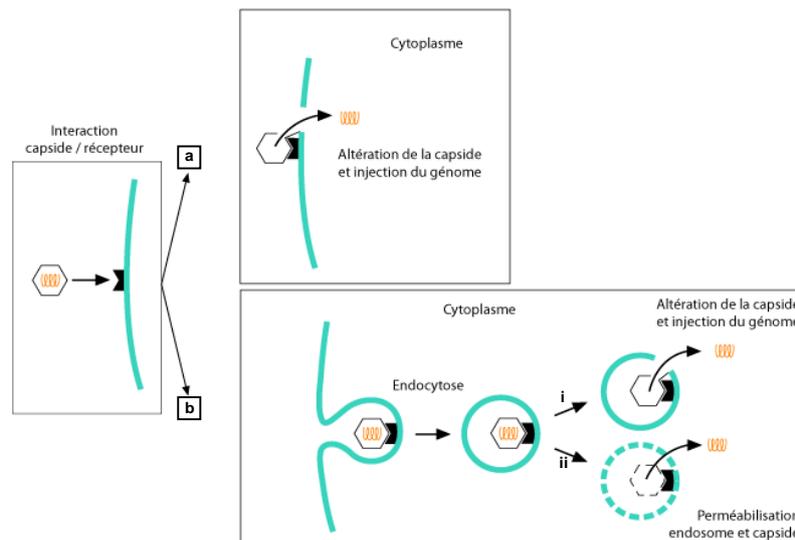


Figure I.3 : Pénétration d'un virus nu soit par translocation (a) soit par endocytose (b). En bleu la membrane plasmique d'après les cours de virologie de l'Université Catholique de Louvain, http://www.afd-id.org/~fdp_viro/index.htm, consulté le 03/08/2011

c/ par fusion avec la membrane plasmique

Ce procédé est propre aux virus pH-indépendants enveloppés. Le mécanisme de fusion requiert une glycoprotéine d'enveloppe spécifique : la protéine de fusion. L'enveloppe du virion fusionne directement avec la membrane plasmique de la cellule hôte à pH neutre et libère sa nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule hôte comme dans le cas du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (fig. I.4 c).

d/ par endocytose puis fusion avec la membrane de l'endosome

Ce mécanisme de pénétration ne concerne que les virus pH-dépendants enveloppés (fig. I.4 d). La fixation du virion sur son récepteur cellulaire entraîne l'endocytose de celui-ci. Le virus enveloppé se retrouve alors dans une vésicule d'endocytose à l'intérieur du cytoplasme de la cellule-hôte. A un pH acide donné et avec le concours d'une protéine de fusion, l'enveloppe du virus va fusionner avec la membrane de la vésicule et délivrer sa nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule. Ce mécanisme de pénétration est utilisé par les virus *Influenza A* et de l'Hépatite C.

Les glycoprotéines d'enveloppe, codés par le virus, jouent un rôle primordial dans le mécanisme d'entrée du virus (chap. I.2.).

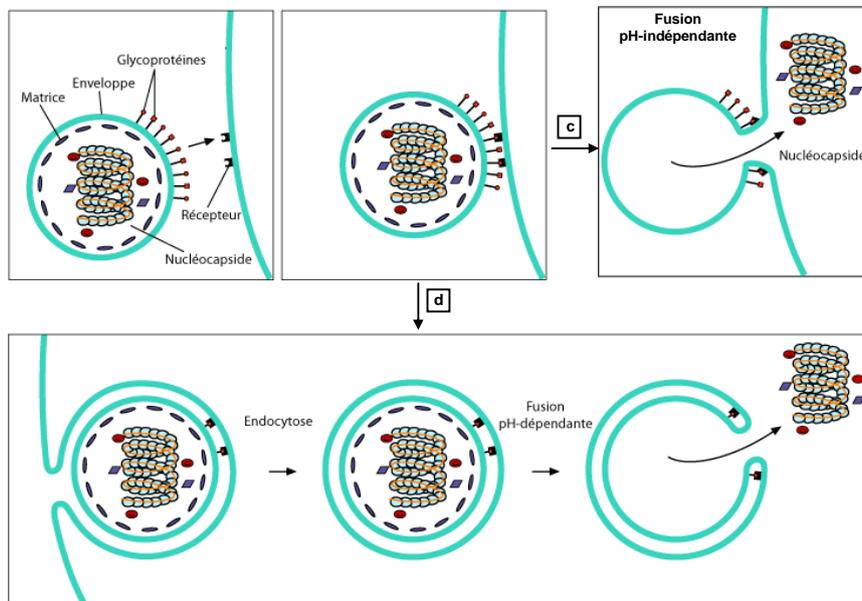


Figure I.4 : Pénétration d'un virus enveloppé pH-indépendant (c) ou pH-dépendant (d). En bleu la membrane plasmique d'après les cours de virologie de l'Université Catholique de Louvain, http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/index.htm, consulté le 03/08/2011

1.3.3) La décapsidation

Une fois que la nucléocapside se trouve dans le cytoplasme de la cellule, la capsid est dégradée (digérée par des enzymes cellulaires) pour libérer son génome. Cette étape est nécessaire pour que le génome puisse livrer ses informations génétiques à la machinerie cellulaire.

Ces trois étapes d'initiation de l'infection sont suivies par la phase de réplication et d'expression du génome viral.

1.3.4) La réplication

La multiplication du virus s'effectue par duplication du matériel génétique ; cette étape est couramment appelée "réplication"².

Lors de cette étape, le génome viral a deux rôles distincts :

² A. Mammette (2002). Virologie Médicale. Collection Azay, presse universitaire de Lyon

- Il est utilisé pour assurer l'expression des protéines virales nécessaires à la réplication du virus, à la construction des capsides et de l'enveloppe des nouveaux virus.

- Il est amplifié : c'est la réplication

L'objectif du virus, à cette étape, est de détourner et exploiter la machinerie cellulaire de sa cellule-hôte pour synthétiser son propre ADN ou ARN c'est-à-dire de répliquer son génome et produire les protéines virales (fig. I.5). Cette étape s'accompagne dans certains cas d'une inhibition de la synthèse d'ARN ou d'ADN cellulaire. Le mécanisme de cette réplication virale du génome est dépendant de la structure et de la nature du matériel génétique : ARN ou ADN, génome monocaténaire ou bicaténaire, segmenté ou non, circulaire ou linéaire.

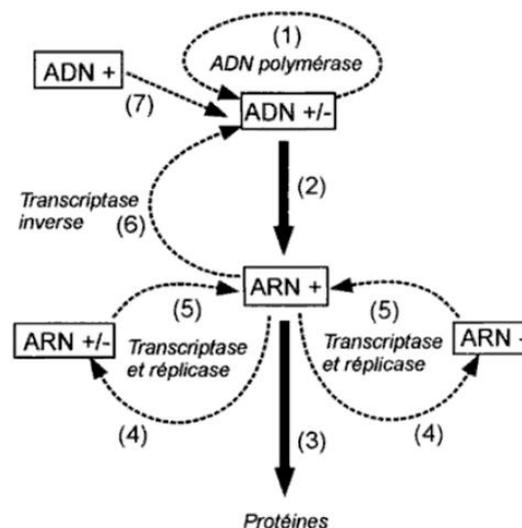


Figure I.5 : Stratégie de multiplication des virus en fonction de la nature du génome. (1) réplication du génome et (2) transcription (formation de l'ARNm (ARN+)) des virus à ADN. (4) réplication et (5) transcription des virus à ARN, (6) et (7) voies de transcription spécifique à certain virus à ARN. (3) traduction de l'ARN+ en protéine. D'après Mammette²

a/ cas des virus à ADN

La transcription et la réplication du génome des virus à ADN s'effectuent principalement dans le noyau.

La réplication du génome des virus à ADN double brin se calque, en général, sur les mécanismes de la réplication du génome cellulaire. Le cycle viral est divisé en deux phases : une phase précoce et une phase tardive sauf pour le

les *Herpesviridae* où il y a trois phases : une phase très précoce, une phase précoce et une phase tardive.

Pendant la phase précoce, une petite partie du génome viral est transcrite en protéines dites précoces. Celles-ci sont des protéines non structurales ou des enzymes intervenant dans la réplication du génome viral comme la synthèse d'un nouvel ADN viral. Puis le génome est répliqué.

Durant la phase tardive, le nouveau génome formé est transcrit permettant la synthèse de protéines dites tardives. Celles-ci sont des protéines de structure c'est-à-dire formant la capsidie ou l'enveloppe du virus.

b/ cas des virus à ARN

Les virus à ARN ont un cycle de réplication cytoplasmique. Le processus de réplication est différent selon la nature de l'ARN génomique.

- Les virus à ARN positif (ARN +)

Leur génome se comporte comme un ARN messenger, il est directement traduit par les ribosomes cellulaires en protéines de capsides et en protéines non structurales. Parmi ces protéines, une réplicase (ARN polymérase-ARN dépendante) permet la synthèse de l'ARN complémentaire (ARN -) servant de matrice pour la synthèse du nouveau génome : l'ARN +.

- Les virus à ARN négatif (ARN -)

Leur génome ne peut pas être traduit directement, il doit préalablement être transcrit en ARN messenger par une transcriptase virale (ARN polymérase associée au virion). Cet ARN messenger est ensuite traduit en protéines de capsides et en protéines non structurales par les ribosomes cellulaires. Cette ARN polymérase assure aussi la réplication du génome viral.

1.3.5) L'assemblage et la maturation

Après fabrication du nouveau génome par réplication, celui-ci est entouré par de nouvelles protéines virales structurales synthétisées par la cellule pour

former sa capsid. Ce phénomène s'appelle l'encapsidation du génome et conduit à la formation de nouveaux virus.

1.3.6) La libération

Les nouveaux virus formés sortent de la cellule soit par bourgeonnement cytoplasmique ou nucléaire pour les virus à enveloppe, soit par éclatement de la cellule (lyse cellulaire) pour les virus nus.

Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'étape de pénétration des virus enveloppés dans leur cellule-cible, c'est-à-dire à la fusion de l'enveloppe du virus avec la membrane de la cellule. Cette étape de fusion est une des étapes-clés de l'infection virale.

2. La fusion virale

La fusion membranaire intervient dans de nombreux processus biologiques, notamment dans le développement musculaire³, le transport intracellulaire⁴, la neurotransmission⁵, la fécondation⁶ et l'infection virale⁷. La fusion est un processus qui implique le rapprochement de deux membranes, leur fusion et la formation d'un pore. Le processus de fusion membranaire est commun à tous les virus enveloppés et nécessite trois étapes principales catalysées par des glycoprotéines d'enveloppe du virus (fig. I.6).

³ M. C. Towler, S. J. Kaufman, F. M. Brodsky (2004). Membrane traffic in skeletal muscle. *Traffic*, 5, 129-139

⁴ J. E. Rothman (1994). Mechanism of Intracellular Protein-Transport. *Nature* 372, 55-63.

⁵ C. F. Gianinazzi, E. Raiteri, C. Collesi, F. Benfenati, O. Cremona (2005). Dynamics of secretion. *Arch. Ital. Biol.*, 143, 133-142

⁶ F. J. Longo, R. Yanagimachi (1993). Detection of Sperm-Egg Fusion. *Methods Enzymol.*, 221, 249-260

⁷ F. M. Hughson (1995). Molecular Mechanisms of Protein-Mediated Membrane-Fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5, 507-513

2.1. Les protéines de fusion virale

Les protéines de fusion virale sont des glycoprotéines enchâssées dans l'enveloppe virale. Elles possèdent une structure hydrophobe. Une partie de cette structure correspond au peptide de fusion viral.

Les glycoprotéines d'enveloppe des virus ont développé deux caractéristiques indispensables au processus de fusion virale. Elles ont la capacité de se lier à des récepteurs cellulaires spécifiques et leur structure inclut un domaine peptidique de fusion permettant, une fois activé, d'engendrer la fusion entre l'enveloppe du virus et la membrane de la cellule.

Les protéines de fusion virale sont divisées en trois classes essentiellement basées sur leurs caractéristiques structurales aux différentes étapes de la fusion virale⁸.

2.1.1) Les protéines de fusion de classe I

Les protéines de fusion de classe I comportent une structure en hélice α et le peptide de fusion est situé à l'extrémité N-terminale de la protéine à l'intérieur de cette structure⁹. Les protéines de fusion de classe I diffèrent au niveau de leur taille et de leur séquence peptidique en fonction de la famille virale qui l'exprime mais l'arrangement structural en spicule et hélice α est commun à toutes ces protéines. Cette structure est déterminante lors de la fusion virale. Lorsque le processus de fusion virale est déclenché, ces protéines s'assemblent en un homotrimère sous la forme d'une épingle à cheveux de conformation stable : cette conformation est emblématique des protéines de fusion de classe I. Ce type de protéines de fusion virale est présent dans un grand nombre de famille de virus comme celle des *Orthomyxoviridae*, des *Retroviridae* ou encore des *Filoviridae*¹⁰.

⁸ F. L. Cosset, D. Lavillette (2011). Cell Entry of Enveloped Viruses. Adv. Genet., 73, 121-183

⁹ E. Teissier, F. Penin, E. I. Pécheur (2011). Targeting Cell Entry of Enveloped Viruses as an Antiviral Strategy. Molecules, 16, 221-250

¹⁰ M. Kielian, F. A. Rey (2006). Virus membrane-fusion proteins: More than one way to make hairpin. Nat. Rev. Microbiol., 4, 67-76

2.1.2) Les protéines de fusion de classe II

Les protéines de fusion de classe II sont composées d'une structure en feuillet β et le peptide de fusion est situé sur une boucle à l'intérieur de cette structure⁸. Le réarrangement conformationnel observé lors de la fusion virale avec ces protéines implique un changement d'état oligomérique : ces protéines vont passer d'une structure pré-fusionnelle dimérique enchassée dans l'enveloppe du virus à une structure post-fusionnelle trimérique allongée présentant le peptide de fusion. Ces protéines de fusion sont exprimées par les virus de la famille des *Flaviviridae* et des *Togaviridae*⁹.

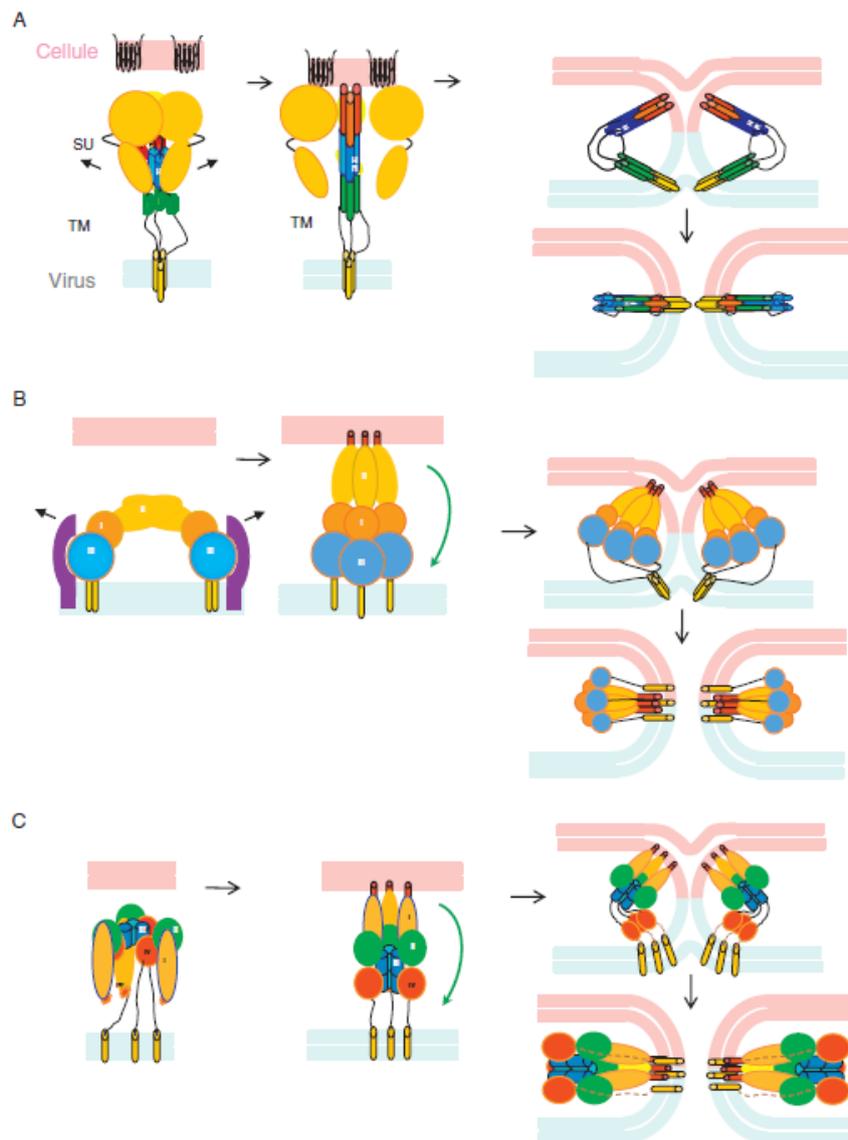


Figure 1.6 : Les trois étapes de la fusion virale en fonction des protéines de fusion virales de classe I (A), de classe II (B) et de classe III (C). Visualisation de leur changement de conformation de pré-fusionnelle à post-fusionnelle en passant par la conformation étirée. D'après Cosset et Lavilette⁸.

2.1.3) Les protéines de fusion de classe III

Les protéines de fusion de classe III ont une structure résultant d'une combinaison d'hélice α et de feuillet β ¹¹. Le peptide de fusion est situé sur une boucle à l'extérieur de la structure protéique à l'extrémité d'un feuillet β . Ces protéines se présentent aussi sous une forme trimérique lors de la fusion virale. Ces protéines de fusion sont exprimées par les virus de la famille des *Rhabdoviridae* et des *Herpesviridae*¹⁰.

2.2. Le peptide de fusion

Le peptide de fusion est une courte séquence peptidique de 10 à 30 acides aminés présente en position N-terminale ou interne aux protéines de fusion virale¹². Cette séquence est conservée au sein d'une même famille virale¹³. Cette homologie de séquence peut être supérieure à 90 % pour une famille donnée mais tombe à moins de 20 % pour l'alignement de séquences de peptides de fusion de deux familles de virus différentes. Malgré cette disparité, les peptides de fusion présentent une certaine similarité. Ils sont tous majoritairement hydrophobes, contiennent des acides aminés comme des alanines, des glycines mais aussi des thréonines ou des sérines¹⁴ et ont une séquence globalement riche en glycines¹².

Les peptides de fusion ont la capacité de déstabiliser une bicouche lipidique (liposome ou membrane cellulaire). Ils induisent la fusion et la perméabilité de celle-ci en s'y insérant de manière oblique dans la plupart des cas¹⁵. Cette

¹¹ M. Backovic, T. S. Jardetzky (2009). Class III viral membrane fusion proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 19, 189-196

¹² E. I. Pécheur, J. Sainte-Marie, A. Bienvenue, D. Hoekstra (1999). Peptides and membrane fusion: towards an understanding of the molecular mechanism of protein-induced fusion. *J. Membrane Biol.*, 167, 1-17

¹³ J. M. Withe (1992). *Membrane-Fusion. Science*, 258, 917-924

¹⁴ V. D. Del Angel, F. Dupuis, J. P. Mornon, I. Callebaut (2002). Viral fusion peptides and identification of membrane-interacting segments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293, 1153-1160

¹⁵ A. Colotto, I. Martin, J.M. Ruyschaert, A. Sen, S.W. Hui, R.M. Epand (1996). Structural study of the interaction between the SIV fusion peptide and model membranes. *Biochemistry*, 35, 980-989

tendance à pénétrer dans les membranes est due à leur forte hydrophobicité¹⁶ et à leur structure.

Cette courte séquence d'acides aminés joue un rôle crucial lors de la fusion virale : si une mutation est induite sur le peptide de fusion, la protéine de fusion virale perd sa capacité à fusionner.

2.3. Les étapes de la fusion virale

Le processus de fusion membranaire est divisé en plusieurs étapes (fig. I.6) toutes défavorables d'un point de vue énergétique. Les glycoprotéines d'enveloppe jouent un rôle majeur lors de ce processus de fusion. Leur changement de conformation, de "pré-fusionnelle" métastable à "post-fusionnelle" plus stable au cours du processus permet au système d'acquérir suffisamment d'énergie pour déstabiliser la structure ordonnée en bicouches lipidiques des deux membranes et permettre leur fusion ainsi que la formation d'un pore. Les glycoprotéines d'enveloppe sont en conformation "pré-fusionnelle" avant le début du processus de fusion virale : le peptide de fusion est protégé à l'intérieur de la structure.

La première étape de la fusion est le rapprochement de l'enveloppe du virus de la membrane plasmique de la cellule cible. Ce rapprochement est défavorable au niveau énergétique du fait des forces de répulsions électrostatiques qui s'exercent entre les deux membranes mais aussi à cause de la présence de molécules d'eau interférant dans le rapprochement de ces deux membranes lipidiques. L'activation des glycoprotéines d'enveloppe par liaison à un récepteur (pour les virus pH-indépendants) ou par acidification du compartiment endosomal entraînant la protonation de certains résidus de la glycoprotéine (pour les virus pH-dépendants) conduit à un réarrangement de celles-ci menant à l'exposition du peptide de fusion vers l'extérieur de la structure multimérique (chap. I 2.1.). Une fois le peptide de fusion exposé, celui-ci va interagir et

¹⁶ S. Nir, J. L. Nieva (2000). Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion. *Prog. Lipid. Res.*, 39, 181-206

déstabiliser la membrane de la cellule-cible. Les glycoprotéines d'enveloppe sont alors en conformation étirée en une structure trimérique (fig. 1.6).

La deuxième étape de ce processus consiste en la fusion des deux monocouches les plus rapprochées en surface du virus et de la cellule formant une hémifusion des deux membranes par basculement des protéines de fusion.

La fusion complète des deux bicouches lipidiques suivie de la formation d'un pore est réalisée lors de la troisième étape du processus, les protéines de fusion sont alors dans leur conformation la plus stable.

Ce pore ainsi formé permet la transmission du matériel génétique du virus au cytoplasme de la cellule hôte : c'est le début du cycle d'infection virale.

Tous les virus ont développé des mécanismes variés pour atteindre le même but : livrer leur génome à l'intérieur d'une cellule. Malgré la grande diversité des acteurs viraux (glycoprotéines d'enveloppes de séquence et de structure diverses) pour atteindre ce but, un mécanisme d'action général semble être commun à tous les virus. L'activation de ces protéines de fusion virale déclenche des changements conformationnels conduisant d'abord à un rapprochement des deux membranes puis à la déstabilisation de la membrane cellulaire et finalement à la fusion des deux membranes et à la formation d'un pore.

3. Le concept du projet

Les protéines membranaires représentent 20 à 30 % des protéines codées par le génome. De nos jours, il est encore difficile, si ce n'est impossible, de résoudre la structure tridimensionnelle de ces protéines dans leur configuration membranaire directement sur le virus. C'est pour cette raison que les données structurales des protéines de surface (glycoprotéines) des virus enveloppés ne sont pas encore accessibles puisque leur structure est déterminée à partir de protéines isolées. Ces protéines sont d'une importance primordiale lors du ciblage cellulaire du virus (reconnaissance des récepteurs en surface des cellules cibles) et lors de la fusion membranaire (cf. ci-dessus).

La caractérisation du processus d'entrée du virus dans la cellule cible et donc la caractérisation de ces protéines d'enveloppe est primordiale pour la compréhension fondamentale du cycle de réplication du virus et pour expliquer le mécanisme de l'infection virale au niveau moléculaire.

La connaissance exacte et précise de ces mécanismes permettra de développer de nouvelles stratégies antivirales ayant ces protéines ou ces mécanismes pour cible.

Pour pouvoir identifier et caractériser une partie de ces protéines et en particulier le peptide de fusion, nous avons développé une nouvelle stratégie. Cette stratégie repose sur le marquage covalent de zones hydrophobes par une approche appelée photomarquage covalent d'affinité hydrophobe. Le peptide de fusion de certains virus a déjà été identifié grâce à cette méthode de photomarquage hydrophobe d'affinité comme celui du virus Sendai¹⁷, du virus de la rage ou encore de la stomatite vésiculeuse¹⁸. Les adduits formés après photoréaction ont été détectés par radioactivité. Aujourd'hui l'utilisation de cette technique est strictement réglementée et est même interdite dans les laboratoires de niveau de sécurité 3 et 4. Cette méthode d'identification

¹⁷ S. L. Novick and D. Hoekstra (1988). Membrane penetration of Sendai virus glycoproteins during the early stages of fusion with liposomes as determined by hydrophobic photoaffinity labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7433-7437

¹⁸ P. Durrer, Y. Gaudin, R. W. Ruigrok, R. Graf, J. Brunner (1995). Photolabeling identifies a putative fusion domain in the envelope of rabies and vesicular stomatitis viruses. *J. Biol. Chem.*, 270, 17575-17581

historique développée dans les années 1980-1990 est donc limitée à l'étude de certains pathogènes et nécessite des infrastructures spécifiques. De plus, à cette époque, de petites molécules hydrophobes ayant une faible spécificité et une mauvaise stabilité dans les membranes sont souvent utilisées ne permettant pas un photomarquage efficace.

Pour pallier ces désavantages, notre stratégie repose sur l'utilisation de nouvelles sondes lipidiques contenant un groupement photoactivable et un traceur non radioactif, un groupement fluorescent pour la détection des adduits formés lors de la réaction de marquage.

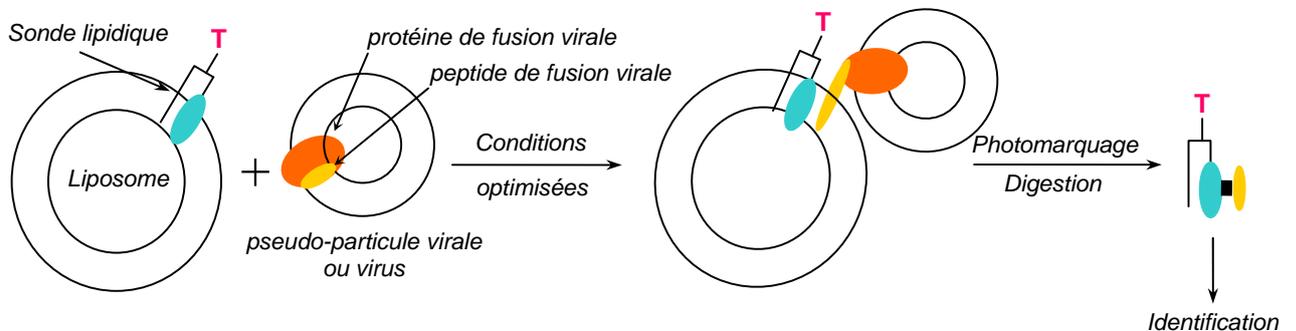


Figure I.7 : Méthode générale pour l'identification d'une région hydrophobe marquée. T = traceur

Cette stratégie est basée sur l'utilisation de pseudo-particules virales non pathogènes (pseudo-particules virales du virus de l'hépatite C : VHC_{pp}) ou de virus entiers (virus de l'hépatite B : VHB) pouvant être manipulés dans un laboratoire de niveau de sécurité 1 ou 2 moins contraignant présentant des glycoprotéines de fusion virale. Ces entités sont mises en contact avec des liposomes contenant une sonde lipidique mimant une cellule à infecter. Dans les conditions optimales de température et de pH, la fusion est induite entre l'entité (pseudo)virale et le liposome. Après photomarquage et digestion, l'identification de l'adduit de photomarquage formé peut théoriquement être effectuée (fig. I.7).

Dans un premier temps, la capacité de photomarquage de nouvelles sondes lipidiques a été testée sur des protéines modèles hydrophobes en micelles de détergent.

4. Le virus de l'hépatite C

Actuellement, l'organisation mondiale de la santé estime qu'environ 3 % de la population mondiale a été infecté par le virus de l'hépatite C (VHC) et que 170 millions de personnes sont des porteurs chroniques, à risque de développer une cirrhose hépatique et/ou un carcinome hépatocellulaire. En France on estime à 370 000 le nombre de personnes infectées par le VHC. 3 à 4 millions de personnes sont contaminées chaque année et le virus est la cause d'environ 350 000 décès par an dans le monde. Le virus affecte plus particulièrement les populations d'Afrique et d'Asie avec une prévalence moyenne supérieure à 3% (allant même jusqu'à 20 % en Egypte) alors que la prévalence dans les pays occidentaux n'est que de 1,5 % en moyenne¹⁹. Il n'existe, à ce jour, aucun vaccin contre cette maladie et le seul traitement utilisé est une combinaison d'interféron- α et de ribavirine à laquelle ne sont sensibles que 50 % des patients²⁰.

Le VHC fut identifié en 1989 par l'équipe de Houghton²¹ comme étant une hépatite non A, non B. C'est un virus enveloppé pH-dépendant²² à ARN positif simple brin de la famille des *Flaviviridae* avec un tropisme d'hôte restreint : seul l'homme et le chimpanzé peuvent être infectés par le VHC.

Le diamètre des particules virales du VHC est de 40 à 60 nm²³, ces particules sont essentiellement composées d'un ARN génomique, d'une bicouche lipidique contenant majoritairement deux glycoprotéines E1 et E2 et des protéines de capsid.

Le cycle viral du virus de l'hépatite C suit les 6 étapes classiques de la multiplication d'un virus (fig. I.8 et pour plus de détails : chap I.1.3.) : (a)

¹⁹ Les chiffres présents dans ce paragraphe viennent de l'organisation mondiale de la santé : www.who.int consulté le 05/09/2011

²⁰ D. Kwong, S. Cowherd, P. Mueller (2006). Beyond interferon and ribavirin: Antiviral therapies for hepatitis C virus. *Drug Discovery Today*, 3, 211-220

²¹ Q. L. Choo, G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, M. Houghton (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244, 359-362

²² D. Lavillette, B. Bartosch, D. Nourrisson, G. Verney, F. L. Cosset, F. Penin, E. I. Pécheur (2006). Hepatitis C virus mediate low pH-dependant membrane fusion with liposomes. *J. Biol. Chem.*, 281, 3909-3917

²³ S. L. Tan, A. Pause, Y. Shi, N. Sonenberg (2002). Hepatitis C therapeutics: current status and emerging strategies. *Nature Reviews*, 1, 867-881

attachement et pénétration, (b) libération du génome, (c) et (d) transcription et réplication de l'ARN, (e) assemblage et maturation et (f) libération des nouveaux virions.

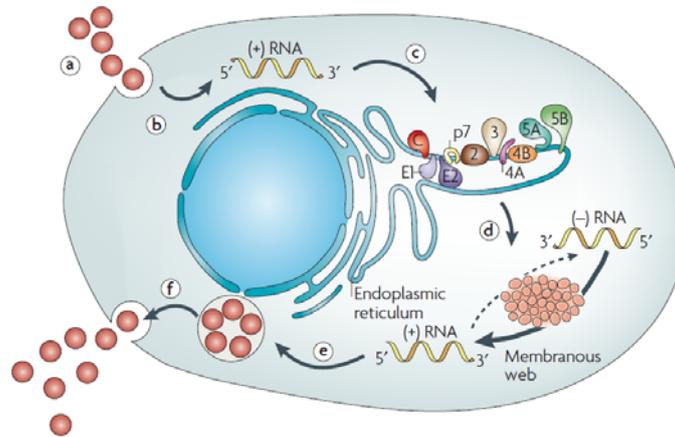


Figure 1.8 : cycle viral du virus de l'hépatite C d'après Moradpour et al.²⁴

Les cellules hépatocytaires sont la principale cible du VHC mais de multiples récepteurs ont été identifiés interagissant avec les protéines d'enveloppe du VHC comme la tétraspanine CD81, le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDLR), le récepteur "scavenger" SR-BI et la claudin-1²⁴. Après l'attachement, l'entrée du virus se fait par endocytose. Etant caractérisé comme un virus pH-dépendant²², l'acidification de l'endosome provoque la fusion de l'enveloppe du virus avec la membrane de l'endosome et la libération du génome dans le cytoplasme de la cellule. Les protéines d'enveloppe de ce virus seraient des glycoprotéines de fusion de classe II et elles possèderaient un peptide de fusion exposé en surface lors de la fusion (pour le mécanisme global : chap. I.2). Toutefois, les mécanismes précis de fusion du VHC restent inconnus à ce jour et le peptide de fusion n'a pas encore été complètement caractérisé²⁵.

²⁴ D. Moradpour, F. Penin, C. M. Rice (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nature*, 5, 453-463
²⁵ R. S. Russell, K. Kawaguchi, J. C. Meunier, S. Takikawa, K. Faulk, J. Bukh, R. H. Purcell, S. U. Emerson (2009). Mutational analysis of hepatitis C virus E1 glycoprotein in retroviral pseudoparticles and cell-culture-derived H77/JFH1 chimeric infectious virus particles. *J. Viral Hepat.*, 16, 621-632

Le génome du VHC est composé d'un ARN positif simple brin de 9,6 kb comportant deux régions non codantes en 5' et 3' et une longue phase de lecture codant pour une polyprotéine précurseur d'environ 3000 acides aminés. Ce précurseur protéique est clivé dans le réticulum endoplasmique en trois protéines structurales (protéine de la capsid et glycoprotéines de surface E1 et E2), six enzymes et la protéine p7²⁶ (fig. I.9).



Figure I.9 : organisation de l'ARN viral codant pour des protéines structurales (S) et non structurales (NS) d'après Penin et al.²⁶

La transcription et la réplication du génome viral s'effectuent au niveau du réticulum endoplasmique, la libération des nouveaux virions s'effectue par bourgeonnement de la membrane plasmique.

Malgré plus de vingt ans d'études depuis sa découverte, ce virus reste encore une énigme par de nombreux aspects. Ceci est dû au fait que le VHC est un virus de classe 3, il doit donc être manipulé dans des conditions strictes de sécurité ce qui rend son étude difficile. Le manque d'informations sur le VHC vient aussi du fait des difficultés à en obtenir des quantités suffisantes : la virémie des patients infectés est faible et le virion fragile. Pour pallier ces désavantages, plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo* ont été développés sans satisfaction dans les années 1990 pour étudier le VHC. Mais récemment, au cours des années 2000, deux nouveaux modèles intéressants ont été mis au point : un modèle basé sur des pseudo-particules du VHC et un autre produisant des virions VHC dérivés de la culture cellulaire.

²⁶ F. Penin, J. Dubuisson, F. A. Rey, D. Moradpour, J. M. Pawlotsky (2004). Structural Biology of Hepatitis C Virus. *Hepatology*, 39, 5-19

Les pseudo-particules du VHC (VHC_{pp}) sont des particules virales non pathogènes. Elles sont obtenues après transfection et bourgeonnement dans des cellules et sont constituées d'une capsidie rétrovirale et d'une enveloppe comportant deux glycoprotéines E1 et E2 en surface²⁷.

La découverte d'un virus responsable d'une hépatite fulminante au Japon en 2005 a permis de développer le premier modèle de réplication *in vitro* en cellule hépatique du VHC²⁸. Ce système de réplication permet donc de produire le VHC en culture cellulaire et ces nouveaux virions produits peuvent infecter d'autres cellules et les primates.

Les VHC_{cc} sont donc potentiellement pathogènes et doivent être manipulées en laboratoire de niveau de sécurité 3 contrairement aux VHC_{pp} qui peuvent se manipuler en laboratoire de niveau de sécurité 2 et qui restent donc un excellent modèle simple et facilement utilisable pour l'étude des étapes d'entrée du virus de l'hépatite C dans la cellule hôte lors de l'infection.

²⁷ B. Bartosch, J. Dubuisson, F. L. Cosset (2003). Infectious Hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J. Exp. Med.*, 197, 633-642

²⁸ T. Wakita, T. Pietschmann, T. Katol, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhaol, K. Murthy, A. Habermann, H. G. Kräusslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, T. J. Liang (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Med.*, 11, 791-796

5. Le virus de l'hépatite B

Le virus de l'hépatite B (VHB) est un virus extrêmement contagieux provoquant des infections du foie potentiellement mortelles. Plus de 2 milliards de personnes ont été infectées par le VHB au cours de leur vie. Plus de 360 millions de celles-ci présentent des infections chroniques provoquant entre 50 000 et 700 000 décès par an. Cette maladie chronique du foie peut provoquer, chez les patients atteints, un décès par cirrhose ou cancer du foie. Le premier vaccin pour lutter contre le VHB appelé Hevac B[®], a reçu son autorisation de mise sur le marché en 1981, il est efficace à 95 % pour éviter l'infection par le VHB et ses conséquences chroniques. D'autres vaccins ont été développés depuis comme le GenHevac B[®], le Engerix-B[®], le Recombivax-HB[®] ou encore le HB-VAX DNA[®]. Malgré l'existence de ces vaccins efficaces pour lutter contre l'infection, de nombreuses personnes dans le monde sont encore infectées par le virus. Différents traitements à base d'interférons ou d'inhibiteur de la polymérase virale existent pour traiter ces personnes mais ces traitements restent chers (ce qui pose problème pour les pays émergents) et souvent mal tolérés.

Le VHB est un virus enveloppé à ADN double brin de la famille des *Hepadnaviridae*. C'est en 1970 que les premières images de virus issu de sérum de patients présentant une hépatite virale associée à l'antigène « australia » ont été publiées par Dane et son équipe²⁹. Ce virus est composé de trois types de particules virales morphologiquement différentes : des particules virales complètes connues sous le nom de particules de Dane et des particules dites subvirales soit d'une forme sphérique, soit filamenteuse.

Les particules virales complètes infectieuses d'environ 42 nm de diamètre sont composées d'une enveloppe lipoprotéique portant des antigènes de surface et d'une nucléocapside contenant le génome du virus et une polymérase. Le

²⁹ D. S. Dane, C. H. Cameron, M. Briggs (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, 1, 695-698

génomique du virus est constitué d'une petite molécule d'ADN de 3,2 kb³⁰. Les particules subvirales sont des enveloppes protéo-lipidiques vides non infectieuses.

Le cycle viral du virus de l'hépatite B suit les 6 étapes classiques de la multiplication d'un virus³¹ (fig. I.10 et pour plus de détails : chap I.1.3.) mais certaines étapes et notamment l'attachement et l'entrée du virus restent encore mal connues.

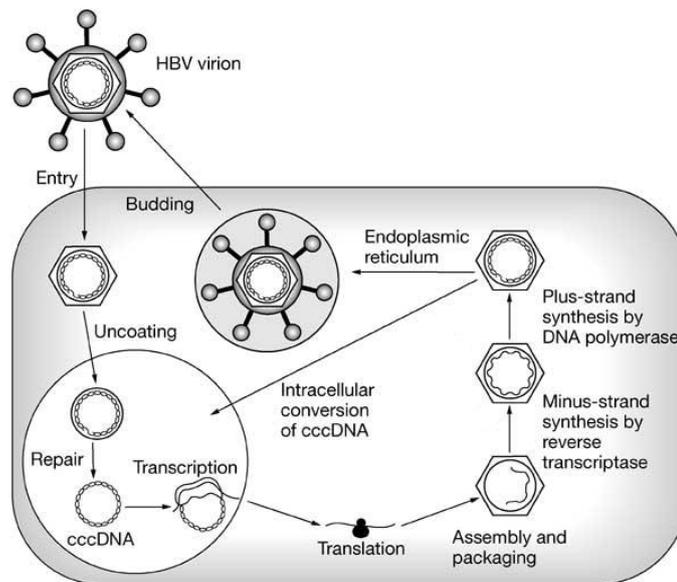


Figure I.10 : cycle viral du virus de l'hépatite B et d'après Fung and Lok³¹

Après attachement du virion à la surface d'un hépatocyte, le virus de l'hépatite B rentre dans la cellule où il rejoint le noyau pour délivrer son génome. Dans le noyau, ce génome est complété et transcrit en ARN viral puis celui-ci est traduit dans le cytoplasme de la cellule pour produire les différentes protéines virales. Le brin d'ADN (-) du VHB est produit à partir de la polymérase ayant une activité de transcriptase inverse, la polymérase virale assure ensuite l'initiation de la synthèse du second brin d'ADN (+). A ce moment du cycle de réplication, une partie des nouvelles nucléocapsides formées retournent au noyau afin

³⁰ J. F. Hruska, D. A. Clayton, J. L. Ruenstein, W. S. Robinson (1977). Structure of Hepatitis B Dane particle DANN before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *J. Virol.*, 21, 666-672

³¹ S. K. Fung, A. S. F. Lok (2004). Drug Insight: nucleoside and nucleotide analog inhibitors for hepatitis B. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, 1, 90-97

d'amplifier le génome viral, l'autre partie est maturée et libérée par bourgeonnement de la membrane cytoplasmique pour former de nouvelles particules virales.

6. Les protéines modèles utilisées

L'étude du photomarquage d'affinité hydrophobe est d'abord effectuée sur trois protéines modèles membranaires en détergent pour caractériser la capacité de photomarquage hydrophobe des sondes lipidiques. Ces trois protéines sont la bactériorhodopsine (bR), la BmrA et la protéine non structurale NS2 du virus de l'hépatite C.

6.1. La bactériorhodopsine (bR)

La bactériorhodopsine (27099 Da) est l'unique protéine exprimée dans la membrane plasmique pourpre de *Halobacterium salinarium*. Cette protéine est un polypeptide de 248 acides aminés. La structure tridimensionnelle à haute résolution (2,5 Å) de cette protéine obtenue par diffraction des rayons X est connue depuis 1997³² (Réf. PDB : 1AP9, Swiss-Prot : P02945). Elle est constituée de sept hélices α transmembranaires connectées entre elles par trois boucles externes et trois boucles cytoplasmiques (fig. I.11).

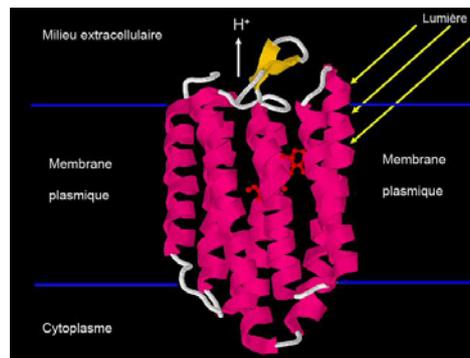


Figure I.11 : Structure tridimensionnelle de bR d'après le livre de D. Pol, *Biologie-Géologie*, 1, 2008.

³² E. Pebay-Peroula, G. Rummel, J. P. Rosenbusch, E. M. Landau (1997). X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science*, 277, 1676-1681

Cette protéine contient une molécule de rétinaldéhyde (vitamine A aldéhyde), en rouge sur la fig. I.11, attachée de manière covalente à l'acide aminé Lysine²¹⁶ par son amine primaire en ϵ via une liaison imine (fig. I.12).

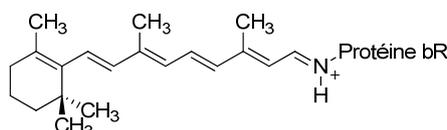


Figure I.12 : Conformation all-trans du rétinaldéhyde lié à la lysine 216 de la bR par liaison imine

70 % des acides aminés composant cette protéine sont hydrophobes³³. bR s'organise en homotrimère dans la membrane plasmique. C'est une pompe à proton utilisant l'énergie fournie par la lumière pour générer un gradient de protons à travers la membrane cellulaire : elle convertit l'énergie d'un photon en un potentiel électrochimique (fig. I.11).

Cette protéine nous a été fournie par Sigma-Aldrich sous forme lyophilisée en présence de détergents. Par la suite, la bR provenait de l'équipe du Dr. Giuseppe Zaccai (Institut Laue Langevin, Grenoble) en solution sous forme de micelles de détergent à cause d'une baisse de sa pureté chez Sigma-Aldrich : jusqu'à 30% d'impuretés (fig. I.13 puits 2) ont été détectées après changement de lot.



Figure I.13 : qualité de bR : M marqueur All-Blue standard, 1 lot 1 Sigma-Aldrich, 2 lot 2 Sigma Aldrich, 3 lot de Grenoble.

³³ H. G. Khorana, G. E. Gerber, W. C. Herlihy, C. P. Gray, R. J. Andereg, K. Nihei, K. Biemann (1979). Amino acid sequence of bacteriorhodopsin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 5046-5050

6.2. La BmrA

BmrA pour “*Bacillus multidrug resistance ATP*”, aussi connue sous le nom de YvcC, est une protéine transmembranaire produite et exprimée par la bactérie *Bacillus subtilis* dont la structure est partiellement connue³⁴ (réf. Swiss-Prot O06967). Il n'existe pas de structure tridimensionnelle à haute résolution complète connue de cette protéine à ce jour mais une structure tridimensionnelle à basse résolution (25 Å) est disponible³⁵. C'est une protéine de la famille des transporteurs MDR (MultiDrug Resistance) et de la super famille des transporteurs ABC (ATP-binding Cassette). BmrA est un “demi-transporteur” qui fonctionne sous forme d'homodimères mais il existe aussi sous la forme monomérique et tétramérique²⁵. Chaque monomère est probablement composé de 6 passages transmembranaires et est composé de 589 acides aminés pour 64519 Da (fig. I.14).

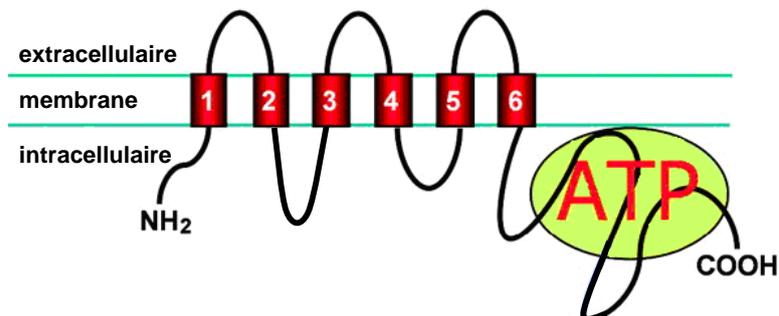


Figure I.14 : structure probable de BmrA d'après Dalmas et al.³⁴

La BmrA nous a été fournie par l'équipe du Dr. A. Di Pietro et du Dr. P. Falson (UMR CNRS 5086, IBCP Lyon), experte dans l'étude des transporteurs ABC.

³⁴ O. Dalmas, C. Orelle, A. E. Foucher, C. Geourjon, S. Crouzy, A. Di Pietro, J. M. Jault (2005). The Q-loop disengageq from the first intracellular loop during the catalytic cycle of the multidrug ABC transporter BmrA. *J. Biol. Chem.*, 280, 36857-36864

³⁵ M. Chami, E. Steinfels, C. Orelle, J. M. Jault, A. Di Pietro, J. L. Rigaud, S. Marco (2002). Three-dimensional structure by cryo-electron microscopy of YvcC, an homodimeric ATP-binding cassette transporter from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 315, 1075-1085

La BmrA est une pompe membranaire capable de déplacer, dans les deux sens, une grande variété de substances à travers la membrane de la cellule telles que des lipides, des stérols ou encore des médicaments. Cette protéine est notamment impliquée dans la résistance bactérienne aux antibiotiques. Le transport de ces substances par la BmrA est fortement dépendant de son activité ATPasique³⁶.

L'utilisation d'une souche mutée d'*E. Coli* a permis de surexprimer BmrA en membrane bactérienne³⁷. Elle est ensuite purifiée via un His-tag (par ajout de la séquence peptidique MSSSHHHHHH en position N-terminale) en micelles de détergent par chromatographie d'affinité Ni-NTA-Agarose. La production et la purification de cette protéine sont effectuées avec de bons rendements. Cela nous permet d'avoir un approvisionnement régulier, suffisant et de bonne qualité (fig. I.15) pour nos études futures.

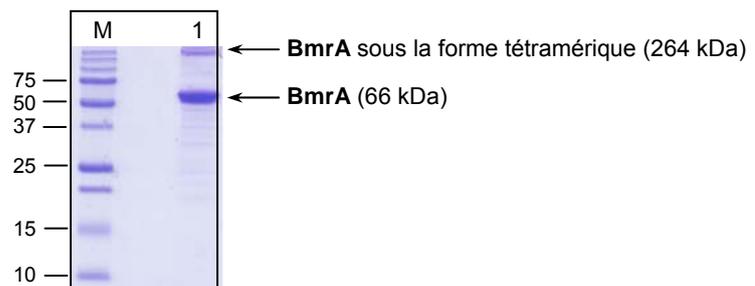


Figure I.15 : Gel SDS-PAGE de la BmrA après purification.
M marqueur All-Blue standard, 1 BmrA.

³⁶ E. Steinfels, C. Orelle, J. R. Fantino, O. Dalmas, J. L. Rigaud, F. Denizot, A. Di Pietro, J. M. Jault (2004). Characterization of YvcC (BmrA), a Multidrug ABC Transporter Constitutively Expressed in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 43, 7491-7502

³⁷ E. Steinfels, C. Orelle, O. Dalmas, F. Penin, B. Miroux, A. Di Pietro, J. M. Jault (2002). Highly efficient over-production in *E. Coli* of YvcC, a multidrug-like ATP-Binding cassette transporter from *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1565, 1-5

6.3. Protéine NonStructurale 2 (NS2) du virus de l'Hépatite C

NS2 est une protéine membranaire non glycosylée de 217 acides aminés de 23 KDa faisant partie du groupe des protéines non structurales du virus de l'Hépatite C (**NS2**, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B). Lors de sa synthèse par le complexe de réplication, elle est enchâssée dans la membrane du réticulum endoplasmique. Elle possède un domaine hydrophobe composé de trois segments transmembranaires (acides aminés de 4 à 93) en position N-terminale et un domaine cytoplasmique en position C-terminale (acides aminés de 94 à 217)³⁸(fig. I.16).

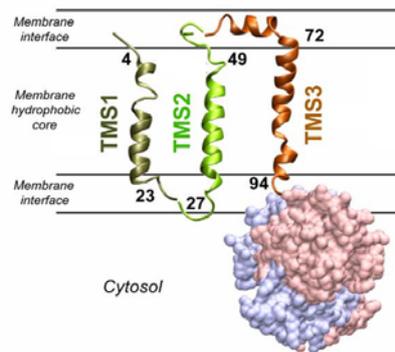


Figure I.16 : structure probable de NS2 d'après Jirasko et al.³⁸

La partie membranaire de NS2 semblerait participer au processus d'assemblage des particules virales du virus de l'hépatite C³⁹ et la partie cytosolique avec une partie de la protéine NS3 forment une protéase : la NS2-3 cystéine protéase⁴⁰.

Cette protéine est surexprimée en membrane bactérienne de *E. Coli* par l'équipe de F. Penin (UMR CNRS 5086, IBCP Lyon) spécialiste de l'étude du virus de

³⁸ V. Jirasko, R. Montserret, J. Y. Lee, J. Gouttenoire, D. Moradpour, F. Penin, R. Bartenschlager (2010). Structural and Fonctional Studies of Nonstructural Protein 2 of the Hepatitis C Virus Reveal Its Key Role as Organizer of Virion Assembly. PLoS Pathogens, 6, 1-22

³⁹ C. I. Popescu, N. Callens, D. Trinel, P. Roingeard, D. Moradpour, V. Descamps, G. Duverlie, F. Penin, L. Héliot, Y. Rouillé, J. Dubuisson (2011). NS2 Protein of Hepatits C Virus Interacts with Structural and Non-Structural Proteins towards Virus Assembly. PLoS Pathogens, 7, 1-20

⁴⁰ I. C. Lorenz (2010). The Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 2 (NS2): An Up-and-Coming Antiviral Drug Target. Viruses, 2, 1635-1646

l'Hépatite C. Elle nous a été fournie sous une forme fusionnée avec de la thiorédoxine et un His-tag. Ces modifications sont nécessaires pour sa production et sa purification. Cette équipe nous a donc fourni une protéine modifiée ayant une séquence peptidique de 359 acides aminés pour 39 KDa (fig. I.17).

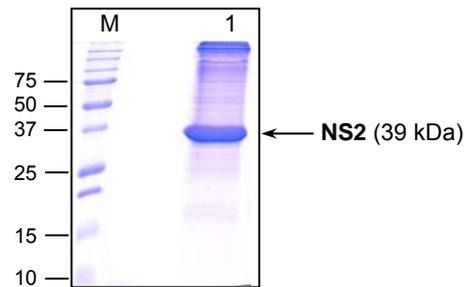


Figure I.17 : Gel SDS-PAGE de NS2 après purification.
M marqueur All-Blue standard, 1 NS2.

Ces trois protéines nous ont été fournies en micelles de détergent pour permettre leur solubilisation et leur contact avec les sondes lipidiques dans un tampon donné.

Au vu des quantités nécessaires de biomatériaux utiles à la validation et à l'optimisation de notre stratégie de photomarquage, l'utilisation de ces protéines a permis une avancée plus rapide du projet du fait de leur relative simplicité d'approvisionnement et de leur facilité de manipulation en terme de la sécurité.

Ces trois protéines membranaires hydrophobes ont été utilisées avec les sondes lipidiques pour valider la stratégie de photomarquage hydrophobe développée au cours de cette thèse. L'utilisation de ces protéines purifiées permet la simplification du modèle mis en place pour valider cette stratégie par rapport à l'utilisation d'une pseudo-particule virale ou d'un virus complet.

7. Le marquage d'affinité

Le marquage d'affinité a été développé pour étudier les interactions ligands/récepteurs, lipides/lipides ou encore lipides/protéines. Le but de cette méthode est d'identifier une cible spécifique (comme localiser des acides aminés formant le site de liaison d'un récepteur, identifier la composition d'une membrane ou encore marquer et/ou identifier une partie spécifique d'une protéine...) parmi un mélange de cibles potentielles (fig. I.18).

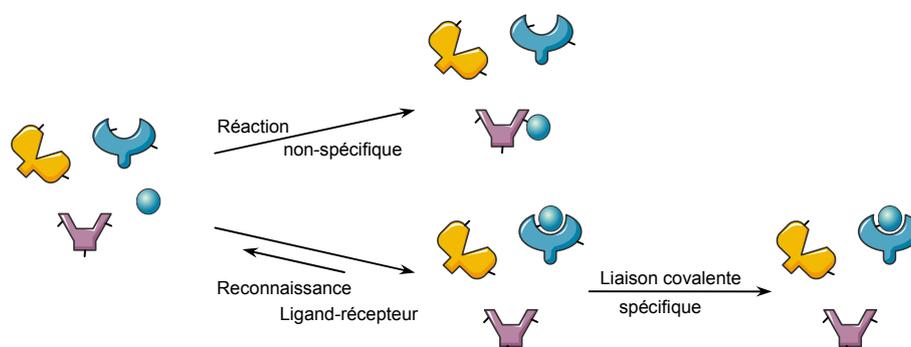


Figure I.18 : marquage d'affinité chimique : exemple de marquage ligand/récepteur d'après H. Bayley⁵⁸

Pour ce faire, la cible est incubée en présence de son ligand modifié par un groupement fonctionnel réactif. Celui-ci est conçu pour réagir et se lier de façon covalente avec un résidu spécifique de la cible et marquer celle-ci. Le premier exemple impliquant cette méthodologie fut l'identification d'un résidu histidine dans le site actif de la chymotrypsine avec la N-tosyl-L-phénylalanine chlorométhylcétone (TPCK)⁴¹(fig. I.19). TPCK est un analogue réactif du substrat naturel de la chymotrypsine. Il se lie au site actif de cette enzyme puis réagit de manière covalente à une histidine et l'inhibe de manière irréversible⁴².

⁴¹ G. Schoellmann and E. Shaw (1963). Direct Evidence for the Presence of Histidine in the Active Center of Chymotrypsin. *Biochemistry*, 2, 252-255

⁴² J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer (2002). Section 8.5, Enzymes Can Be Inhibited by Specific Molecules. *Biochemistry* 5th edition, W H Freeman

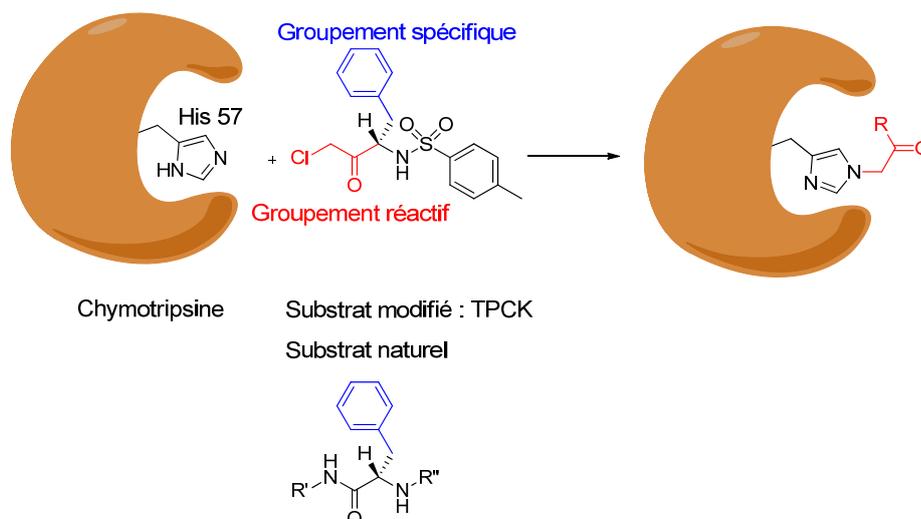


Figure I.19 : marquage d'affinité de la chymotrypsine par la TPCK. En bleu le groupement spécifique du substrat permettant une interaction spécifique entre le site actif du récepteur (la chymotrypsine) et son ligand (le substrat). En rouge le groupement réactif permettant l'attachement irréversible du substrat modifié au récepteur. Schéma d'après Berg et al.⁴²

Le défaut majeur de cette méthode réside dans le fait que le groupement fonctionnel réactif du ligand modifié est disponible durant la phase d'incubation et donc peut réagir ailleurs que sur la cible : du marquage non spécifique est donc possible. Le deuxième désavantage de cette méthode est la disponibilité du résidu spécifique du récepteur permettant la réaction entre le ligand et le récepteur, et donc la création d'une liaison covalente entre eux. Si ce résidu n'est pas ou peu disponible, l'attachement spécifique du ligand à la cible se fera peu, voire pas du tout : un mauvais rendement de marquage sera donc à déplorer.

7.1. Le photomarquage d'affinité

Le photomarquage d'affinité, comme pour le marquage d'affinité, consiste à marquer une molécule d'intérêt par une sonde possédant un groupement photoréactif en formant une liaison covalente entre ces deux entités : le ligand modifié et sa cible (fig. I.20). De nombreuses études ont été développées sur ce

sujet à partir des années 1960 par Westheimer⁴³ et son équipe mais aussi notamment à Strasbourg par le Pr. M. Goeldner^{44,45} tant au niveau de la modification du ligand que sur le groupement photoréactif.

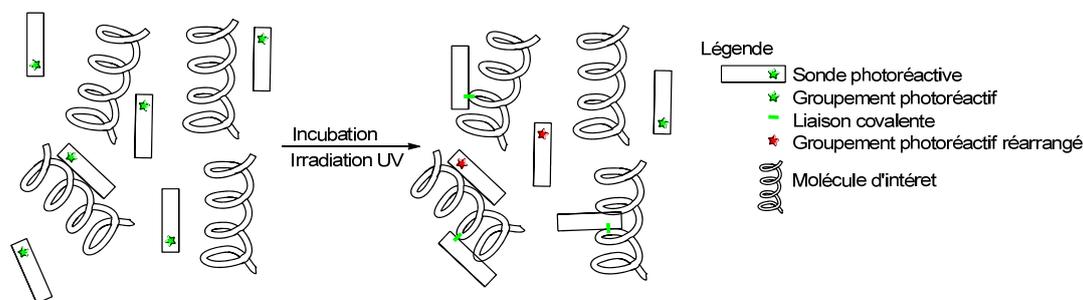


Figure I.20 : Réaction de photomarquage entre une molécule d'intérêt et une sonde photoréactive

Cette sonde photoréactive est une molécule, au départ, chimiquement inerte masquant un intermédiaire hautement réactif. Cet intermédiaire est démasqué par irradiation UV, à une longueur d'onde définie. Une fois démasqué, ce groupement est capable de réagir avec une fonction chimique ou un substrat présent dans son proche environnement en créant une liaison covalente.

La démocratisation de l'utilisation de cette technique par rapport à l'utilisation du marquage d'affinité simple est due principalement à deux avantages majeurs apportés par celle-ci. Le premier avantage de cette technique est la bonne stabilité chimique de la plupart des réactifs photoactivables : ce sont des molécules chimiquement inertes avant activation. Cette stabilité permet d'effectuer un ciblage spécifique d'un environnement ou d'un composé donné avant la photoactivation des réactifs permettant le marquage et l'analyse de ceux-ci. Le deuxième avantage de ces molécules photoréactives est l'exceptionnelle réactivité des intermédiaires photoactivés et leur capacité à réagir avec la majorité des groupements fonctionnels présents dans les

⁴³ A. Singh, E. R. Thornton, F. H. Westheimer (1962). The Photolysis of Diazoacetylchymotrypsin. *J. Biol. Chem.*, 237, 3006-3008

⁴⁴ B. L. Kieffer, M. P. Goeldner, C. G. Hirth (1981). Aryldiazonium salts as Photo-affinity labelling reagents for proteins. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 398-399

⁴⁵ F. Kotzyba-Hibert, I. Kapfer, M. Goeldner (1995). Recent Trends in Photoaffinity Labeling. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34, 1296-1312

biomolécules⁴⁶ et notamment avec les liaisons C-H qui sont normalement inertes vis-à-vis des réactifs chimiques classiques. Cette méthode ne nécessite pas la disponibilité d'un groupement fonctionnel particulier sur le site à marquer.

Malheureusement la complexité de la réaction de photomarquage conduit à un mélange de produits de réaction (réarrangement intramoléculaire, réaction avec le solvant...). Le but est, alors, de choisir le bon groupement photoréactif et de l'intégrer dans la bonne sonde moléculaire pour limiter les réactions secondaires et augmenter le rendement de la réaction de photomarquage.

7.1.1) Les premiers exemples d'applications du photomarquage d'affinité

- Identification d'un récepteur dans un mélange de protéines : l'identification du récepteur de l'insuline présent à l'état de trace dans les membranes plasmiques des cellules hépatiques a été réalisée en utilisant un dérivé de l'insuline photoactivable et radioactif (le 4-azido-2-nitrophenyl-insuline) pour pouvoir détecter l'adduit de photomarquage⁴⁷. Deux sous-unités du récepteur de l'insuline ont été identifiées à 135 et 90 KDa grâce à cette méthode.

- Identification d'un site de liaison au sein d'un polypeptide : après dégradation enzymatique ou chimique d'une cible, la région marquée par un réactif de photomarquage peut être identifiée et dans certains cas le site du marquage peut être précisément localisé⁴⁸.

- L'utilisation de réactifs de photomarquage hydrophobe pour marquer des lipides ou des protéines membranaires permet l'étude de la structure et de la composition des membranes⁴⁹. Après activation à une longueur d'onde spécifique, le réactif lipidique de photomarquage se lie de façon covalente avec

⁴⁶ J. Brunner (1993). New photolabeling and crosslinking methods. *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 483-514

⁴⁷ S. Jacobs, E. Hazum, Y. Shechter, P. Cuatrecasas (1979). Insulin receptor: covalent labeling and identification of subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 4918-4921

⁴⁸ A. R. Kerlavage and S. S. Taylor (1980). Covalent modification of an Adenosine. *J. Biol. Chem.* 255, 8483-8488

⁴⁹ R. Radhakrishnan, C. M. Gupta, B. Erni, R. J. Robson, W. Curatolo, A. Majumdar, A. H. Ross, Y. Takagaki, H. G. Khorana (1980). Phospholipids containing photoactivable groups in studies of biological membranes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 346, 165-198

ses plus proches voisins. L'utilisation de ce type de réactif permet d'étudier des complexes protéiques dans la membrane sans déstabiliser la bicouche lipidique.

7.1.2) Caractéristiques du réactif de photomarquage

Plusieurs caractéristiques sont indispensables aux réactifs de photomarquage et au groupement photoactivable porté par celui-ci pour garantir une capacité de photomarquage idéale en fonction de son utilisation (fig. I.21).

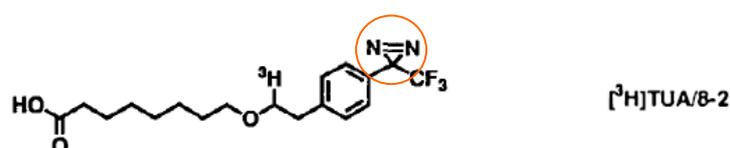


Figure I.21 : Exemple d'un réactif de photomarquage portant un *groupement photoactivable* d'après J. Brunner⁵¹

- Le réactif de photomarquage doit être stable chimiquement et photochimiquement pour éviter sa dégradation au cours du temps pendant son stockage. Il doit aussi être stable vis-à-vis des conditions opératoires utilisées lors des expériences biochimiques (ciblage avant irradiation) : variation de pH, conditions réductrices.... Le groupement photoactivable doit supporter les conditions de synthèse, de purification et de caractérisation du réactif de photomarquage s'il n'y est pas ajouté dans une dernière étape.

- Le groupement photoactivable porté par le réactif de photomarquage ne doit pas perturber ou déstabiliser l'environnement de ciblage du réactif de photomarquage. Par exemple, dans le cas d'un photomarquage entre un ligand et un récepteur, le groupement photoactivable doit être assez petit pour ne pas induire des perturbations stériques sur le ligand et baisser l'affinité de celui-ci pour son récepteur.

- L'activation du groupement photoactivable par irradiation UV, à une longueur d'onde donnée, ne doit pas endommager le système biologique à étudier. Sachant que les protéines et les acides nucléiques absorbent en dessous de 300 nm, le réactif de photomarquage doit être activable à une

longueur d'onde supérieure à 300 nm. Une fois activé, il doit réagir plus rapidement avec la cible avant que celui-ci ne se dégrade.

- La photoactivation du réactif doit former une seule espèce intermédiaire hautement réactive suffisamment stable pour ne pas conduire à un intermédiaire réarrangé moins réactif et par là-même à baisser le rendement de photomarquage.

- L'intermédiaire réactionnel produit par l'activation du groupement photoactivable doit pouvoir former un adduit stable avec la cible voulue. Cet adduit doit résister aux conditions expérimentales nécessaires pour l'identification précise de la zone de marquage comme par exemple un clivage chimique ou une digestion enzymatique.

7.2. Le Photomarquage hydrophobe de domaines protéiques membranaires

L'objectif principal de ce marquage hydrophobe est de déterminer la nature et la composition des lipides et des protéines enchâssées dans une membrane. L'approche photochimique utilisant des molécules comportant un groupement photoréactif (fig. 1.22) a été développée pour la première fois au courant des années 1970⁵⁰. Cette méthode permet l'étude structurale et fonctionnelle de cibles biologiques hydrophobes comme les domaines transmembranaires de protéines.

⁵⁰ A. Klip and C. Gilter (1974). Photoactive covalent labeling of membrane components from within the lipid core. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 1155-1162

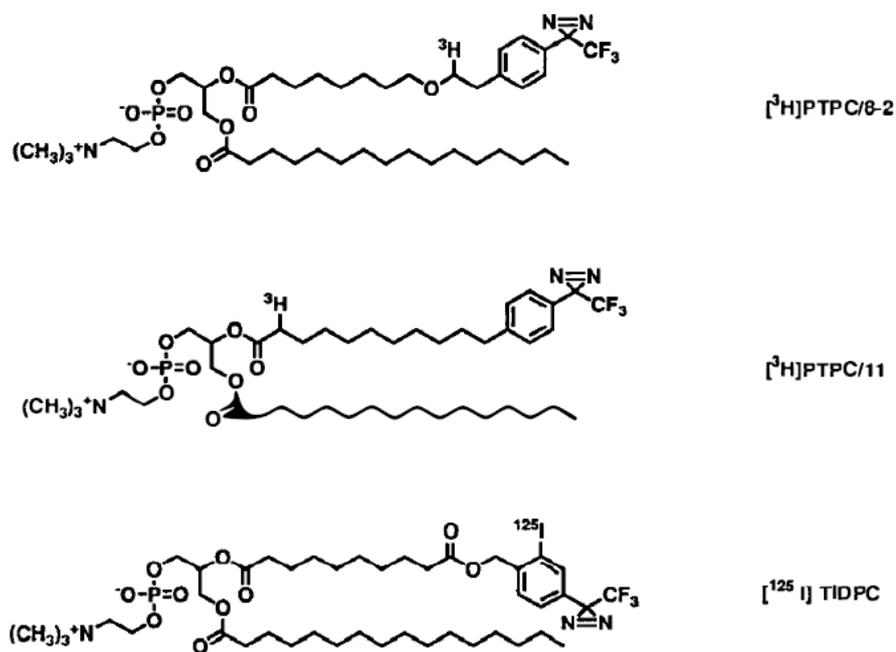


Figure I.22 : Exemple de réactifs de photomarquage d'affinité d'après J. Brunner⁵¹

Pour ce type de photomarquage une importance toute particulière doit être donnée à la réactivité du groupement photoactivable activé. Il est absolument nécessaire que cette espèce chimique soit assez réactive pour s'additionner sur une liaison C-H pour accroître le rendement de photomarquage des zones hydrophobes des protéines membranaires. En effet cette partie est formée principalement d'acides aminés à chaînes latérales aliphatiques chimiquement inertes⁵¹.

La majorité des réactifs photoactivables est basée sur la chimie des nitrènes ou des carbènes. Les précurseurs photoréactifs correspondant à cette chimie sont les groupements azoture, diazo et diazirine. Un troisième réactif photoactivable basé sur la chimie des cétones α,β -insaturées et plus

⁵¹ J. Brunner (1989). Photochemical Labeling of Apolar Phase of Membranes. Methods in Enzymology, 172, 628-686

particulièrement sur les aryl et diaryl cétones (benzophénones) a été développé ultérieurement et fera l'objet d'un chapitre à part entière (fig. I.23).

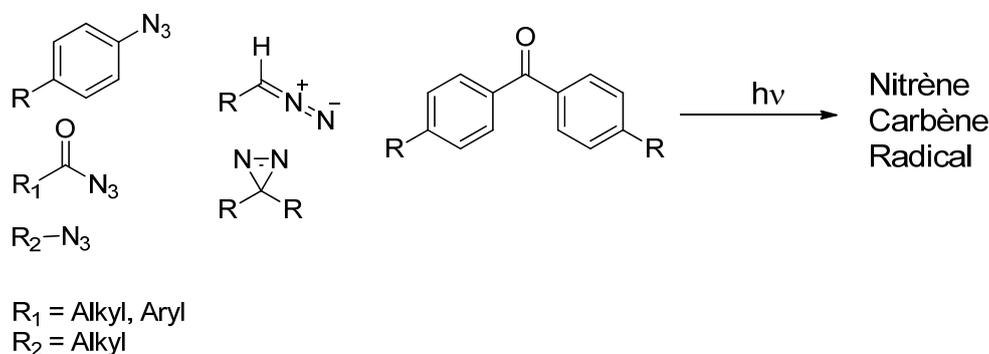


Figure I.23 : Les précurseurs photoréactifs et leur réactivité

7.3. Chimie des carbènes et des nitrènes

7.3.1) Généralités

Le problème majeur du photomarquage d'affinité hydrophobe de protéines membranaires est la composition même de ces entités biologiques. Les polypeptides membranaires les composant ne contiennent pas ou peu d'acides aminés à chaîne latérale réactive. Il a donc fallu trouver des réactifs ou intermédiaires chimiques ayant une grande réactivité et une faible sélectivité d'un groupement chimique donné et pouvant réagir avec la plupart des acides aminés ayant une chaîne latérale chimiquement inerte. Du fait de la production d'intermédiaires hautement réactifs car déficitaires en électrons, la chimie des carbènes et des nitrènes est donc apparue comme adaptée à cette problématique.

Le carbène et le nitrène les plus simples sont respectivement le méthylène et le nitrène : CH_2 et NH . Ils correspondent au produit de l'abstraction de deux atomes d'hydrogène sur le méthane ou sur l'ammoniac respectivement. Plus généralement, les carbènes et les nitrènes sont des espèces neutres (isoélectroniques) à six électrons de valence. C'est pour cela que ces espèces sont des électrophiles forts, ils cherchent en permanence à compléter leur

couche de valence avec une paire d'électrons. En général, les carbènes sont plus réactifs que leurs nitrènes correspondants mais finalement la chimie de ces deux espèces reste assez similaire.

Les carbènes et les nitrènes existent sous deux états d'énergie différents : l'état singulet et l'état triplet. C'est leur état électronique qui détermine le type de réaction engendrée.

Les réactions possibles de l'intermédiaire à l'état singulet sont (1) l'attaque électrophile π -électronique (addition sur une double liaison C=C), (2) l'attaque électrophile σ -électronique (insertion sur une liaison C-H), (3) l'attaque électrophile sur un doublet électronique non liant, (4) des réarrangements (réarrangement de Wolff fig. I.24).

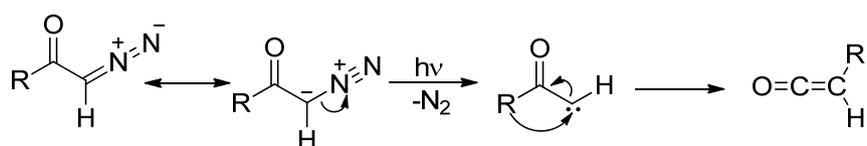


Figure I.24 : Réarrangement de Wolff

Les réactions possibles de l'intermédiaire à l'état triplet sont (1) l'attaque radicalaire sur une liaison σ (abstraction d'hydrogène), (2) l'attaque radicalaire sur une liaison π (addition sur une double liaison C=C pour former un diradical triplet), (3) l'attaque radicalaire sur un doublet non liant.

L'irradiation directe aux ultraviolets des composés azoture, diazo et diazirine conduit à l'état de transition singulet des nitrènes et carbènes correspondants et ceci du fait que leurs précurseurs existent normalement à l'état singulet (l'état de spin est conservé lors de la réaction de photomarquage). Les intermédiaires à l'état triplet des carbènes et des nitrènes peuvent être obtenus indirectement par la décomposition des azotures, composés diazo ou diazirines initialement convertis à l'état triplet par un agent photosensible.

7.3.2) Les nitrènes

Les précurseurs photoréactifs correspondant aux nitrènes sont les groupements azotures. Après photoactivation, ils génèrent une entité hautement réactive composée d'un azote monovalent.

a/ Les azotures d'aryle

Les azotures d'aryle sont les premiers groupements photoactivables utilisés dans la chimie de bioconjugaison⁵². Ils ont été fréquemment utilisés de par leur facilité de synthèse, leur relativement bonne stabilité chimique et leurs excellentes propriétés spectrales. La longueur d'onde d'activation de ces composés avoisine 300 nm, celle-ci augmente si le cycle aromatique est substitué.

Il a été clairement démontré que l'intermédiaire photoactivé d'un azoture d'aryle non substitué conduit principalement à la formation d'un azacycloheptatriène par une expansion de cycle intramoléculaire rapide. Les azotures d'aryle ne réagissent donc pas via un nitrène mais via cette nouvelle entité formée. Celle-ci est un bon électrophile mais reste moins réactive qu'un nitrène. Finalement au lieu de réagir, non sélectivement, sur une liaison C-H, les azacycloheptatriènes auront tendance à réagir préférentiellement avec des nucléophiles tels que les amines (fig. I.25).

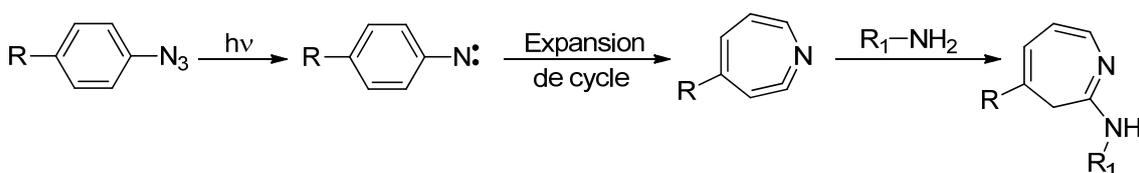


Figure I.25 : Formation de l'intermédiaire azacycloheptatriène via une expansion de cycle

Les azotures d'aryle substitués par des fluors ou par d'autres halogènes ont montré une meilleure efficacité de photomarquage car cette substitution rend plus difficile la réaction d'expansion de cycle après formation du nitrène. Dans ce

⁵² G. W. J. Fleet, R. R. Porter, J. R. Knowles (1969). Affinity labeling of antibodies with aryl nitrene as reactive group. Nature 224, 511-512

cas là, en irradiant une fonction azoture d'aryle substituée, celle-ci absorbe un photon pour générer un nitrène en perdant une molécule de diazote. Ce nitrène hautement réactif va arracher un proton d'une liaison C-H pour conduire au produit d'insertion voulu (fig. I.26).

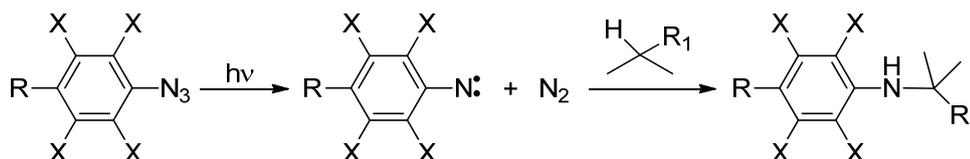


Figure I.26 : Photodécomposition d'un azoture d'aryle générant un nitrène suivi de son insertion sur une liaison C-H

b/ Les azotures d'acyle

Ces composés ont, pour le photomarquage de matériel biologique, une application limitée du fait de leur mauvaise stabilité. Ils sont rapidement hydrolysés dans l'eau, leur longueur d'activation est inférieure à 300 nm, ce qui engendre une dégradation du matériel biologique étudié et la plupart d'entre eux, une fois activés sous la forme d'un nitrène sont sujets à des réarrangements intramoléculeaires notamment celui de Curtius (fig. I.27).

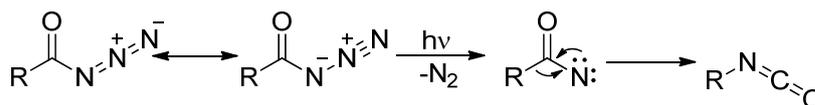


Figure I.27 : Réarrangement de Curtius

c/ Les azotures d'alkyle

Le maximum d'absorption de ces composés est aux alentours de 285 nm, longueur d'onde non compatible avec l'utilisation de matériel biologique. De plus l'insertion intermoléculaire sur une liaison C-H n'est pas observable en milieu organique du fait d'un rapide réarrangement intramoléculeaire. Une fois le nitrène formé, une migration d'hydrogène est observée pour former une imine (fig. I.28).

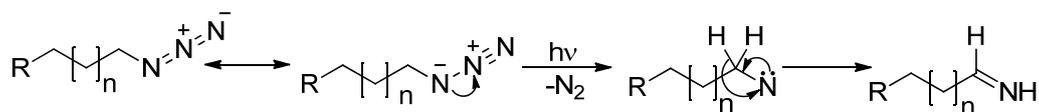


Figure I.28 : Migration d'hydrogène 1,2

7.3.3) Les carbènes

Les précurseurs photoréactifs correspondant aux carbènes sont les groupements diazo et diazirine. Après photoactivation, ils génèrent une entité hautement réactive composée d'un carbone divalent (fig. I.29).



Figure I.29 : Structure d'un carbène

a/ Les composés diazo

Les premiers réactifs de photomarquage utilisés sont les esters d'acide diazoacétique⁵³ (fig. I.30 **A**). Ces composés ont deux désavantages majeurs : ils ont une stabilité limitée même à l'obscurité et subissent, après photoactivation, un réarrangement de Wolff (fig. I.24). L'introduction des esters d'acide 2-diazo-3,3,3-trifluoropropionique (fig. I.30 **B**) a été une avancée majeure pour améliorer la stabilité chimique et le rendement de photomarquage de ce type de composés, la forme réarrangée est moins observée après irradiation.

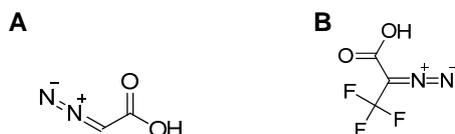


Figure I.30 : **A** acide diazoacétique, **B** acide 2-diazo-3,3,3-trifluoropropionique

D'autres composés diazo comme le *p*-toluène sulfonyldiazoacétate et le (dansyldiazométhyl)phosphinate ont été développés (fig. I.31). Ces composés ne

⁵³ A. Singh, E. R. Thornton, F. H. Westheimer P. C. (1962). The photolysis of Diazoacetylchymotrypsin. J. Biol. Chem., 237, 3006-3008

sont pas adaptés au photomarquage hydrophobe d'affinité car ils sont trop polaires et trop encombrés.

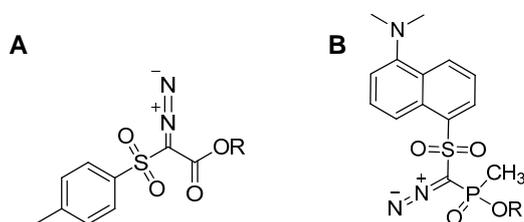


Figure I.31 : **A** *p*-toluène sulfonyldiazoacétate , **B** (dansyldiazométhyl)phosphate

Malheureusement la plupart des composés diazo ne sont pas idéaux pour réaliser du photomarquage d'affinité car leur longueur d'onde d'activation est inférieure à 300 nm.

b/ Les diazirines

Cette catégorie de composés a été découverte dans les années 1960⁵⁴, et au début des années 1970, Smith et Knowles⁵⁵ ont décrit pour la première fois la synthèse du 3-aryl-3H-diazirine. Ces composés et leurs analogues comme le 3-trifluorométhyl-3-aryldiazirine introduit comme réactif photoactivable dans les années 1980, sont d'une remarquable stabilité vis-à-vis d'un grand nombre de conditions chimiques (acide fort, base forte ou agent réducteur comme NaBH₄) et sont efficacement photoactivés dans le proche UV ($\lambda_{\text{activation}}$ de 350 à 380 nm) pour générer un carbène très réactif (fig. I.32). Malheureusement l'irradiation des diazirines conduit aussi à la formation d'un photoisomère : un composé diazo linéaire moins réactif.

⁵⁴ S. R. Paulsen (1960). 3,3-Dialkyl-diazacyclopropen. Angew. Chem., 72, 781

⁵⁵ R. A. G. Smith and J. R. Knowles (1973). Aryldiazirine. Potential Reagents for photolabeling of biological receptor sites. J. Am. Chem. Soc., 95, 5072-5073

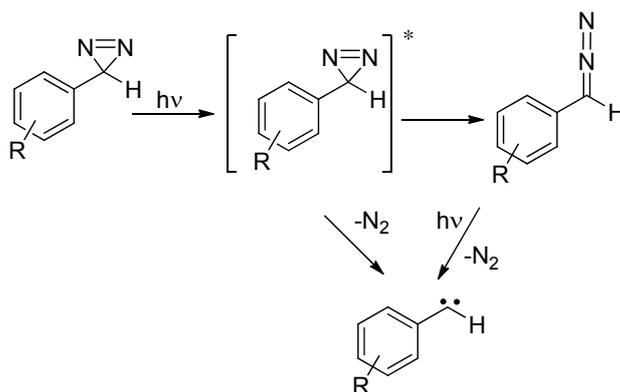


Figure I.32 : Schéma général de la photoactivation d'une 3-aryl-3H-diazirine.

7.4. Les benzophénones

L'utilisation des aryl-cétones comme sondes photoactivables date du début des années 1970 : la première application d'une benzophénone activée dans un système biologique a été décrite en 1974 par l'équipe de Galardy⁵⁶. Cependant, leur potentiel comme sondes photoactivables a été longtemps sous-estimé. Elles ont été redécouvertes et réutilisées comme sondes biochimiques au cours des années 1980 : la benzophénone a été utilisée comme réactif photoactivable pour fonctionnaliser des liaisons C-H dans les stéroïdes⁵⁷. En 1983 seulement peu d'exemples d'utilisation de la benzophénone comme sonde photoactivable ont été décrits⁵⁸. Trois années plus tard, les indices s'accumulent montrant l'utilité et les avantages à utiliser les dérivés de la benzophénone pour obtenir des modifications covalentes de nucléotides⁵⁹. Ces dérivés photoactivables sont maintenant largement utilisés pour des études d'interaction peptide-protéine. Ces dérivés ont même montré une meilleure commodité d'utilisation que leurs analogues azotures d'aryle ou diazirine précédemment employés.

⁵⁶ R. E. Galardy, L. C. Craig, J. D. Jameison, M. P. Printz (1974). Photoaffinity labeling of peptide hormone binding sites. *J. Biol. Chem.*, 249, 3510-3518

⁵⁷ R. Brelow (1980). Biomimetic control of chemical selectivity. *Acc. Chem. Res.*, 13, 170-177

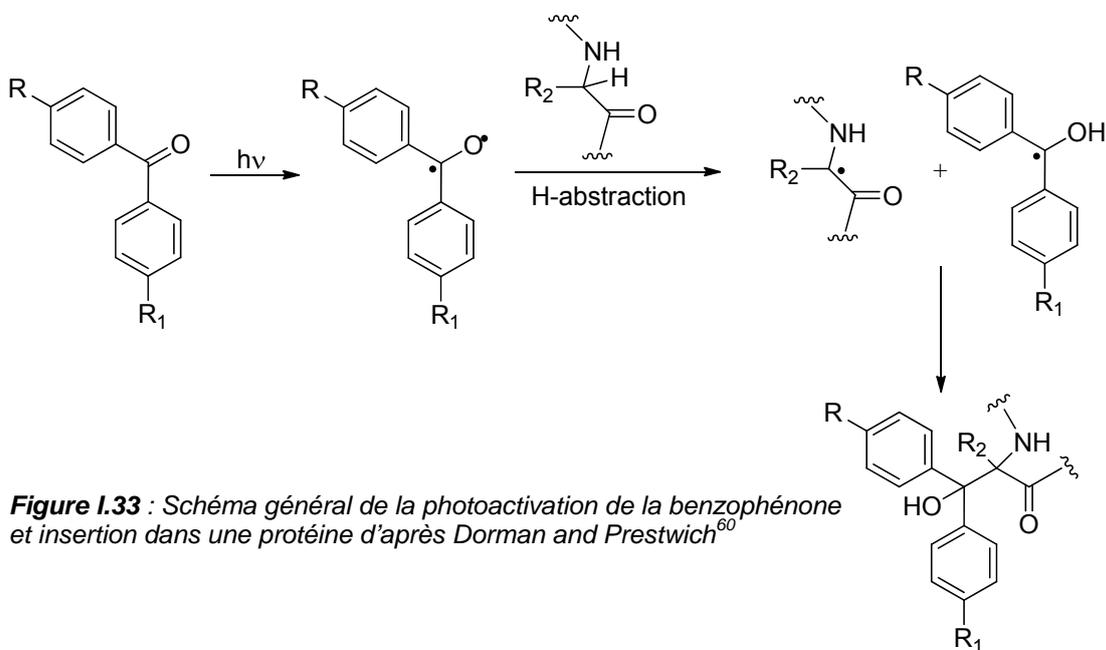
⁵⁸ H. Bayley (1983). *Photogenerated reagents in biochemistry and molecular biology*. Elsevier, 1-187

⁵⁹ N. Williams, S. H. Ackerman, P. S. Coleman (1986). Benzophenone-ATP : A photoaffinity Label for active site of ATPases. *Methods Enzymol.*, 126, 667-682

L'utilisation généralisée de la benzophénone comme groupement photoactivable est principalement attribuée à trois avantages chimiques et biologiques. Le groupement benzophénone porté par un réactif de photomarquage est chimiquement et photochimiquement plus stable que les groupements diazo, azotures d'aryle et diazirines : il peut être manipulé à la lumière du jour sans être dégradé. Ensuite la longueur d'onde d'activation de la benzophénone se situe entre 350 et 360 nm évitant les longueurs d'onde destructrices pour les protéines. Enfin les benzophénones réagissent préférentiellement avec liaisons C-H chimiquement inertes même en présence d'eau et en présence de la plupart des nucléophiles.

7.4.1) Mécanisme d'activation – photoréduction du groupement carbonyle

Ces dérivés sont activés entre 350 nm et 360 nm. L'irradiation de la benzophénone dans cette zone de longueur d'onde permet l'absorption d'un photon (fig. I.33). Il en résulte le transfert d'un électron de l'orbitale n sp^2 non liante de l'oxygène à l'orbitale π^* antiliante du groupement carbonyle pour former, en cassant la double liaison, un diradical dans un état triplet.



Ce diradical formé est capable de réagir avec les liaisons C-H. Le déficit électronique de l'orbitale n de l'atome d'oxygène engendre une entité électrophile. Cet électrophile va interagir avec une liaison σ C-H d'une espèce proche pour aboutir à l'abstraction de l'hydrogène de cette liaison pour compléter son orbitale n. L'abstraction de l'hydrogène de l'acide aminé se produit sur le carbone α pour former l'entité radicalaire. Il en résulte deux nouvelles entités radicalaires : un radical diphenyl hydroxy méthyle et un acide aminé radicalaire. Ces deux radicaux vont se recombinaer via une liaison covalente pour former le produit de photomarquage d'intérêt : l'insertion du groupement benzophénone sur la protéine, un composé de type benzopinacol est ainsi formé. Si la molécule ne trouve pas de donneur d'hydrogène à proximité (2,5 Å à 3,1 Å)⁶⁰ ayant une orientation favorable à une interaction, la réaction ne se produit pas. La benzophénone va alors rapidement retourner à son état initial. L'activation par irradiation de la benzophénone ne conduit donc pas à un composé inactivé si celui-ci ne réagit pas immédiatement contrairement aux dérivés arylazotures ou diazirine. L'irradiation de la benzophénone est donc réversible alors que pour les autres groupements photoactivables elle est irréversible, il s'agit là d'un des avantages majeurs de ce groupement. Le groupement benzophénone peut ainsi enchaîner les cycles excitation-relaxation jusqu'à avoir la bonne géométrie pour interagir avec un donneur d'hydrogène. Grâce à ce phénomène, le rendement de photomarquage avec la benzophénone est plus élevé qu'avec les autres groupements photoactivables.

Les liaisons C-H, donneurs d'hydrogène favorables à l'interaction protéine/benzophénone, sont abondantes dans les protéines et plus encore dans les acides aminés membranaires mais absentes dans les solvants les plus utilisés et particulièrement dans l'eau, milieu prépondérant aux expériences biologiques. Le diradical généré par l'irradiation ne va pas réagir avec la plupart des solvants nucléophiles et protiques à l'inverse des nitrènes et carbènes très réactifs. L'espèce formée n'a pas non plus la possibilité d'effectuer un

⁶⁰ G. Dorman and G. D. Prestwich (1994). Benzophenone Photophores in Biochemistry. *Biochemistry*, 19, 5661-5673

réarrangement intramoléculaire. Elle n'a donc que deux possibilités : soit se coupler avec son plus proche voisin ayant une liaison C-H convenablement orientée, soit retourner à l'état initial d'où elle peut être réactivée par un nouveau photon. C'est pour ces raisons que les benzophénones sont des groupements photoactivables plus efficaces que les systèmes basés sur des groupements azotures.

Ainsi la réaction d'insertion sur une liaison C-H de la benzophénone produit principalement un adduit covalent chimiquement stable et stable aussi vis-à-vis des clivages enzymatiques, ce qui est intéressant pour une utilisation ultérieure (analyses chimiques, expériences biologiques : digestion) de l'adduit formé.

Le taux de liaison du groupement benzophénone peut atteindre 40%⁶¹. Ce rendement de marquage est atteint lorsqu'un phospholipide contenant un groupement benzophénone inséré dans un liposome préparé avec 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine (DML) est photoactivé et donc réagit avec le DML. Les rendements de photomarquage de la benzophénone sont corrects quant celle-ci est insérée dans un système organisé (liposome ou particule lipidique) mais le rendement de marquage peut tomber à moins de 0,1 %⁶² dans certains systèmes hétérogènes.

A Strasbourg, l'équipe du Pr. Ourisson a mené une étude sur la réactivité de la benzophénone sur des acides aminés par photoactivation⁶³. Il en ressort que la photoalkylation d'un acide aminé par la benzophénone en milieu organique forme principalement le produit de couplage sur le carbone α de l'acide aminé pour la glycine, l'alanine et la phénylalanine. Par contre, dans le cas de la méthionine, la benzophénone réagit plutôt sur le carbone γ (carbone adjacent au sulfure) ou sur le groupement méthyle porté par la fonction sulfure.

⁶¹ B. John, E. R. Kumar, A. K. Lala (2000). Depth-dependent analysis of membranes using benzophenone-based phospholipids. *Biophysical Chemistry*, 87, 37-42

⁶² C. Montecucco, G. Schiavo (1986). 1-Pamitoyl-2-(*p*-benzoyl)benzoyl phosphatidylcholine, a photoactive phospholipid for the labeling of membrane components. *Biochem. J.*, 237, 309-312

⁶³ E. Deseke, Y. Nakatani, G. Ourisson (1998). Intrinsic Reactivities of Amino Acids towards Photoalkylation with Benzophenone – A Study Preliminary to Photolabelling of the Transmembrane Protein Glycophorin A. *Eur. J. Org. Chem.*, 243-251

L'avantage de la méthionine démontré par cette étude est qu'elle a une bonne réactivité mais aussi une bonne stabilité de l'adduit de photomarquage formé.

Dans tous les cas testés, la réaction de couplage est réalisée après photoactivation entre la forme radicalaire de la benzophénone et le radical acide aminé le plus stable.

Cette étude sur la réactivité de la benzophénone avec les acides aminés a été réalisée en solution et a aussi prouvé que les rendements dépendent du système utilisé : en solution (haut degré de liberté) les rendements sont plus faibles comparés aux rendements de cette réaction effectuée dans une membrane (système organisé, moins libre).

7.5. Bilan

Voici résumés les différents groupements photoréactifs existant depuis les années 1970 (tab. I.1). Il est à savoir que dans chaque catégorie, une multitude de molécules et d'analogues a été développée en fonction de la problématique posée. Les rendements de couplage de la réaction de photomarquage de ces composés varient fortement en fonction de l'environnement étudié et du type de molécules utilisées.

		longueur d'onde d'activation (en nm)	Stabilité
Les nitrènes			
azoture d'aryle	non substitué	<300	Expansion de cycle ⁴⁶
	substitué	~300	
azoture d'acyle		<300	Réarrangement de Curtius ⁵¹
azoture d'alkyle		~285	Migration d'hydrogène ⁵¹
Les carbènes			
Diazo		~340	Réarrangement de Wolff ⁵¹
Diazirine		350-380	
Les benzophénones		350-360	

Tableau I.1 : Les différents groupements photoréactifs, leur longueur d'onde d'activation et leur stabilité

La réussite d'un couplage de deux entités par une réaction de photomarquage d'affinité n'implique pas seulement le choix du groupement photoréactif mais aussi le réglage de plusieurs autres paramètres. Ces paramètres sont le substrat à marquer, l'environnement de la réaction, la spécificité voulue du marquage ou encore le temps d'irradiation en fonction desquels sera choisie la bonne molécule de photomarquage avec le bon groupement photoréactif pour conduire au rendement de marquage maximal.

Dans un premier temps, la conception et la synthèse d'une sonde lipidique de référence (SLR) est détaillée dans une première partie, suivie par la synthèse d'analogues de la sonde lipidique de référence : ces analogues sont le résultat de la variation de la position du groupement photoactivable, du changement de traceur et de la modification de la plateforme trifonctionnelle.

Une seconde partie est consacrée d'abord à la caractérisation de l'activité des sondes fluorescentes, à l'optimisation du protocole de photomarquage et à leur capacité de photomarquage de protéines membranaires modèles. Ce premier point est suivi de l'application de cette méthode à la caractérisation et à l'identification plus précise de la zone marquée des protéines utilisées en spectrométrie de masse. Pour terminer cette partie, des solutions sont mises en place pour améliorer le protocole d'identification de zones marquées en utilisant d'autres analogues et en augmentant le rendement de photomarquage. Des expériences préliminaires sont menées sur le VHB et VHC_{pp}.

Une troisième partie est développée sur des projets annexes effectués durant cette thèse sur la synthèse de composés lipidiques bicaténaires polyfonctionnels.

***II. Conception et synthèse des
sondes lipidiques***

1. Conception générale d'une famille de sondes lipidiques

Pour pouvoir étudier les interactions protéines/lipides, une nouvelle famille de composés multifonctionnels lipidiques ayant la capacité de réaliser du photomarquage d'affinité hydrophobe a été développée. La démarche de conception de cette famille est ici résumée. La molécule-cible doit posséder trois fonctionnalités : i) avoir la structure d'un lipide bicaténaire, ii) posséder un groupement photoréactif, et iii) porter un traceur. Ces trois fonctionnalités sont connectées ensemble par une plateforme de liaison multifonctionnelle (PFL) comme par exemple un tri-acide, une tri-amine, un dérivé du glycérol ou encore un acide aminé possédant au moins trois groupements réactifs (fig. II.1).

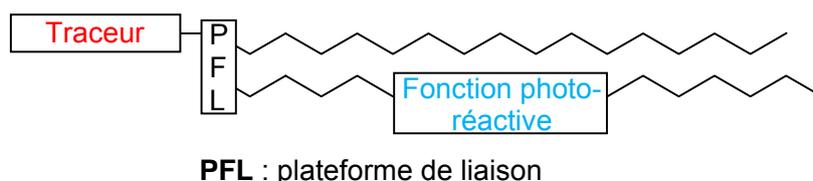


Figure II.1 : Structure générale de la sonde lipidique

La structure lipidique des sondes est indispensable pour permettre leur insertion, de façon stable et non réversible, au sein d'un système hydrophobe : micelle de détergent ou bicouche lipidique⁶⁴ (fig. II.2).

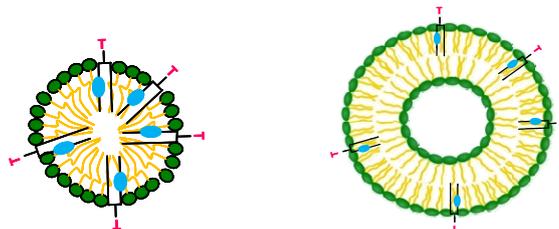


Figure II.2 : Sondes lipidiques soit en micelle de détergent à gauche, soit dans un liposome à droite

Ce type d'organisation supramoléculaire est nécessaire pour "solubiliser" les sondes lipidiques dans un milieu aqueux et pour qu'elles puissent interagir

⁶⁴ R. M. Epand (1997). Biophysical Studies of Lipopeptide-Membrane Interactions. Biopolymers, 43, 15-24

avec le matériel biologique hydrophobe étudié, principalement des protéines transmembranaires enchâssées dans des micelles de détergent. La structure lipidique choisie est composée d'une chaîne grasse saturée de 16 carbones et d'une deuxième chaîne grasse contenant un groupement photoréactif (fig. II.3). Cette deuxième chaîne grasse intégrant le groupement photoréactif doit répondre à deux fonctionnalités : i) être assez longue pour s'insérer dans un système lipidique, ii) être photoactivable et ainsi réagir avec des acides aminés hydrophobes présents dans son voisinage.



Figure II.3 : Structure de l'acide gras intégrant le groupement photoréactif

L'intégration du groupement photoréactif dans une chaîne grasse permet aussi sa bonne orientation au sein de la couche lipidique et surtout permet d'éviter un retournement de celui-ci vers l'extérieur du système lipidique⁶⁵.

Enfin le traceur intégré aux sondes lipidiques doit permettre la détection et/ou la purification des produits résultant de la réaction de photomarquage pour pouvoir les identifier et les analyser. A ce stade de la conception, il peut être un élément radioactif, un chromophore ou une molécule d'intérêt reconnue par un substrat comme la biotine.

2. Conception et synthèse de la sonde lipidique de référence

Le groupement photoréactif choisi pour la première sonde lipidique conçue est la benzophénone positionnée au milieu d'un acide gras. Ce choix repose sur les arguments avancés chapitre I.7.4. Le traceur intégré à cette sonde est un fluorophore. Les trois fonctionnalités indispensables à notre sonde sont connectées ensembles via une plateforme de liaison trifonctionnelle (fig. II.4).

⁶⁵ A.K. Lala (2002). Fluorescent and photoactivable probes in depth dependent analysis of membrane. *Chemistry and Physics of Lipids*, 116, 177-188

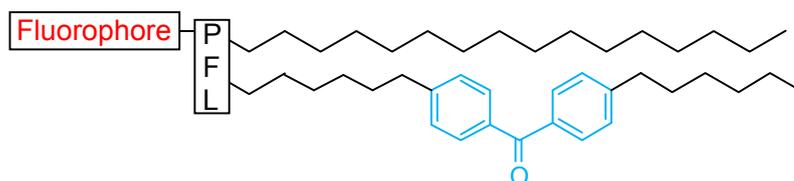


Figure II.4 : Structure générale de la sonde lipidique de référence

2.1. La plateforme liaison (PFL)

La plateforme de liaison trifonctionnelle choisie est un acide aminé commercial, l'acide $N\alpha$ -*t*-Butyloxycarbonyl-L-2,3-diaminopropionique (Boc-L-Dpr-OH, fig. II.5 A).

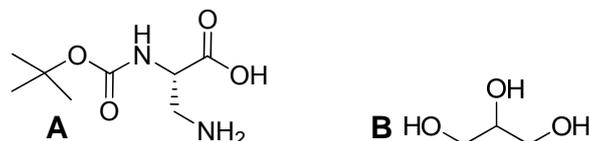


Figure II.5 : A. Structure de Boc-L-Dpr-OH, B. Structure du glycérol

Cet acide aminé présente l'avantage de posséder trois groupements fonctionnels différents : une amine libre, un acide carboxylique et une amine protégée. L'utilisation de ce squelette nous évite plusieurs étapes de protection-déprotection lors de la synthèse de la sonde *a contrario* d'un squelette multifonctionnel dont les fonctions ne sont pas ou peu différenciées comme par exemple le glycérol (fig. II.5 B).

La connexion des différentes fonctionnalités sur notre plateforme Boc-L-Dpr-OH est effectuée par couplage peptidique, en formant des liaisons amides. La liaison amide a l'avantage d'être stable et résistante aux conditions expérimentales envisagées⁶⁶ : tant lors de la synthèse que du photomarquage. Pour que la réaction de formation d'une liaison amide entre une amine libre et un acide carboxylique fonctionne, il est nécessaire d'activer le groupement carboxyle mis en jeu avec un agent de couplage (fig. II.6).

⁶⁶ L. Bourel-Bonnet, E. I. Pécheur, C. Grandjean, A. Blanpain, T. Baust, O. Melnyk, B. Hoflack, H. Grass-Masse (2005). Anchorage of Synthetic Peptides onto Liposomes via Hydrazone and α -Oxo Hydrazone Bonds. Preliminary Functional Investigation. *Bioconj.Chem.*, 16, 450-457

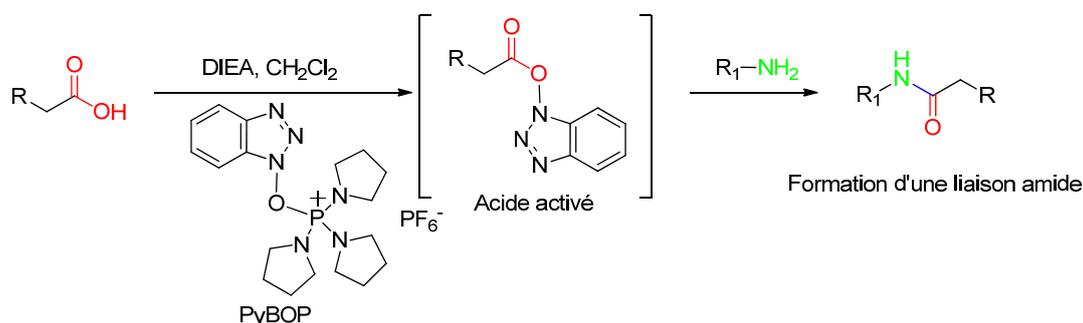


Figure II.6 : Formation d'une liaison peptidique.

Les premiers agents de couplage activateurs des groupements carboxyles développés ont été les carbodiimides comme le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) permettant la formation d'urées *O*-acylées hautement réactives (fig. II.7 **A**). Malheureusement les intermédiaires formés sont très réactifs, ce qui peut provoquer la racémisation des acides aminés⁶⁷. Pour pallier ce problème, de nouvelles molécules telles que le 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) et le 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt), son analogue azoté, ont été développées. Ces agents de couplage réagissent avec les urées *O*-acylées obtenues grâce aux carbodiimides pour former des esters activés moins réactifs donc plus stables, ce qui diminue la possibilité de racémisation³ (fig. II.7 **B**).

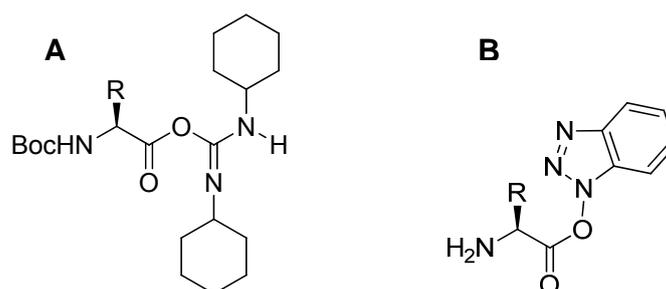


Figure II.7 : (A) Urée *O*-acylée formée par la réaction du DCC avec un acide aminé. (B) Ester activé d'un acide aminé formé par la réaction de l'urée *O*-acylée **A** avec HOBT ou formé directement par réaction avec PyBOP.

⁶⁷ L. A. Carpino (1993). 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An Efficient Peptide Coupling Additive. *Journal of the American Chemical Society* 115, 4397-4398

Mais ce type d'activation du groupement carboxyle donne, dans certains cas, des rendements de réaction insuffisants pour ce type de réaction⁶⁸ et les agents de couplage cités, notamment le monohydrate d'HOBt, ont été récemment classifiés comme explosifs⁶⁹.

D'autres agents de couplage ne nécessitant plus l'utilisation des carbodiimides ont été développés. L'ester activé est obtenu directement en solution sous la forme d'un sel d'uronium ou de phosphonium d'un anion «spectateur» non nucléophile comme le tétrafluoroborate ou l'hexafluorophosphate. Ces agents de couplages sont par exemple l'HBTU (hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium), le BOP (hexafluorophosphate de benzotriazoloyloxy)-tris(diméthylamino)-phosphonium) ou le PyBOP (hexafluorophosphate de benzotriazoloyloxy-tris[pyrrolidino]-phosphonium)⁷⁰ (fig. II.8).

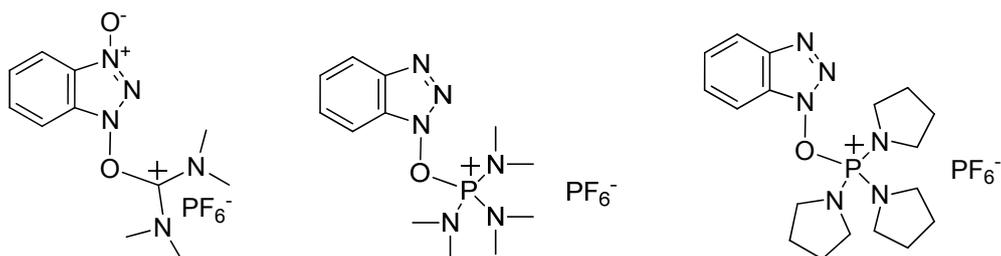


Figure II.8 : Structures de l'HBTU, du BOP, du PyBOP

Malheureusement l'utilisation du BOP ou de son analogue l'HBTU génère des résidus toxiques comme l'hexaméthylphosphoramid⁷¹ (HMPA) et la tétraméthylurée respectivement (fig. II.9), connus pour être des agents alkylants carcinogènes. C'est pour cela que nous avons préféré utiliser le PyBOP comme agent de couplage.

⁶⁸ E. Frérot, J. Coste, A. Pantaloni, M. Dufour, P. Jouin (1991). PyBOP and PyBroP : two reagents for the difficult coupling of the α,α -dialkyl amino acid. *Tetrahedron* 47, 259-270

⁶⁹ K. D. Wehrstedt, P. A. Wandrey, D. Heitkamp (2005). Explosive properties of 1-hydroxybenzotriazoles. *Journal of Hazardous Materials* 126, 1-7

⁷⁰ Coste, J., Le-Nguyen, D. and Castro, B (1990). PyBOP(R): A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Letters* 31, 205-208

⁷¹ IARC monographs (1999) vol 71, 1465-1481



Figure II.9 : Structure de l'HMPA et de la tétraméthylurée

Les réactions de couplage peptidique réalisées avec le PyBOP donnent d'aussi bons rendements qu'avec le BOP ou l'HBTU. Cependant cet agent a l'avantage d'être dépourvu de toxicité du fait du remplacement des groupements diméthylamine par des groupements pyrroles. Bien sûr d'autres agents de couplage existent et sont utilisés en fonction de la réaction mise en jeu. Ce sont soit des agents de couplage plus réactifs pour réaliser des réactions de couplages peptidiques difficiles, soit des agents de couplage permettant une baisse de la racémisation lors de la réaction⁷².

2.2. Le fluorophore

Historiquement, la détection de l'adduit de photomarquage entre un réactif de photomarquage et une protéine ou une molécule d'intérêt est assurée par un élément radioactif : [¹²⁵I], [¹³¹I], [³H], [¹⁴C] principalement⁷³. Cet élément est attaché de manière covalente au réactif de photomarquage et nécessite donc une étape de synthèse délicate et la manipulation d'un radioélément tout au long des expérimentations. Même si cette méthode est efficace et parfaitement décrite, elle engendre un certain nombre de désavantages : une faible activité spécifique de certains analogues radioactifs, une durée de demi-vie courte (8,02 jours pour ¹³¹I)⁷³, la toxicité des éléments manipulés (rayonnement γ pour ¹²⁵I), une réglementation en vigueur complexe pour la manipulation d'éléments radioactifs (demande de licence à l'IRSN, installation spécifique) et le coût élevé de traitement des déchets. C'est pour cela qu'un fluorophore a été choisi en lieu

⁷² Merck, Novabiochem (2008/2009). Peptide Synthesis, Coupling reagents and additives. 265-270

⁷³ J. Brunner (1989). Photochemical Labeling of Apolar Phase of Membranes. Methods in Enzymology, 172, 628-687

et place, pour nous permettre de suivre et de valider notre stratégie de marquage par détection de fluorescence, sans utiliser de radioéléments. Le fluorophore choisi est la 5,6-carboxy-tétraméthyl-rhodamine (5,6-CTMR) (fig. II.10) pour sa stabilité dans les conditions de synthèse et d'utilisation envisagées :

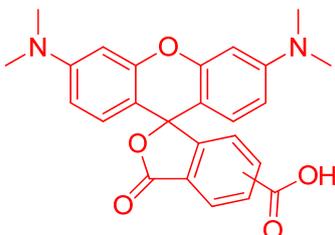


Figure II.10 : Structure de la 5,6-carboxy-tétraméthyl-rhodamine

le cœur rhodol de la rhodamine est photostable et est relativement insensible aux changements de pH. Cette rhodamine est disponible commercialement sous la forme d'un mélange de régioisomères. Il a été montré précédemment que la présence de ces deux isomères n'a pas d'influence sur les résultats des expériences effectuées avec les sondes lipidiques dont il est question dans ce manuscrit⁷⁴.

2.3. Le dérivé photoactivable : synthèse de l'acide 6-(4-(4-n-hexyl benzoyl)phényl) hexanoïque, C₆-BP-C₅-COOH (1)

Il n'existe pas d'acide gras contenant une benzophénone répondant aux critères de longueur exposés plus haut disponibles dans le commerce. Un premier composé ayant la benzophénone au milieu de la chaîne aliphatique de l'acide gras décrit par l'équipe de E. R. Kumar⁷⁵ a été choisi. La position de la benzophénone par rapport à la fonction acide carboxylique a été choisie pour minimiser la gêne stérique entre les deux chaînes grasses et pour assurer la meilleure stabilité possible et la bonne orientation de ce dérivé benzophénone

⁷⁴ P. Jolimaitre, A. Roux, A. Blanpain, C. Leduc, P. Bassereau, L. Bourel-Bonnet (2005). Synthesis and preliminary physical applications of a rhodamin-biotin phosphatidylethanolamine, an easy attainable lipid double probe. *Chemistry and Physics of Lipids*, 133, 215-223

⁷⁵ A. K. Lala, E. R. Kumar (1993). Orientation of the benzophenone group at various depths in bilayers. *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 3982-3988

une fois inséré dans une bicouche lipidique. La synthèse de ce dérivé a été réalisée suivant la méthode de A. K. Lala⁵² sans optimisation à partir de l'acide 6-phénylhexanoïque et du chlorure de 4-hexylbenzoyl commercialement disponibles en trois étapes (fig. II.11).

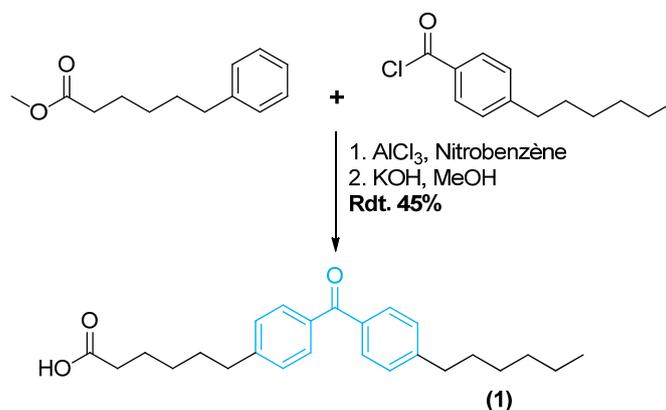


Fig. II.11 : Schéma général de la synthèse de **C₆-BP-C₅-COOH 1**

La première étape consiste en la protection de l'acide 6-phénylhexanoïque en son ester méthylique correspondant. Ensuite le 6-phénylhexanoate de méthyle est couplé au chlorure de 4-hexylbenzoyl via une réaction de substitution électrophile. Cette réaction d'acylation de Friedel-Crafts est effectuée en présence du trichlorure d'aluminium comme acide de Lewis. La dernière étape consiste en la déprotection de l'ester méthylique obtenu par une saponification à l'aide d'une solution de potasse dans le méthanol pour conduire au produit **1** sous la forme d'un solide gras légèrement jaune. Le rendement global de ces trois étapes est de 45 %.

2.4. Ordre d'introduction des fonctionnalités de la sonde sur la plateforme

Le premier groupement fonctionnel inséré sur la plateforme de liaison trifonctionnelle est l'acide gras contenant le groupement photoactivable (**a**) (fig. II.12). Son insertion au début de la synthèse nous permet d'avoir un suivi facile de l'avancement de nos différentes étapes de réaction grâce aux propriétés

spectrales du groupement photoactivable, la benzophénone. Celle-ci est visible en UV à 254 nm ce qui permet de suivre nos réactions par CCM. Ensuite, la deuxième étape consiste en l'insertion de la deuxième chaîne aliphatique : l'hexadécylamine (**b**). L'étape suivante est la déprotection de la deuxième amine de notre plateforme pour l'avoir sous sa forme libre nécessaire à la suite de la synthèse. La dernière étape est la fixation du fluorophore 5,6-CTMR sur la plateforme (**c**). La rhodamine est fixée à la fin du processus à cause des difficultés de purification engendrées par l'entité formée (mélange de deux régioisomères) et pour limiter les quantités de réactif engagées.

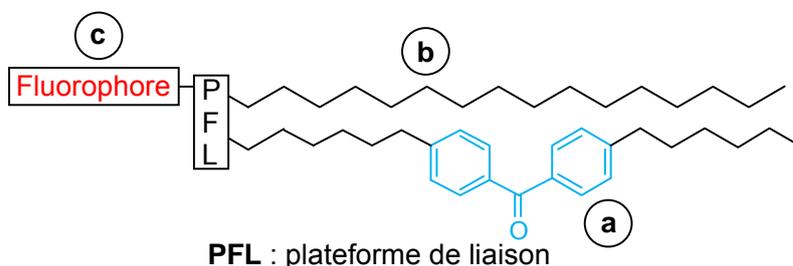


Figure II.12 : Ordre d'introduction des fonctionnalités sur la plateforme

2.5. Synthèse de la sonde lipidique de référence Rhod-Dpr(CO-C₅-BP C₆)-NH-C₁₆H₃₃ (5)

Il faut donc 4 étapes à partir de l'acide gras (C₆-BP-C₅-COOH **1**) et de l'acide aminé Boc-L-Dpr-OH pour conduire à une sonde lipidique bicaténaire polyfonctionnelle (fig. II.13).

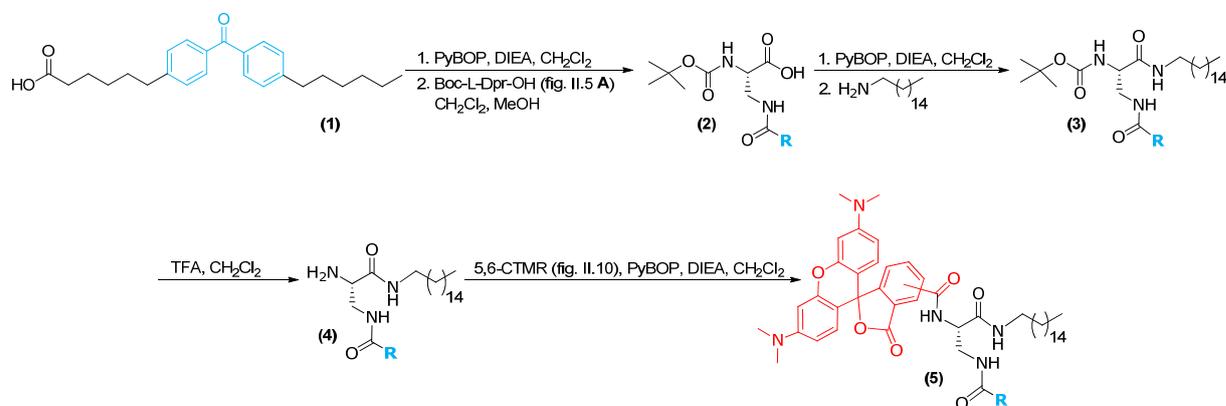


Figure II.13 : Schéma de la synthèse de la sonde lipidique de référence 5

Cette synthèse commence par l'activation de l'acide **1** par le PyBOP en présence de DIEA. Celui-ci réagit ensuite sur l'amine libre du Boc-L-Dpr-OH, en milieu basique (DIEA) pour garder l'amine sous la forme non protonée, via une addition nucléophile. 12h de réaction sont nécessaires pour avoir une conversion optimale. Le produit **2** est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 83 %. Il est à remarquer que l'acide aminé Boc-L-Dpr-OH n'est pas très soluble dans le mélange de solvants CH₂Cl₂/MeOH, mais qu'une fois que l'acide activé a été ajouté à notre milieu, le produit de la réaction **2** formé se solubilise parfaitement dans le milieu réactionnel.

L'hexadécylamine est ensuite greffée à **2**. Pour ce faire, la fonction acide libre de **2** est préalablement activée avec du PyBOP en présence de DIEA. La fonction amine de l'hexadécylamine réagit ensuite via une addition nucléophile sur le groupement carboxyle activé de **2** (ester d'HOBt) en milieu basique (DIEA) pour conduire à un composé contenant deux chaînes grasses. Cette nouvelle molécule **3** est obtenue sous la forme d'un solide gras jaune avec un rendement de 78%.

La fonction amine du produit **3** est ensuite déprotégée par acidolyse du groupement protecteur Boc en milieu acide (TFA) dans CH₂Cl₂ pour conduire au produit **4**. Le rendement de cette étape est quasi quantitatif. Cette réaction ne nécessite pas de purification.

L'amine primaire libre de la molécule **4** est ensuite couplée avec du 5,6-CTMR. La fonction acide du 5,6-CTMR est préalablement activée par le PyBOP en présence de DIEA avant de réagir avec l'amine libre de **4** via une réaction d'addition nucléophile pour conduire au produit final **5** sous la forme d'un solide violet avec un rendement de 74 %. Le rendement isolé global de ces quatre étapes est de 36%.

3. Synthèse d'analogues

Différents analogues ont été synthétisés, soit ayant le groupement benzophénone à distance variable sur l'acide gras, soit avec un traceur différent ou encore en faisant varier le squelette. L'assemblage des différentes fonctionnalités de ces nouvelles sondes lipidiques a été effectué selon le même schéma de synthèse en 4 étapes que pour la sonde lipidique de référence (même stratégie de synthèse, fig. II.13 p. 69).

3.1. Synthèse de sondes lipidiques fluorescentes avec un groupement photoactivable à distance variable

La spécificité du marquage de protéines avec notre sonde lipidique n'est pas du seul fait du groupement photoactivable choisi mais aussi de l'environnement dans lequel il est placé. C'est pour cela que la position de la benzophénone sur l'acide gras a une grande importance pour l'identification de zones hydrophobes plus ou moins proches de la surface du système lipidique utilisé.

Deux analogues d'acides gras portant le groupement benzophénone plus ou moins éloigné de la fonction acide carboxylique ont été synthétisés : la distance d est variable (fig. II.14).

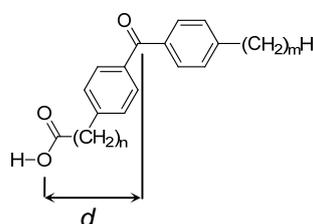


Figure II.14 : Structure de l'acide gras portant le groupement photoactivable

Ces synthèses sont inspirées des publications de T. A. Spencer^{76,77}.

3.1.1) Synthèse des acides gras contenant le groupement benzophénone

Deux stratégies ont été utilisées pour synthétiser l'acide gras contenant le groupement benzophénone : i) l'assemblage de la benzophénone via une réaction de Friedel-Craft suivi de la mise en place du précurseur du groupement acide carboxylique terminal porté par une chaîne aliphatique par une réaction de couplage de Suzuki ou ii) l'assemblage de la benzophénone à partir d'un dérivé organométallique portant le précurseur du groupement acide carboxylique et d'un aldéhyde aliphatique d'autre part (fig. II.15).

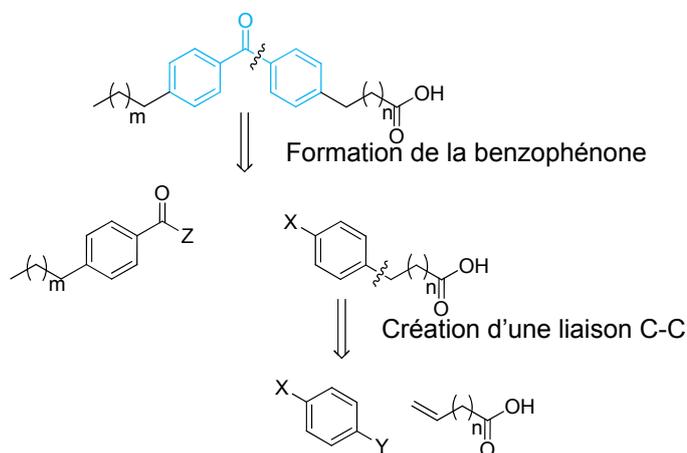


Figure II.15 : Schéma rétrosynthétique de l'acide gras intégrant la benzophénone

a/ Synthèse de l'acide 11-(4-(4-méthylbenzoyl)phényl)undécanoïque : **C₁-BP-C₁₀-COOH (9)**

La synthèse de ce premier dérivé est réalisée en 5 étapes en partant de l'acide 10-undécénoïque et du chlorure de 4-bromobenzoyl commerciaux (fig. II.16).

⁷⁶ P. Wang, D. H. Blank, T. A. Spencer (2004). Synthesis of Benzophenone-Containing Analogues of Phosphatidylcholine. *J. Org. Chem.* 69, 2693-270

⁷⁷ Y. Gan, P. Wang, T. A. Spencer (2006). Synthesis of Benzophenone-Containing Fatty Acids. *J. Org. Chem.* 71, 9487-9490

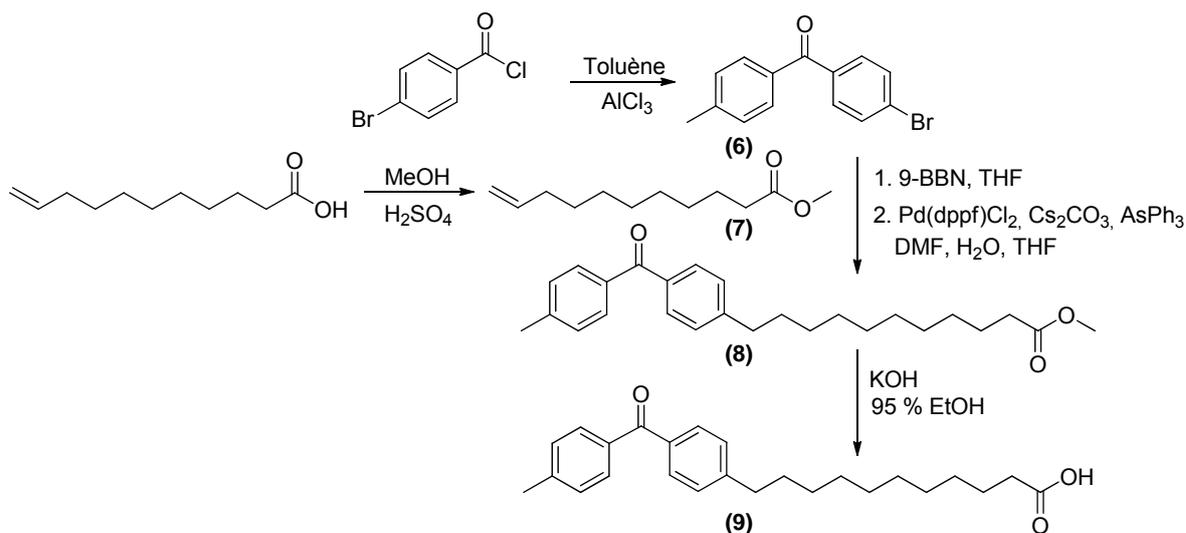


Figure II.16 : Schéma général de la synthèse de $\text{C}_1\text{-BP-C}_{10}\text{-COOH}$ (9)

- Formation de la benzophénone

La 4-bromo-4'-méthylbenzophénone est préparée selon la méthode de Nakatani *et al.*⁷⁸, en faisant réagir le chlorure de 4-bromobenzoyl avec du toluène via une réaction d'acylation de Friedel-Craft (fig. II.17), c'est une réaction de substitution électrophile aromatique.

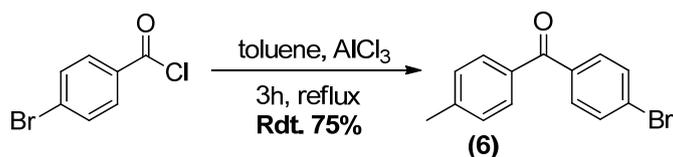


Figure II.17 : Réaction de Friedel-Craft pour former 6

Le toluène est à la fois le réactif et le solvant. Cette réaction s'effectue en présence d'un acide de Lewis, le trichlorure d'aluminium. La molécule 6 est obtenue sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 75%.

⁷⁸ K. Nakatani, C. Dohno, T. Nakamura, I. Saito (1998). p-Cyano Substituted Benzophenone as an Excellent Photophore for One-Electron Oxidation of DNA. *Tetrahedron Lett.* 39, 2779-2782

Afin de protéger la fonction carboxyle de l'acide 10-undécénoïque, celui-ci est, tout d'abord, estérifié par du méthanol en présence d'acide sulfurique en quantité catalytique pour donner le produit **7** sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 93% (fig. II.18).

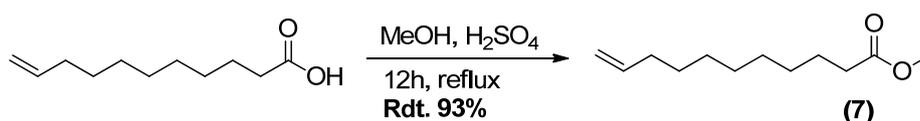


Fig. II.18 : Protection de l'acide 10-undécénoïque

- Formation de l'acide gras contenant le groupement benzophénone via un couplage de Suzuki

Cette réaction a été décrite pour la première fois en 1981 par Akira Suzuki⁷⁹ et c'est l'une des méthodes de couplage les plus utilisées pour former des liaisons carbone-carbone. C'est une réaction catalysée par du palladium faisant intervenir des dérivés du bore (fig. II.19). Les dérivés organoborés comme les acides boroniques ou les boronates sont, aujourd'hui, largement utilisés car leur réactivité est compatible avec un grand nombre de groupements fonctionnels. Ils sont aisément accessibles (commerciallement disponibles), particulièrement stables vis-à-vis de l'eau et de l'air et peu toxiques.

Le mécanisme du couplage de Suzuki suit le schéma général des mécanismes des réactions de couplage catalysées par du palladium, avec quatre étapes successives : (i) la formation de l'espèce catalytique, (ii) l'addition oxydante, (iii) la transmétallation, (iv) l'élimination réductrice (fig. II.20).

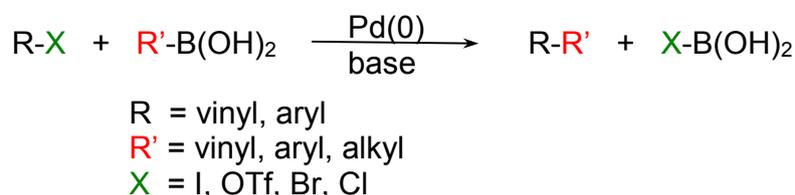


Figure II.19 : Equation de la réaction de couplage de Suzuki

⁷⁹N. Miyaura, T. Yanagi, A. Suzuki (1981). The palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Phenylboronic Acid with Haloarenes in the Presence of Bases. Synth. Commun., 11, 513-519

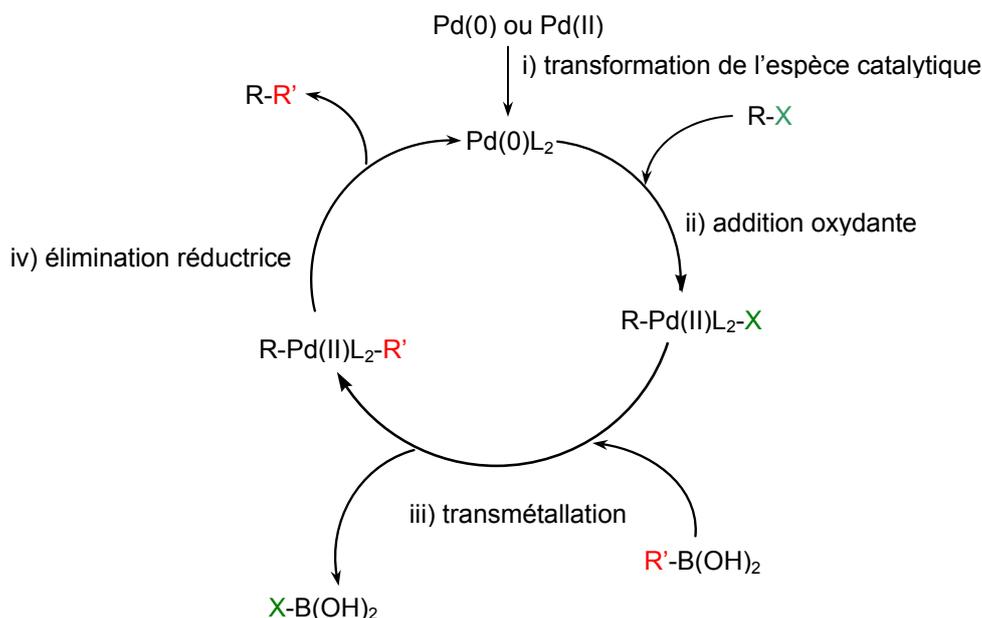


Figure II.20 : Cycle catalytique de la réaction de couplage de Suzuki

La première étape consiste à former *in situ* l'espèce catalytique $\text{Pd}(0)\text{L}_2$, très réactive et instable (le Pd est électroniquement riche, nucléophile et possède des sites de coordination vacants), à partir de sels stables de $\text{Pd}(0)$ ou de $\text{Pd}(II)$ (pré-catalyseur). L'efficacité du catalyseur diffère selon la nature des ligands portés par celui-ci.

Cette espèce $\text{Pd}(0)\text{L}_2$ va donc facilement réagir avec des électrophiles de type R-X via une étape d'addition oxydante (étape(ii)) pour former l'espèce $\text{R-Pd}(II)\text{L}_2\text{-X}$. L'addition oxydante correspond à une insertion du $\text{Pd}(0)$ dans une liaison C-X avec une oxydation du métal vers le degré d'oxydation (II). La nature du groupement X de la molécule R-X influence la vitesse de réaction de cette étape car la réactivité des halogénures et triflates pour le couplage de Suzuki décroît comme suit : $\text{I} > \text{Br} > \text{OTf} \gg \text{Cl}$ ⁸⁰.

L'étape suivante (étape (iii)) est une réaction de transmétallation et correspond à un échange de métal pour conduire à une espèce palladiée,

⁸⁰ A. Suzuki (1991). Synthetic studies via the cross-coupling reaction of organoboron derivatives with organic halides. Pure and Appl. Chem., 63, 419-422

toujours au degré d'oxydation II, comportant les deux fragments carbonés R et R' à coupler.

La dernière étape du cycle catalytique consiste à régénérer l'espèce catalytique Pd(0)L₂ et à former le produit de couplage R-R' : c'est l'élimination réductrice.

Ce couplage consiste donc en la réaction de l'alkylboronique 7' formé par réaction de l'alkylalcène 7 avec du 9-Borabicyclo[3.3.1]nonane (9-BBN) avec l'halogénure d'aryle 6 en présence d'une base et de palladium comme catalyseur pour former le cétoester 8 sous la forme d'un solide blanc (fig. II.21).

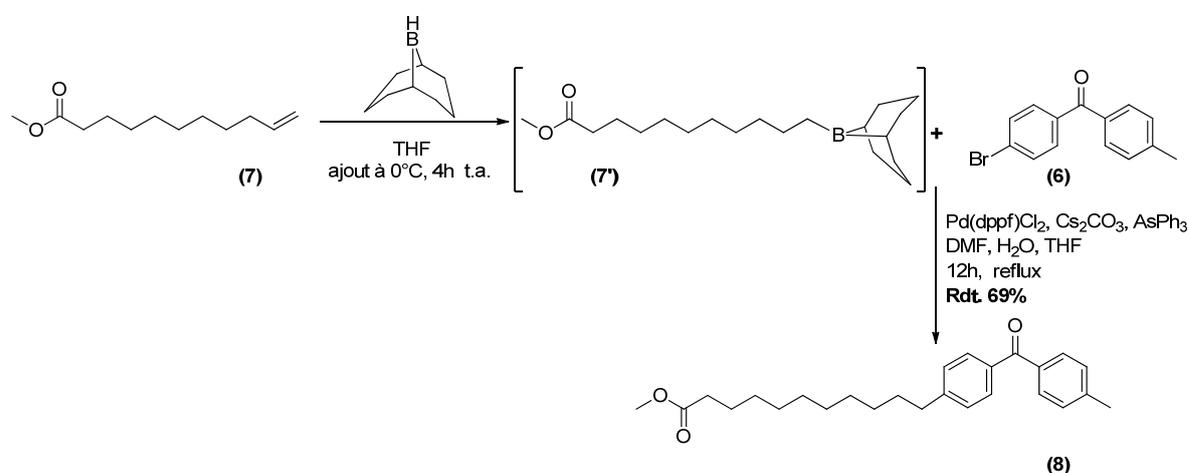


Figure II.21 : Réaction de Suzuki pour la synthèse de 8

La dernière étape de cette synthèse consiste en la déprotection de la fonction acide carboxylique du composé 8 en effectuant une saponification par la potasse pour conduire au produit 9 sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 96% (fig. II.22).

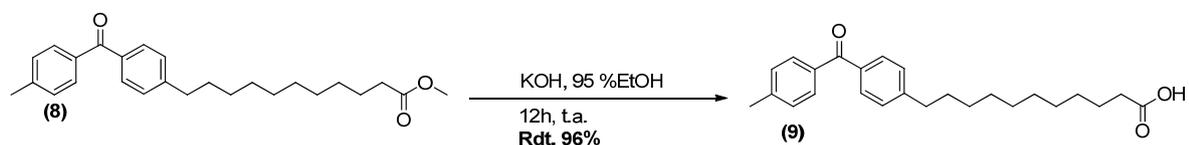


Figure II.22 : Déprotection de la fonction acide carboxylique pour conduire au produit 9

Le rendement global isolé pour la synthèse du composé 9 est de 46 % pour les 5 étapes.

b/ Synthèse de l'acide 2-(4-((4-décylphényl)(hydroxy)méthyl)phényl)acétique : **C₁₀-BP-C₁-COOH (18)**

La synthèse de ce dérivé est réalisée en 7 étapes à partir du chlorure de décylbenzoyle et du 2-(4-bromophényl)éthanol commerciaux (fig. II.23).

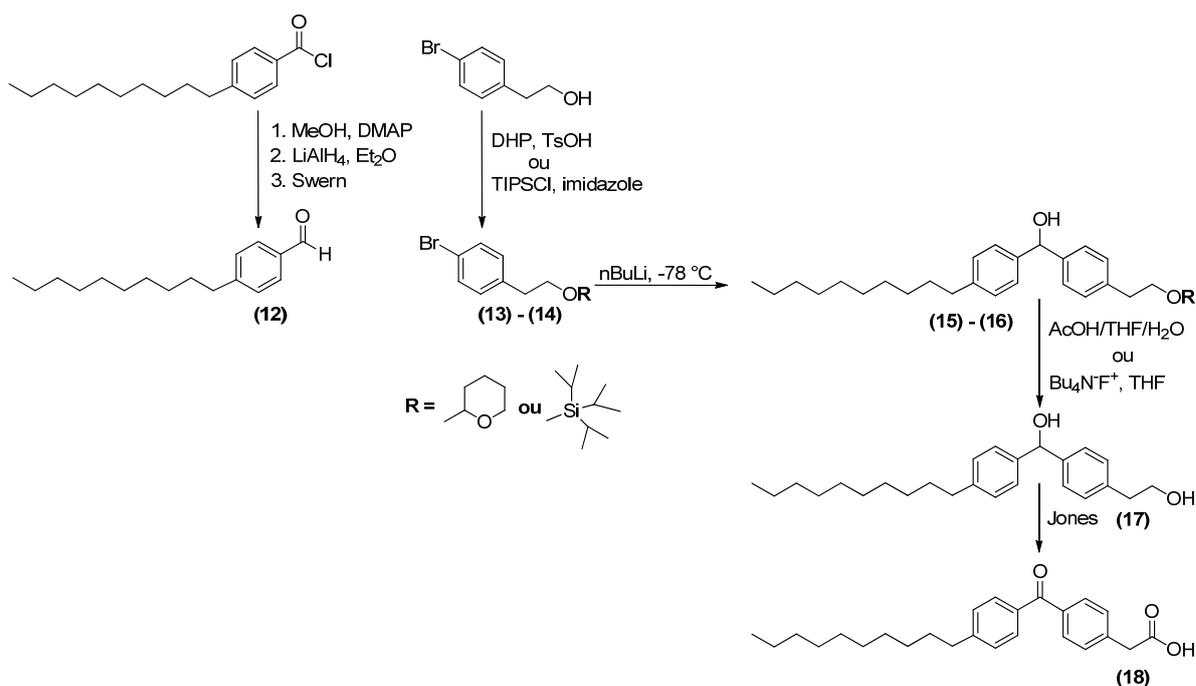


Figure II.23 : Schéma général de la synthèse de 18

- Conversion du chlorure de décylbenzoyle en décylbenzaldéhyde

Différentes stratégies peuvent être envisagées pour obtenir un aldéhyde à partir de son chlorure d'acyle correspondant (fig. II.24). La première stratégie **(a)** passe par une synthèse en une étape par réduction de Rosemund⁸¹ : c'est une hydrogénation catalytique des chlorures d'acyle. La seconde stratégie **(b)** passe par une synthèse en deux étapes via un ester méthylique, l'aldéhyde est alors obtenu par réduction de cet ester par l'hydrure de diisobutylaluminium (DIBAL). La dernière stratégie **(c)** envisagée comporte trois étapes et l'aldéhyde est obtenu par la réduction totale de l'ester en alcool puis par oxydation de celui-ci.

⁸¹ D. Winkler, K. Burger (1996). Synthesis of enantiomerically pure D- and L- armentomycin and its difluoro analogues from aspartic acid. *Synthesis*, 1419-1421

II. Conception et synthèse des sondes lipidiques

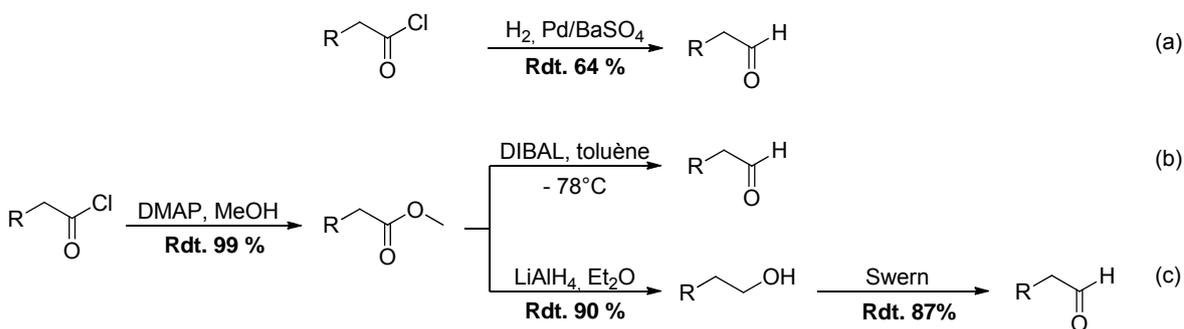


Figure II.24 : Stratégies de conversion d'un chlorure d'acyle en aldéhyde

C'est la stratégie **(c)** qui a été adoptée au laboratoire pour convertir le chlorure d'acyle en aldéhyde de par sa facilité d'exécution et le bon rendement global obtenu sur ces trois étapes (77%).

Le chlorure de décylbenzoyle est donc transformé en son aldéhyde correspondant **12** en passant par l'alcool **11** en 3 étapes (fig. II.25).

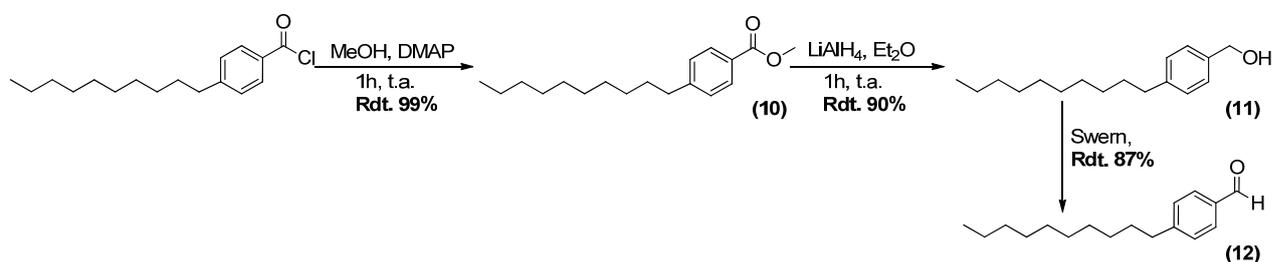


Figure II.25 : Schéma de synthèse de l'aldéhyde **12**

Pour améliorer le rendement de conversion du chlorure d'acyle en alcool **11**, celui-ci est tout d'abord converti en ester méthylique **10** dans du méthanol, jouant le rôle de solvant et de réactif, en présence d'une quantité catalytique de DMAP. L'ester **10** formé n'a pas besoin d'être purifié : aucun produit secondaire n'est formé lors de cette étape. Ensuite l'ester **10** est réduit en alcool avec du tétrahydroaluminate de lithium (LiAlH_4). L'alcool **11** peut être obtenu directement à partir du chlorure d'acyle par réduction avec LiAlH_4 ⁸² mais avec un

⁸² R. F. Nystrom, W. G. Brown (1947). Reduction of Organic Compounds by Lithium Aluminium Hydride. I. Aldehydes, Ketones, Esters, Acid Chlorides and Acid Anhydrides. J. Am. Chem. Soc., 65, 1197-1199

rendement non satisfaisant dans notre cas (inférieur à 30 %). L'alcool **11** est ensuite oxydé en son aldéhyde correspondant **12** par une réaction de Swern⁸³. Il est également possible d'obtenir directement l'aldéhyde **12** à partir de l'ester **10** en utilisant le réducteur DIBAL⁸⁴ (**b**). Cette étape a été expérimentée au laboratoire sans le succès escompté : la réaction n'est pas totale et engendre des problèmes de purification du produit formé **12** et donc un mauvais rendement. L'alcool **11** est aussi directement formé par réduction totale de l'ester méthylique **10** si la température n'est pas drastiquement contrôlée : elle ne doit pas dépasser – 65 °C.

La conversion du chlorure d'acyle en aldéhyde **12** est nécessaire pour diminuer la réactivité de celui-ci afin d'éviter la di-substitution du chlorure d'acyle par un organométallique lors de l'étape suivante. Le produit **12** est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement global pour ces 3 étapes de 77%.

- Protection de la fonction hydroxyle du 2-(4-bromophényl)éthanol

Deux types de groupements protecteurs ont été testés : le 3,4-dihydro-2H-pyrane pour former un éther de tétrahydropyranyle (THP-OR) **13** et le chlorure de triisopropylsilyle pour former un éther de triisopropylsilyle (TIPS-OR) **14** (fig. II.26).

⁸³ K. Omura and D. Swern (1978). Oxidation of Alcohols by "Activated" Dimethylsulfoxide. A Preparative, Steric and Mechanistic Study. *Tetrahedron*, 34, 1651-1660

⁸⁴ P. Garner and J. M. Park (1987). The synthesis and configurational stability of differentially protected β -hydroxy- α -amino aldehydes. *J. Org. Chem.*, 52, 2361-2364

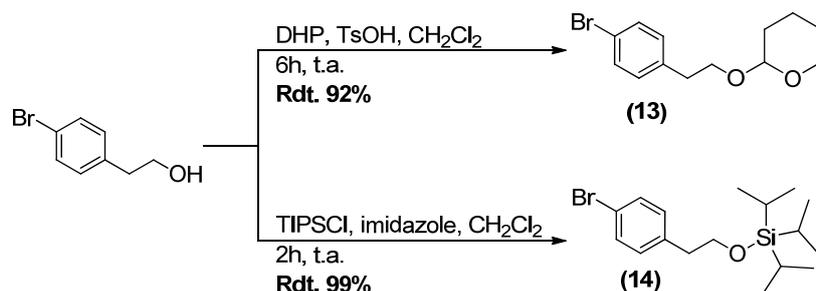


Figure II.26 : Protection de la fonction hydroxyle du 2-(4-bromophényl)éthanol

Le groupement protecteur tétrahydropyranne est largement utilisé pour protéger les alcools en synthèse organique du fait de son coût modeste, de sa bonne stabilité vis-à-vis de la plupart des réactifs non acides et de sa facilité à être retiré.

Les éthers de silyle sont les groupements protecteurs les plus fréquemment utilisés pour protéger une fonction alcool. La taille du groupement TIPS le rend stable vis-à-vis des hydrolyses acides et basiques et surtout empêche la chélation par un réactif de Grignard lors de l'addition de celui-ci à un carbonyle⁸⁵. La réaction de protection de l'alcool est quasi quantitative pour ces deux types de protection.

- Couplage des alcools protégés 13 et 14 avec l'aldéhyde 12 via un composé organométallique

Les travaux de Victor Grignard au début de XX^{ème} siècle ont été le début de l'utilisation des réactifs organométalliques en synthèse organique. L'utilisation de composés organométalliques comme les organomagnésiens appelés aussi réactifs de Grignard (fig. II.27 (a)) ou les organolithiens (fig. II.27(b)) en synthèse organique est l'une des méthodes les plus utilisées, de nos jours, pour la formation de liaisons carbone-carbone. Les dérivés bromés sont très souvent utilisés comme précurseur des réactifs organométalliques (fig. II.27).

⁸⁵ S. V. Frye and E.L. Eliel (1986). Prevention of chelation by an oxygen function through protection with a triisopropyl silyl group. Tetrahedron Lett., 27, 3223-3226

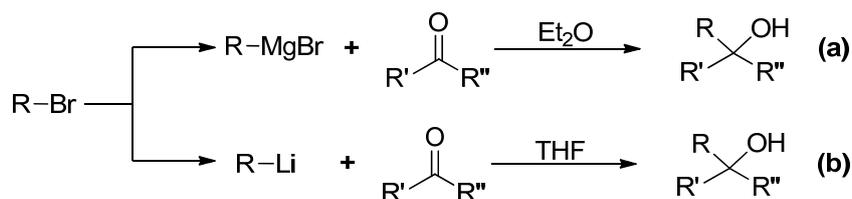


Figure II.27 : Préparation et réaction des organométalliques en synthèse organique

Ces composés sont des sources de carbone nucléophile facilement exploitables en chimie organique via une réaction de substitution nucléophile pour former une nouvelle liaison carbone-carbone.

Les dérivés organométalliques sont donc de puissants nucléophiles dont l'ordre de nucléophilie décroît comme suit : organolithiens > organomagnésiens > organocuprates.

Nous avons d'abord mis en place une stratégie de synthèse avec un réactif de Grignard pour former le composé **15** (fig. II.28) sans succès du fait des réactifs utilisés ou du fait du groupement protecteur choisi sur la fonction hydroxyle du précurseur bromé **13**. Vraisemblablement le magnésium peut se chélater aux deux oxygènes de la fonction alcool protégée et ne plus être disponible pour former le réactif de Grignard.

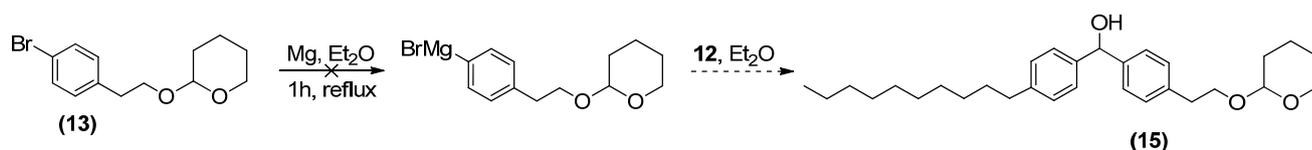


Figure II.28 : synthèse de **15** à partir d'un organomagnésien

Du fait de sa plus grande réactivité vis-à-vis des aldéhydes, nous avons utilisé par la suite et avec succès, un organolithien pour former le composé **18**. Cette réaction s'effectue en deux étapes : tout d'abord un échange halogène – métal entre le brome et le lithium est réalisé. Ensuite une réaction d'addition nucléophile de l'entité formée (un organolithien) sur l'aldéhyde **12** conduit aux produits **15** ou **16** en fonction de l'alcool protégé choisi (fig. II.29). Ainsi, le rendement de ce couplage a-t-il été fortement amélioré en changeant le

II. Conception et synthèse des sondes lipidiques

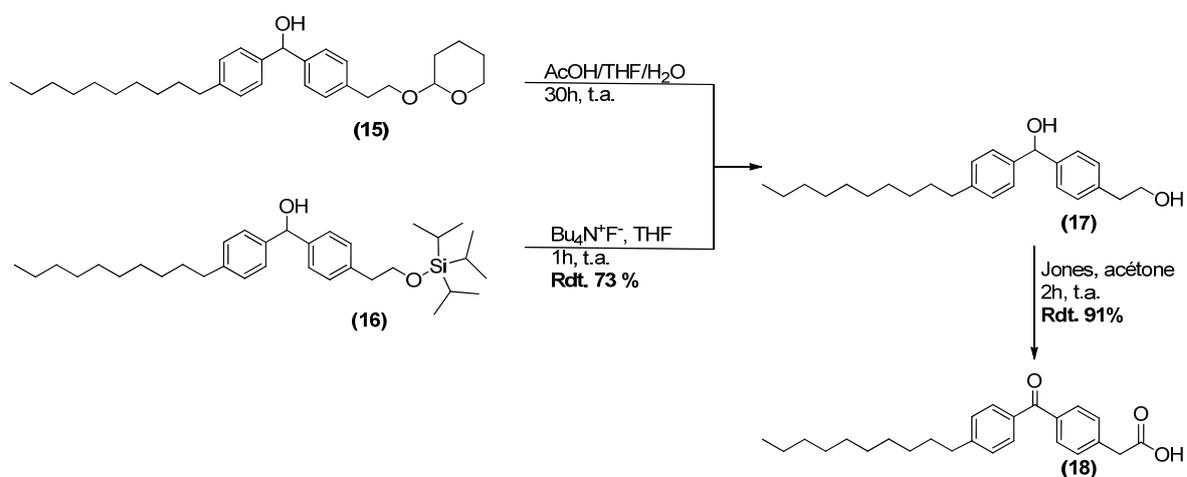


Fig. II.30 : Schéma de synthèse de **18**

Cette synthèse en 7 étapes a un rendement global isolé de 36% pour la voie avec TIPS et de 12% avec THP. Sur cette synthèse nous avons réussi à augmenter le rendement global (de 22 % à 36 %) et à diminuer le nombre d'étapes (de 5 à 4) par rapport à ce qu'il était reporté dans la littérature en partant de l'aldéhyde **12** et du bromo-alcool⁸⁶.

⁸⁶ Y. Gan, P. Wang, T. A. Spencer (2006). Synthesis of Benzophenone-Containing Fatty Acids. J. Org. Chem. 71, 9487-9490

3.1.2) Synthèse de deux nouvelles sondes lipidiques

La synthèse des sondes lipidiques bicaténares avec ces deux nouveaux acides gras contenant le groupement benzophénone suit le même schéma réactionnel en quatre étapes que la synthèse de la sonde lipidique de référence (chap. II.2.5 p. 69) avec des rendements sensiblement différents (tab. II.1).

R	Boc-L-Dpr-OH	→ 2	→ 3	→ 4	→ 5	Rdt. global
C ₁ -BP-C ₁₀ -COOH (9)	90	64	86	74	37	
C ₆ -BP-C ₅ -COOH (1) (réf)	83	78	84	67	36	
C ₁₀ -BP-C ₁ -COOH (18)	50	54	95	66	17	

Tableau II.1 : Rendements (en %) de chaque étape et rendement global isolé de chaque analogue

Les rendements de synthèse de la première et de la deuxième étape pour la synthèse de la sonde lipidique avec l'acide gras proximal **18** sont moins bons certainement du fait de la proximité entre le groupement benzophénone et le groupement carboxyle : les fonctions réactives sont vraisemblablement moins accessibles. Pour la synthèse de l'analogue avec l'acide gras distal **9** les rendements sont du même ordre que ceux de la synthèse de la sonde lipidique de référence **1** : le rendement global isolé de ces quatre étapes est de 37 % avec l'acide gras **9** contre 36 % pour la synthèse de la sonde lipidique de référence. Du fait des deux premières étapes, le rendement global isolé n'est que de 17 % pour l'analogue contenant l'acide gras **18**. Ces deux nouveaux analogues sont aussi obtenus sous la forme d'un solide violet.

3.2. Bilan

Trois analogues photoactivables d'acides gras contenant un groupement benzophénone à distance variable de la fonction carboxylique ont ainsi été synthétisés (tab. II.2).

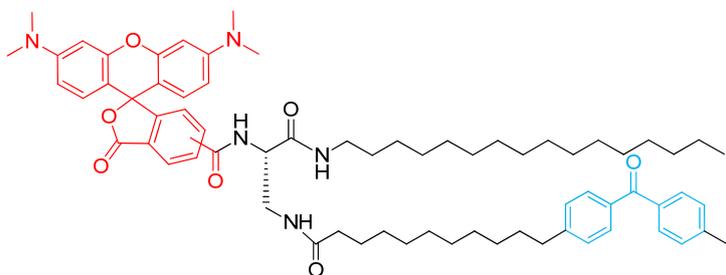
Nom	Formule	d (Å)	Nombre d'étapes de synthèse	Rendement global isolé
C₁-BP-C₁₀-COOH (9)		18,7	5	46 %
C₆-BP-C₅-COOH (1)		12,7	3	45 %
C₁₀-BP-C₁-COOH (18)		7,9	7	36 %

Tableau II.2 : Structure des acides gras contenant le groupement benzophénone

La distance d entre l'oxygène du groupement hydroxyle et le carbone de la fonction carbonyle de la benzophénone (fig. II.14) est estimée en extrapolant les valeurs décrites par Spencer *et al.*

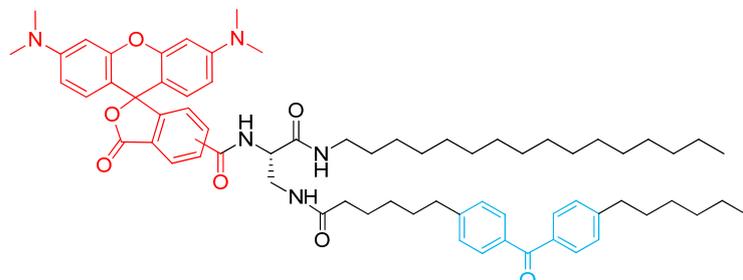
A partir de ces trois acides gras, trois analogues de sonde lipidique photoactivable ont été obtenus :

Rhod-Dpr(CO-C₁₀-BP-C₁)-NH-C₁₆H₃₃ : sonde lipidique distale (9.4)



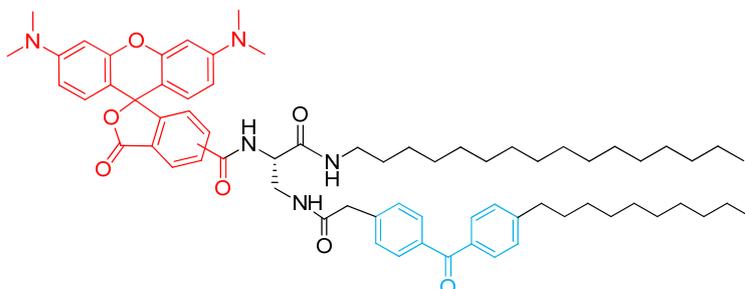
9 étapes
Rendement global isolé : 17 %

Rhod-Dpr(CO-C₅-BP-C₆)-NH-C₁₆H₃₃ : sonde lipidique médiane (5)



7 étapes
Rendement global isolé : 16 %

Rhod-Dpr(CO-C₁-BP-C₁₀)-NH-C₁₆H₃₃ : sonde lipidique proximale (18.4)



12 étapes
Rendement global isolé : 6 %

Le rendement global isolé de ces trois synthèses totales est acceptable compte tenu du nombre d'étapes (de 7 à 12) et du type de molécule synthétisé : il s'agit de molécules lipidiques réputées difficiles à purifier.

3.3. Synthèse d'une sonde lipidique photoactivable biotinylée

Après avoir fait la preuve du concept de marquage hydrophobe d'affinité avec les sondes lipidiques fluorescente (chap. III p. 114) par détection de fluorescence, une deuxième famille de molécules a été synthétisée en remplaçant le traceur fluorescent par une autre molécule d'intérêt : la biotine. Celle-ci nous permet, grâce à sa forte interaction avec son substrat la streptavidine (constante de dissociation $K_d = 4.10^{-14} \text{ M}$)⁸⁷, de pouvoir immobiliser et purifier (chap. III.3.2.) les produits résultant de la réaction de photomarquage afin de les identifier et les analyser. Un pont disulfure clivable est intégré à cette molécule pour pouvoir libérer, en conditions réductrices, le complexe biotine/streptavidine formé.

La synthèse de cette sonde lipidique est réalisée en une étape à partir de l'acide 3-[2-N-(biotinyl)aminoéthyl]dithio]propanoïque (Biotine-SS-COOH) commercial et de l'intermédiaire **4** (synthétisé en trois étapes fig. II.13 p. 69) via une réaction de couplage peptidique (fig. II.31).

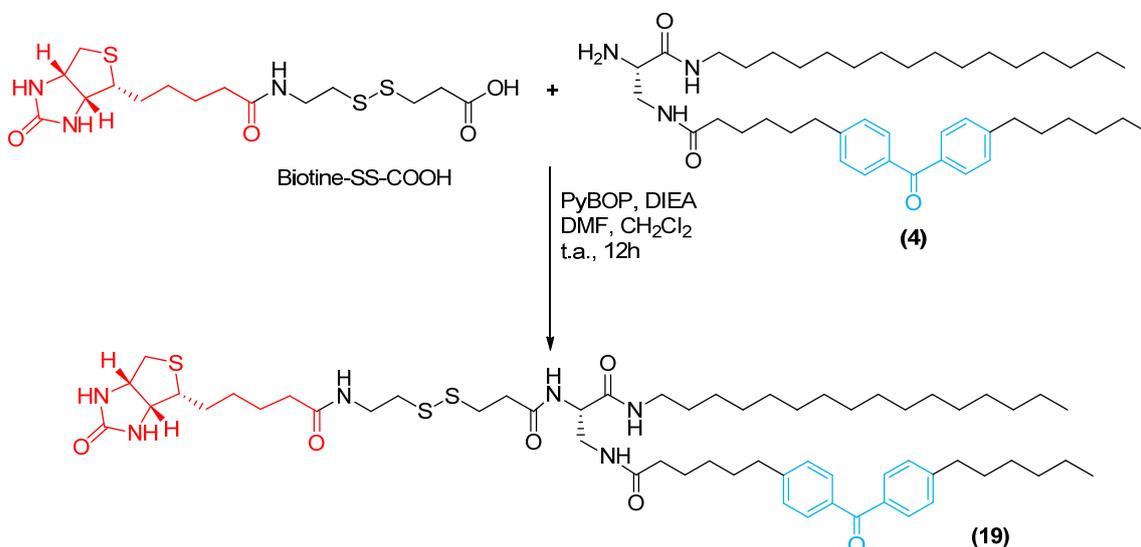


Figure II.31 : Schéma de synthèse de **19**

⁸⁷ A. Holmberg, A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundeberg, M. Uhlen (2005). The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis*, 26, 501-510

Le groupement acide de la molécule biotine-SS-COOH est activé par l'agent de couplage PyBOP en présence de DIEA dans un mélange de solvant DMF/CH₂Cl₂ 2/1. Le DMF est nécessaire pour solubiliser la molécule biotine-SS-COOH. Cet acide activé réagit ensuite sur l'amine libre de l'intermédiaire **4**, en milieu basique (DIEA) par addition nucléophile. Les réactifs réagissent pendant 12h pour obtenir une conversion optimale. Vu les quantités de matière engagées dans cette synthèse (entre 20 et 30 mg) et les difficultés de purification rencontrées avec les méthodes classiques, le brut réactionnel a été purifié par HPLC sur une colonne C₄ préparative. Malgré une optimisation du gradient d'élution utilisé, le produit **19** n'a pas pu être obtenu avec une excellente pureté du fait de la forte hydrophobicité de celui-ci. Le produit **19** est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec de faibles rendements (inférieurs à 20 %).

3.4. Synthèse de sondes lipidiques fluorescentes avec différentes plateformes de liaison

Trois autres analogues ont été synthétisés au laboratoire par C. Erhet durant son stage de master. La plateforme de liaison est différente de celle de la sonde lipidique de référence (fig. II.32) mais toujours d'origine commerciale.

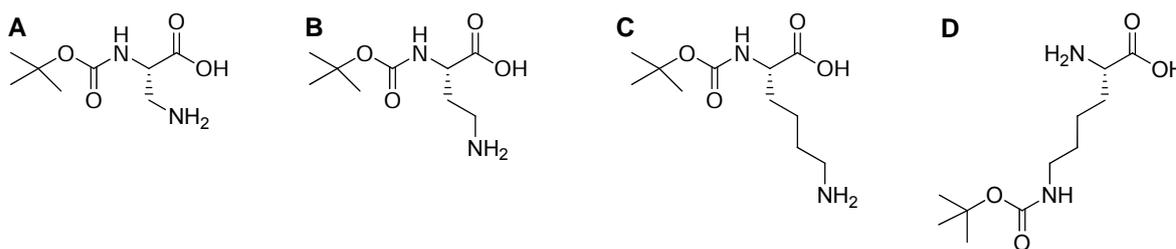


Figure II.32 : Structures des plateformes de liaison utilisées : **A** Boc-L-Dpr-OH (référence), **B** Boc-L-Dab-OH, **C** Boc-L-Lys-OH, **D** H-Lys(Boc)-OH

Deux des analogues synthétisés ont leurs deux chaînes lipidiques plus distantes de 1 et de 3 carbones par rapport à la sonde lipidique de référence : la

chaîne latérale des acides aminés choisis comme plateforme de liaison est allongée (fig. II.32 **B** et **C**).

Le troisième analogue a sa tête polaire, la rhodamine, plus éloignée des chaînes lipidiques. L'acide gras portant le groupement benzophénone est greffé sur le groupement amine en α du groupement carboxyle et la rhodamine sur le groupement amine de la chaîne latérale de l'acide aminé (fig. II.32 **D**). La synthèse de ces analogues a été réalisée suivant le même schéma de synthèse en 4 étapes que celui de la sonde lipidique de référence (chap II.2.5, p. 69, fig. II.13) avec un rendement global de 4% pour la synthèse à partir de la plateforme **B**, de 12% pour la synthèse à partir de la plateforme **C** et de 3% pour la synthèse à partir de la plateforme **D** (fig. II.33 pour la structure des sondes lipidiques correspondantes). Ces analogues ont été synthétisés pour permettre d'analyser si l'écart entre les deux chaînes grasses a une incidence sur l'insertion et la stabilité de ces composés dans un système lipidique. Les résultats de ces analyses sont discutés dans un chapitre suivant.

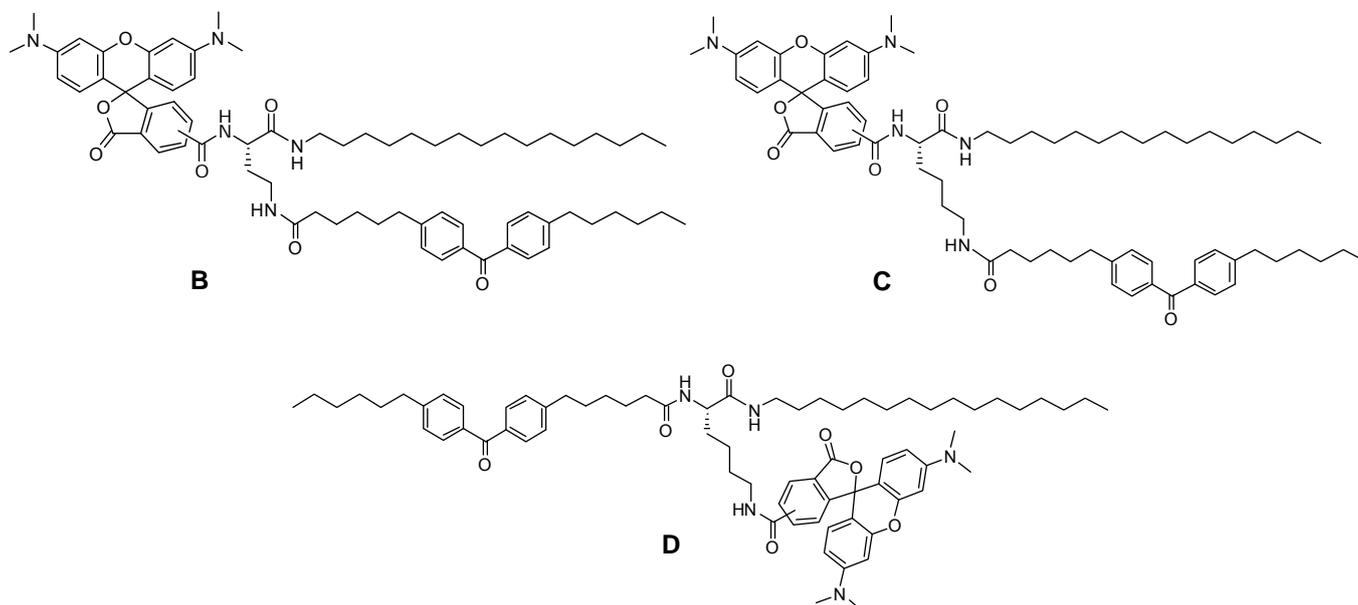


Figure II.33 : Structures des sondes lipidiques **B**, **C**, **D** correspondantes aux plateformes **B**, **C**, **D** respectivement.

4. Partie expérimentale chimique

4.1. Indications générales

4.1.1) Solvants et réactifs

Les solvants utilisés pour les synthèses ont été utilisés au grade analytique. Dans le cas de réactions effectuées en conditions anhydres, les solvants ont été préparés par distillation sous argon en présence de l'agent déshydratant couramment employé: THF anhydre sur Na/benzophénone et CH₂Cl₂ sur CaH₂ respectivement.

Les produits commerciaux ont été achetés auprès des fournisseurs Aldrich, Acros, Alfa Aesar, Iris et ont été utilisés sans aucune purification complémentaire.

4.1.2) Matériels et méthodes

a/ Chromatographie

- Chromatographie sur couche mince

L'avancement des réactions a été suivi par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant des plaques de silice (MERCK 0,25 mm, Kieselgel 60 F₂₅₄). La révélation des plaques a été effectuée par rayonnement UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) ou par trempage dans un révélateur (acide phosphomolybdique, vaniline ou ninhydrine) suivie d'un chauffage à 200°C ou par exposition de la plaque à la vapeur d'iode. Le système d'élution et le rapport frontal sont précisés pour chaque molécule.

- Chromatographie sur colonne

Les chromatographies sur colonne de silice ont été réalisées avec de la silice MERCK (Kieselgel 60, 40 – 63 μm). La silice a été utilisée environ 50 à 100 fois en excès par rapport à la masse du produit brut à purifier. Le diamètre des colonnes a été choisi de manière à ce que la hauteur du gel de silice dans la

colonne soit d'environ 20 cm. Le système d'élution est précisé pour chaque purification.

- Chromatographie liquide à haute performance

Les analyses HPLC sont réalisées sur un appareil Shimadzu équipé d'une colonne Jupiter 5 μ m C₄ 300Å (150 x 4,6 mm, C₄) fournie par Phenomenex. Les analyses sont effectuées, pour les sondes lipidiques fluorescentes, avec un gradient linéaire durant 10 min, de 0 % CH₃CN dans l'eau (avec 0,1 % TFA) à 100 % CH₃CN (avec 0,1 % TFA) suivies d'un plateau durant 5 min à 100 % CH₃CN (avec 0,1 % TFA) avec un débit de 1 mL.min⁻¹. Pour la sonde biotinylée, un gradient linéaire durant 25 min, de 0 % CH₃CN dans l'eau (avec 0,1 % TFA) à 100 % CH₃CN (avec 0,1 % TFA) suivies d'un plateau durant 10 min à 100 % CH₃CN (avec 0,1 % TFA) avec un débit de 1 mL.min⁻¹ a été utilisé. La longueur d'onde de détection est à 254 nm. Les temps de rétention sont donnés en minute.

b/ Spectroscopie Infrarouge

Les spectres d'absorption infrarouge (IR) ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier Perkin-Elmer (FT-IR Spectrum 2000). Les échantillons ont été examinés en solution dans un solvant approprié. Les nombres d'onde sont exprimés en cm⁻¹.

c/ Spectroscopie de masse

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un appareil ESI/TOF Mariner par la technique de l'électrospray. Les produits de masses moléculaires élevées ont été analysés par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Les spectres de masse haute résolution (HRMS) ont été enregistrés sur un appareil GC/TOF Agilent ou LC/TOF Agilent. Les pics mentionnés (m/z) sont ceux observés et interprétables sans équivoque. Les mesures de m/z observées sur le spectre sont comparées à une masse exacte calculée, la masse indiquée pour chaque molécule représente son poids moléculaire.

d/ Point de fusion

Les points de fusion ont été enregistrés sur un appareil de type Büchi B-450 et sont donnés en degrés Celsius.

e/ Résonance Magnétique Nucléaire

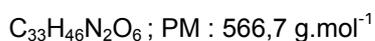
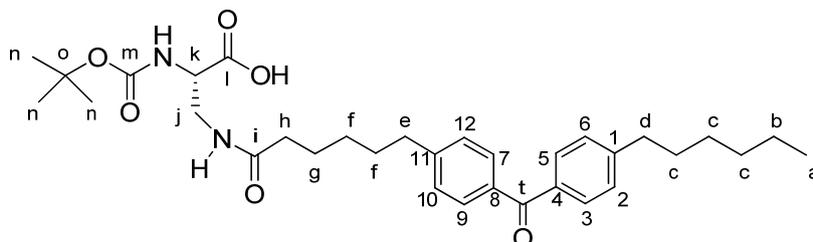
Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur des appareils Brücker DPX 300 (300 MHz), équipé d'une sonde $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ 5 mm (Dual) pour le proton (fréquence d'irradiation : 300 MHz) et pour le carbone 13 (fréquence d'irradiation : 75 MHz) et Brüker Advance 400 (400 MHz pour le proton et 100 MHz pour le carbone 13). Les spectres ^{13}C ont été découplés du proton pendant l'acquisition. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport à la référence standard pour le noyau considéré (proton et carbone 13 : TMS à 0,00 ppm). Dans tous les cas une référence secondaire dont le déplacement chimique est connu est utilisée à la place de la référence standard :

Noyau	Solvant	Référence	Déplacement chimique (ppm)
^1H	CDCl_3	CHCl_3	7,27
	CD_3OD	CD_2HOD	3,31
^{13}C	CDCl_3	CDCl_3	77,7
	CD_3OD	CD_3OD	49

Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz. La description des spectres utilise, pour caractériser la multiplicité du couplage, les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), dd (doublet dédoublé), dt (triplet dédoublé), m (multiplet).

4.2. Synthèse de la sonde lipidique de référence

Synthèse de l'acide (S)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-3-(6-(4-(4-hexylbenzoyl)phényl)hexanamido) propanoïque (2)



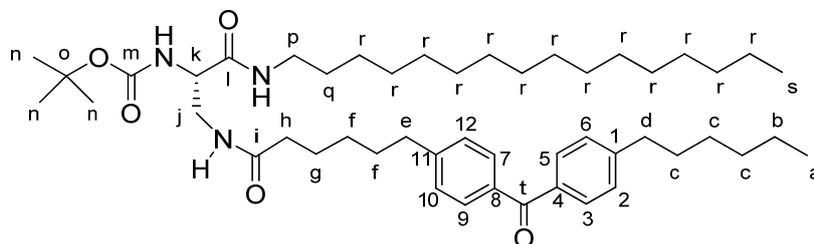
L'acide 6-(4-(4-n-hexylbenzoyl)phényl)-hexanoïque **1** (190,1 mg – 0,5 mmol) est dissous dans 3 mL de CH₂Cl₂. La DIEA (194 mg – 1,5 mmol) et le PyBOP (260 mg – 0,5 mmol) sont ajoutés à la solution. Après 10 min d'agitation à température ambiante, le Boc-L-Dpr-OH (100 mg- 0,5 mmol) préalablement dissous dans 4 mL de CH₂Cl₂ et 3 mL de MeOH est ajouté au milieu réactionnel. La solution est agitée à température ambiante et sous argon pendant 12 h. La phase organique est ensuite lavée avec de l'eau distillée (2 fois 10 ml) puis la phase aqueuse est extraite avec CH₂Cl₂ (1 fois 20 ml). Les deux phases organiques collectées sont séchées sur Na₂SO₄ et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'éluion CH₂Cl₂/MeOH 98/2 à 93/7 v/v) pour conduire au produit **2** obtenu sous la forme d'un solide blanc (235 mg – Rdt : 83 %).

CCM : R_f = 0,3 (CH₂Cl₂/MeOH 9/1).

RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) δ = 7,67 (m, 4H_{2,6,10,12}), 7,24 (m, 4H_{3,5,7,9}), 4,14 (m, 1H_k), 3,73 (q, J = 7 Hz, 1H_j), 3,14 (q, J = 7 Hz, 1H_j), 2,65 (m, 4H_{d+e}), 2,17 (m, 2H_h), 1,62 – 1,21 (m, 23H_{b,c,f,g,n}), 0,87 (m, 3H_a).

Masse : m/z = 567,4 [M+H]⁺, masse calculée = 566,3 g.mol⁻¹.

Synthèse du (S)-tert-butyl-1-(hexadécylamino)-3-(6-(4-(4-hexylbenzoyl)phényl)hexanamido)-1-oxopropan-2-ylcarbamate (3)



2 (225 mg – 0,4 mmol) est dissous dans 3,5 mL de CH₂Cl₂. La DIEA (155 mg – 1,2 mmol) et le PyBOP (250 mg – 0,4 mmol) sont ajoutés à la solution. Après 10 min d'agitation à température ambiante, de l'hexadécylamine (96,5 mg- 0,4 mmol) est ajoutée au milieu réactionnel. La solution est agitée à température ambiante et sous argon pendant 6 h. La phase organique est ensuite lavée avec de l'eau distillée (2 fois 15 ml) puis la phase aqueuse est extraite avec 15 mL de CH₂Cl₂. Les deux phases organiques collectées sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (éluant CH₂Cl₂/MeOH 25/1 v/v) pour conduire au produit **3** obtenu sous la forme d'un solide blanc et gras (246 mg – Rdt : 78 %).

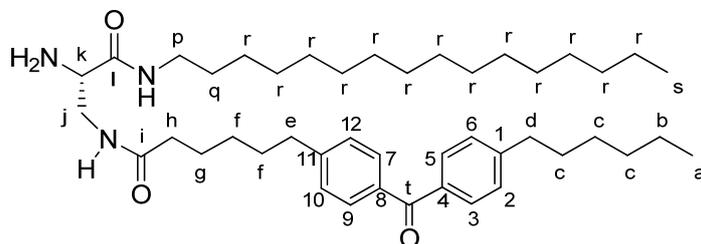
CCM : R_f = 0,6 (CH₂Cl₂/MeOH 9/1).

RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) δ = 7,73 (m, 4H_{2,6,10,12}), 7,27 (m, 4H_{3,5,7,9}), 6,86 (s, 1H_{NH}), 6,35 (s, 1H_{NH}), 5,98 (d, J = 6 Hz, 1H_{NH}), 4,16 (m, 1H_k), 3,71 (m, 1H_j), 3,51 (m, 1H_j), 3,23 (m, 2H_p), 2,69 (t, 4H_{d+e}, J = 7,5), 2,20 (t, 2H_h, J = 7,5), 1,70 – 1,25 (m, 51H_{b,c,f,g,n,q,r}), 0,88 (m, 6H_{a+s}).

RMN ¹³C (75 MHz ; CDCl₃) δ = 196,9 (C_t), 175,5 (C_i), 171,1 (C_i), 148,6, 148,0 (C₁₊₁₁ pour les deux pics), 136,3, 136,0 (C₄₊₈ pour les deux pics), 130,9 (C_{2,6,10,12}), 128,9 (C_{3,5,7,8}), 81,0 (C_o), 42,7 (C_j), 40,2 (C_p), 37,0, 36,7, 36,4, (C_{d,e,h} pour les trois pics), 32,6, 32,4, 31,8, 31,5, 30,4-29,5, 29,0, 27,5, 26,1, 23,3 (C_b), 14,7 (C_{a+s}).

Masse : m/z = 790,7 [M+H]⁺, masse calculée = 789,6 g.mol⁻¹.

Synthèse du (S)-N-(2-amino-3-(hexadécylamino)-3-oxopropyl)-6-(4-(4-hexyl benzoyl)phényl) hexanamide (4)



3 (146 mg – 0,18 mmol) est dissous dans 3 mL d'une solution de CH₂Cl₂/TFA 1/1 v/v. La solution est agitée à température ambiante et sous argon pendant 1 h. La phase organique est ensuite diluée avec 75 mL de CH₂Cl₂ puis lavée avec une solution de NaHCO₃ saturée (3 fois 75 ml) et la phase aqueuse est extraite avec CH₂Cl₂ (2 fois 50 mL). Les phases organiques récupérées sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite pour conduire au produit **4** obtenu sous la forme d'un solide blanc gras (104,3 mg – Rdt : 84 %).

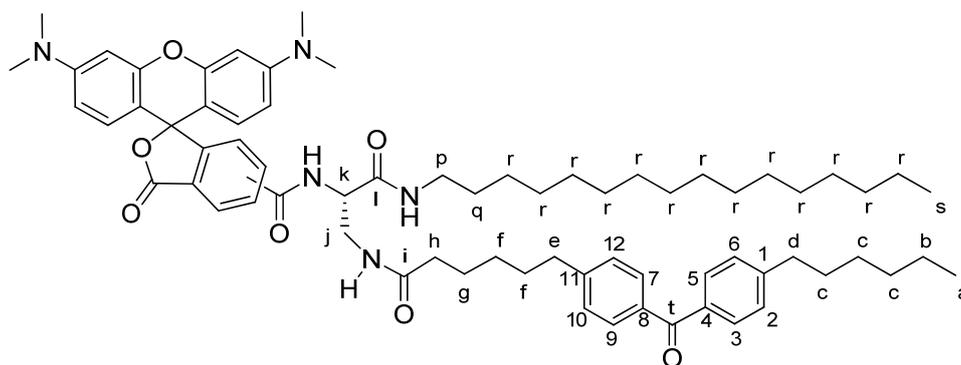
CCM : R_f = 0,4 (CH₂Cl₂/MeOH 9/1).

RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) δ = 7,73 (m, 4H_{2,6,10,12}), 7,50 (m, 1H_{NH}), 7,27 (m, 4H_{3,5,7,9}), 6,29 (m, 1H_{NH}), 3,65 (m, 1H_k), 3,47 – 3,37 (m, 2H_j), 3,23 (m, 2H_p), 2,69 (t, 4H_{d+e}, J = 7,5 Hz), 2,20 (t, 2H_h, J = 7,5), 1,66 – 1,25 (m, 42H_{b,c,f,g,q,r}), 0,88 (m, 6H_{a+s}).

RMN ¹³C (75 MHz ; CDCl₃) δ = 196,9 (C_t), 174,8 (C_i), 173,9 (C_i), 148,6, 148,0 C₁₊₁₁ pour les deux pics), 136,2, 136,0 (C₄₊₈ pour les deux pics), 130,8 (C_{2,6,10,12}), 128,9 (C_{3,5,7,8}), 55,9 (C_k), 44,3 (C_j), 39,8 (C_p), 37,2, 36,6, 36,4 (C_{d,e,h} pour les trois pics), 32,6, 32,3, 31,8, 31,4, 30,3-29,5, 27,6, 26,1, 23,3 (C_b), 14,7 (C_{a+s}).

Masse : m/z = 690,5 [M+H]⁺, masse calculée = 689,5 g.mol⁻¹.

Synthèse de Rhod-Dpr(CO-C₅-BP-C₆)-NH-C₁₆H₃₃ (5)



43 mg de 5,6 tetraméthyl-carboxy-rhodamine (TMCR) (0,099 mmol) sont dissous dans 3 mL de CH₂Cl₂. La DIEA (30 mg – 0,230 mmol) et le PyBOP (52 mg – 0,099 mmol) sont ajoutés à la solution. Après 20 min d'agitation à température ambiante, **4** (53 mg – 0,077 mmol) préalablement dissous dans 3 mL de CH₂Cl₂ est ajouté au milieu réactionnel. La solution est agitée à température ambiante et sous argon pendant 24 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'élution CH₂Cl₂/MeOH 100/0 à 100/15 v/v) pour conduire au produit **5** obtenu sous la forme d'un solide violet (57 mg – Rdt : 67 %).

CCM : R_f = [0,7 ; 0,5] (CH₂Cl₂/MeOH 9/2) (2 isomères).

RMN ¹H (500 MHz ; CDCl₃) δ = 11,05 (s, 1H), 8,90 (m, 1H), 8,15 (m, 2H), 7,69 (m, 4H), 7,23 (m, 4H), 6,86 (m, 2H), 6,57 (m, 4H), 3,75 (m, 1H), 4,72 – 4,62 (m, 2H), 3,18 (m, 2H), 3,10 (m, 12H), 2,68 (m, 4H), 2,17 (m, 2H), 1,64 – 1,22 (m, 42H), 0,88 (m, 6H).

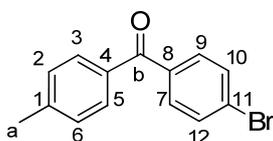
RMN ¹³C (125 MHz ; CDCl₃) δ = 196,9, 176,0, 175,9, 170,7, 170,5, 169,0, 167,5, 167,3, 156,0, 155,6, 148,6, 148,0, 136,2, 136,0, 130,8, 128,9, 126,2, 125,3, 118,5, 112,5, 111,8, 97,8, 56,3, 54,3, 51,5, 44,3, 39,8, 37,2, 36,6, 36,4, 32,6, 32,3, 31,8, 31,4, 30,3-29,5, 27,6, 26,1, 23,3, 14,7.

Masse : $m/z = 1102,9 [M+H]^+$, masse calculée = $1101,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, HRMS $m/z = 1102,6961 [M+H]^+$, masse calculée = $1101,6918 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

HPLC : Tr = 13,6 min.

4.3. Synthèse des acides gras contenant un groupement benzophénone

Synthèse de la 4-Bromo-4'-méthylbenzophénone (6)



$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{BrO}$; PM : $275,1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Du chlorure de 4-bromobenzoyle (500 mg – 2,28 mmol) est dissous dans 5 mL de toluène sous agitation et à température ambiante. AlCl_3 (456 mg - 3,42 mmol) est ajouté à la solution en une seule fois, le milieu réactionnel est ensuite porté à reflux pendant 2h. La solution est refroidie à température ambiante puis versée dans une solution d' $\text{HCl}_{37\%}$ glacé. Puis le mélange est extrait avec 15 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique collectée est lavée par 15 mL d' HCl 1N aqueux, 15 mL d'eau puis 15 mL de saumure. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'éluion cyclohexane/ AcOEt 38/2 à 37/3 v/v) pour enlever les produits inorganiques (colonne de filtration) pour conduire après recristallisation dans le n-hexane au produit **6** obtenu sous la forme d'un solide blanc (470 mg – Rdt : 75 %).

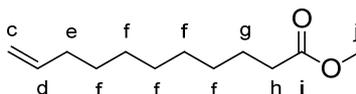
CCM : Rf = 0,4 (Cyclohexane/ AcOEt 9/1 v/v).

RMN ^1H (300 MHz; CDCl_3) $\delta = 7,70\text{-}7,60$ (m, 6H), $7,30\text{-}7,27$ (m, 2H), 2,44 (s, 3H_a).

RMN ^{13}C (75 MHz ; CDCl_3) δ = 195,9 (C_b), 144,2 (C_1), 137,3, 135,0, 132,1, 132,0, 130,9, 129,7, 127,8 (C_{11}), 22,3 (C_a).

Masse : m/z = 274,0 [M] $^+$, masse calculée = 274,0 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Synthèse du 10-undécénoate de méthyle (7)



$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_2$; PM : 198,3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

De l'acide 10-undécénoïque (5,00 g – 27,1 mmol) est dissous dans 100 mL de méthanol sous agitation et à température ambiante. 1 mL d'acide sulfurique concentré est ajouté à la solution et le milieu réactionnel est porté à reflux pendant une nuit. La solution est refroidie à température ambiante puis le méthanol est évaporé sous pression réduite et la solution est reprise dans 200 mL d'éther. Le mélange obtenu est lavé avec une solution d' NaHCO_3 saturée et avec de la saumure. La phase organique récupérée est séchée sur MgSO_4 , filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est séché à la pompe à palettes pendant une nuit pour obtenir le composé **7** sous la forme d'une huile jaune (5,00 g – Rdt : 93 %).

CCM : R_f = 0,4 (Cyclohexane/ AcOEt 9/1 v/v).

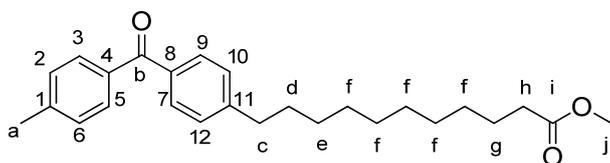
RMN ^1H (300 MHz ; CDCl_3) δ = 5,83-5,77 (m, 1 H_d), 5,01-4,91 (m, 2 H_c), 3,66 (s, 3 H_j), 2,29 (t, 2 H_h , $J=7,6$), 2,04 (m, 2 H_e), 1,61 (m, 2 H_g), 1,38-1,29 (m, 10 H_f).

RMN ^1H (400 MHz ; CDCl_3) δ = 5,83-5,77 (ddt, 1 H_d , J = 17,1;10,1;6,8), 5,01-4,91 (m, 2 H_c), 3,66 (s, 3 H_j), 2,29 (t, 2 H_h , J = 7,6), 2,04 (q, 2 H_e , J = 7,0), 1,61 (quint, 2 H_g , J = 7,3), 1,38-1,29 (m, 10 H_f).

RMN ^{13}C (75 MHz ; CDCl_3) δ = 174,9 (C_i), 139,8 (C_d), 114,8 (C_c), 52,0 (C_j), 34,8 (C_h), 34,4 (C_e), 29,8 (C_f), 25,6 (C_g).

Masse : ESI m/z = 199,2 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, masse calculée = 198,2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Synthèse du 11-(4-(4-méthylbenzoyl)phényl)undécanoate de méthyle (8)



D'une part **7** (181 mg – 0,91 mmol) est dissous dans 5 mL de THF sous agitation et à 0°C. Sous argon, 4 mL d'une solution de 0,5 M de 9-BBN dans du THF est ajouté à la solution et le milieu réactionnel est agité pendant 4 h à température ambiante. D'autre part, du carbonate de césium (890 mg – 2,73 mmol) est dissous dans une solution de 2 mL de DMF, 3 mL de THF et 0,6 mL d'eau puis du triphénylarsine (55 mg – 0,18 mmol), du Pd(dppf)Cl₂ (131,7 mg – 0,18 mmol) et **6** (250 mg – 0,91 mmol) y sont ajoutés sous argon et sous agitation. La première solution est ajoutée à la seconde via une canule. Le milieu réactionnel résultant est agité pendant 22 h. La solution obtenue est diluée dans 15 mL d'eau et 15 mL d'AcOEt puis lavée avec de l'eau, avec une solution de NaHCO₃ saturée et avec de la saumure. La solution est filtrée sur célite et celle-ci est rincée avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique récupérée est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'élution cyclohexane/AcOEt 100/0 à 100/10 v/v) puis trituré dans le n-hexane pour conduire au produit **8** obtenu sous la forme d'une huile jaune (247 mg – Rdt : 69 %).

CCM : R_f = 0,4 (Cyclohexane/AcOEt 9/1 v/v).

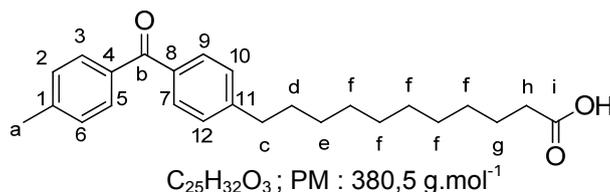
RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) δ = 7,73-7,71 (m, 4H_{ar}), 7,37-7,29 (d, 4H_{ar}, J = 7,4), 3,67 (s, 3H_j), 2,69 (t, 2H_h, J = 7,7), 2,45 (s, 3H_a), 2,31 (t, 2H_c, J = 7,5), 1,67-1,60 (m, 4H_{g+d}), 1,36-1,24 (m, 12H_{e+f}).

RMN ¹³C (75 MHz ; CDCl₃) δ = 196,3 (C_b), 174,3 (C_i), 147,9 (C₁₁), 142,9 (C₁), 135,4, 135,3 (C₄₊₈ pour les 2 pics), 130,2, 128,9, 128,3, 51,4 (C_j), 36,0 (C_c), 34,1

(C_h), 31,2 (C_d), 29,7, 29,5, 29,4, 29,3, 29,2, 29,2 (C_{e+f} pour les 6 pics), 24,9 (C_g), 21,6 (C_a).

Masse : ESI m/z = 395,2 [M+H]⁺, masse calculée = 394,2 g.mol⁻¹.

Synthèse de l'acide 11-(4-(4-méthylbenzoyl)phényl)undécanoïque (9)



Le composé **8** (200 mg – 0,51 mmol) est dissous dans 10 mL d'EtOH 95% (v/v) sous agitation puis de l'hydroxyde de sodium (85 mg – 1,52 mmol) y est ajouté. Le milieu réactionnel résultant est agité pendant 12 h à température ambiante. La solution obtenue est rectifiée jusqu'à pH = 1 avec une solution aqueuse d'HCl 1N puis extraite avec AcOEt et enfin lavée avec de la saumure. La phase organique récupérée est ensuite séchée avec MgSO₄, filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par recristallisation dans l'éther pour conduire au produit **9** obtenu sous la forme d'un solide blanc (180 mg – Rdt : 93 %).

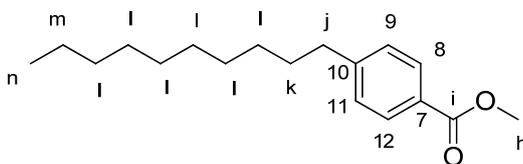
CCM : R_f = 0,8 (CH₂Cl₂/MeOH 9/1 v/v).

RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) δ = 7,74-7,71 (dd, 4H_{2,6,10,12}, J = 8,1, 2,7), 7,29-7,27 (d, 4H_{3,5,7,9}, J = 7,4), 2,69 (t, 2H_h, J = 7,7), 2,45 (s, 3H_a), 2,36 (t, 2H_c, J = 7,5), 1,65-1,61 (m, 4H_{g+d}), 1,41-1,22 (m, 12H_{e+f}).

RMN ¹³C (75 MHz ; CDCl₃) δ = 196,3 (C_b), 179,1 (C_i), 147,9 (C₁₁), 142,9 (C₁), 135,4, 135,2 (C₄₊₈ pour les 2 pics), 130,2, 128,9, 128,3, 36,0 (C_c), 33,9 (C_h), 31,2 (C_d), 29,5, 29,4, 29,4, 29,3, 29,2, 29,0 (C_{e+f} pour les 6 pics), 24,7 (C_g), 21,6 (C_a).

Masse : ESI m/z = 381,2 [M+H]⁺, masse calculée = 380,2 g.mol⁻¹.

Synthèse du 4-décylbenzoate de méthyle (**10**)



Du chlorure de 4-décylbenzoyle (1,00 g – 3,56 mmol) est dissous dans 10 mL de méthanol sous agitation et à température ambiante. Puis de la diméthylaminopyridine (43 mg – 0,36 mmol) est ajoutée à la solution et le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 1 h. Le méthanol est ensuite évaporé sous pression réduite puis la solution est redissoute dans 20 mL de CH₂Cl₂. Le mélange obtenu est lavé avec de l'eau (2 fois 20 mL). La phase aqueuse est extraite avec CH₂Cl₂ et les phases organiques récupérées sont séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est séché sous la pompe à palettes pendant une nuit pour conduire au produit **10** sous la forme d'une huile incolore (973 mg – Rdt : 99%).

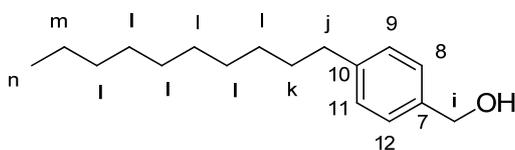
CCM : R_f = 0,7 (cyclohexane/AcOEt 8/2 v/v).

RMN ¹H (400 MHz ; CDCl₃) δ = 7,96 (d, 2H₈₊₁₂, J = 8,2), 7,24 (d, 2H₉₊₁₁, J = 8,2), 3,90 (s, 3H_h), 2,66 (t, 2H_j, J = 7,8), 1,63 (m, 2H_k), 1,32-1,27 (m, 14H_{l+m}), 0,89 (t, 3H_n, J = 6,7).

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃) δ = 167,8 (C_i), 149,1 (C₁₀), 130,3 (C₈₊₁₂), 129,0 (C₉₊₁₁), 128,3 (C₇), 52,5 (C_h), 36,7 (C_j), 32,6, 31,8, 30,2, 30,2, 30,1, 30,0, 29,9 (C_{l+k} pour les sept pics), 23,3 (C_m), 14,7 (C_n).

Masse : m/z = 277,2 [M+H]⁺, masse calculée = 276,2 g.mol⁻¹.

Synthèse du (4-décylphényl)méthanol (11)



Du tétrahydroaluminate de lithium (40 mg – 1,03 mmol) est dissous dans 15 mL d'éther diéthylique sous agitation, sous argon et à température ambiante dans un ballon sec muni d'un condenseur. Puis **10** (950 mg – 3,43 mmol) est ajouté goutte à goutte à la solution et le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 1 h. 20 mL d'eau sont ensuite ajoutées avec précaution à la solution puis celle-ci est versée dans de l'eau glacée et une solution aqueuse à 10 % H₂SO₄ (v/v) est ensuite ajoutée. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique et les phases organiques récupérées sont séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'élution Cyclohexane/AcOEt 95/5 à 80/20 v/v) pour conduire au produit **11** obtenu sous la forme d'un solide blanc (768 mg – Rdt : 90%).

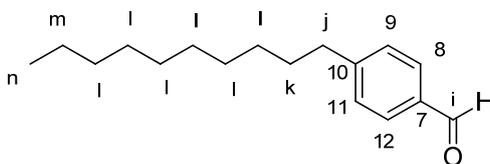
CCM : R_f = 0,6 (Cyclohexane/AcOEt 8/2 v/v).

RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) δ = 7,29 (d, 2H₈₊₁₂, J = 7,9), 7,19 (d, 2H₉₊₁₁, J = 7,9), 4,65 (s, 2H_i), 2,63 (t, 2H_j, J = 7,8), 1,63 (m, 2H_k), 1,29 (m, 14H_{l+m}), 0,91 (t, 3H_n, J = 6,8).

RMN ¹³C (75 MHz ; CDCl₃) δ = 143,1 (C₇), 138,8 (C₁₀), 129,2 (C₉₊₁₁), 127,8 (C₈₊₁₂), 65,9 (C_i), 36,3 (C_j), 32,6, 32,2, 30,3, 30,2, 30,0 (C_{l+k} pour les 5 pics), 23,3 (C_m), 14,7 (C_n).

Masse (GCMS) : m/z = 246,2 , masse calculée = 248,2 g.mol⁻¹.

Synthèse du 4-décylbenzaldéhyde (**12**)



A du chlorure d'oxalyle (390 μ L – 4,63 mmol) à -78 °C est ajouté, avec précaution, du diméthylsulfoxyde (460 μ L – 6,49 mmol) en solution dans 10 mL de CH_2Cl_2 à -78 °C, sous argon et sous agitation pendant 10 min. Puis l'alcool **11** (768 mg – 3,09 mmol) dissous dans 10 mL de CH_2Cl_2 est ajouté prudemment à -78 °C. La solution résultante est agitée pendant 20 min. De la triéthylamine (1,73 mL – 12,4 mmol) est ensuite ajoutée puis la solution est laissée revenir à température ambiante. 20 mL d'une solution de $NaHCO_3$ saturée sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel. La phase aqueuse est extraite avec du diéthyl éther (1 fois 50 mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution de $KHSO_4$ saturée, avec une solution de $NaHCO_3$ saturée et avec de la saumure puis séchées sur $MgSO_4$, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite pour conduire au produit **12** obtenu sous la forme d'une huile incolore (662 mg – Rdt : 87%).

CCM : Rf = 0,7 (Cyclohexane/AcOEt 8/2 v/v).

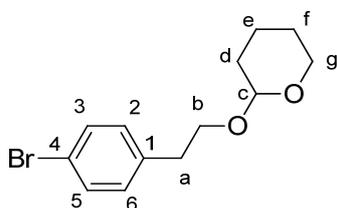
RMN ¹H (300 MHz ; $CDCl_3$) δ = 9,98 (s, 1H_i), 7,80 (d, 2H₈₊₁₂, J = 8,0), 7,34 (d, 2H₉₊₁₁, J = 8,1), 2,69 (t, 2H_j, J = 7,8), 1,65 (m, 2H_k), 1,27 (m, 14H_{l+m}), 0,89 (t, 3H_n, J = 6,6).

RMN ¹³C (75 MHz ; $CDCl_3$) δ = 192,5 (C_i), 151,1 (C₁₀), 135,1 (C₇), 130,5 (C₈₊₁₂), 129,7 (C₉₊₁₁), 36,9 (C_j), 32,6, 31,7, 30,2, 30,1, 30,0 (C_{l+k} pour les 5 pics), 23,3(C_m), 14,7 (C_n).

Masse : ESI m/z = 247,2 [M+H]⁺, masse calculée = 246,2 g.mol⁻¹

HRMS m/z = 246,2004, masse calculée = 246,1984 g.mol⁻¹.

Synthèse du 2-(4-bromophénoxy)-tétrahydro-2H-pyrane (13)



L'alcool 4-bromophénoxy (1,5 g – 7,44 mmol) est dissous dans 30 mL CH_2Cl_2 puis du 3,4-dihydro-2H-pyrane (3,13 g – 0,04 mol) et de l'acide toluène-4-sulfonique (14,1 mg – 0,074 mmol) sont ajoutés. La solution est agitée à température ambiante pendant 6 h. La phase organique est ensuite diluée avec 50 mL de CH_2Cl_2 puis lavée avec une solution de $NaHCO_3$ saturée (2 fois 30 mL), avec de l'eau (1 fois 30 mL) et avec de la saumure (1 fois 30 mL). La phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (2 fois 75 mL). Les deux phases organiques collectées sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'élution cyclohexane/AcOEt 100/0 à 100/3 v/v) pour conduire au produit **13** obtenu sous la forme d'une huile incolore (1,95 g – Rdt : 92 %).

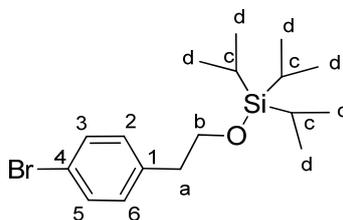
CCM : Rf = 0,7 (cyclohexane/AcOEt 9/1 v/v).

RMN ¹H (300 MHz ; $CDCl_3$) δ = 7,40 (m, 2H₃₊₅), 7,12 (m, 2H₂₊₆), 4,58 (t, 1H_c, J = 3,7), 3,93 (dt, 1H_b, J = 9,8, 7,0), 3,74 (m, 1H_g), 3,59 (dt, 1H_b, J = 9,8, 6,9), 3,46 (m, 1H_g), 2,86 (t, 2H_a, J = 7,0), 1,85-1,45 (m, 6H_{d,e,f}).

RMN ¹³C (75 MHz ; $CDCl_3$) δ = 138,9 (C₁), 131,9 (C₃₊₅), 131,4 (C₂₊₆), 120,6 (C₄), 99,4 (C_c), 68,5 (C_b), 62,8 (C_g), 36,4 (C_a), 31,3 (C_d), 26,1 (C_f), 20,1 (C_e).

Masse : m/z = 293,0 [M+Li]⁺, masse calculée = 285,2 g.mol⁻¹.

Synthèse du (4-bromophénoxy)triisopropylsilane (**14**)



De l'alcool 4-bromophénoxy (500 mg – 2,48 mmol) est dissous dans 10 mL CH₂Cl₂ puis du chlorure de triisopropylsilyle (720 mg – 3,73 mmol) et de l'imidazole (506 mg – 7,44 mmol) sont ajoutés. La solution est agitée à température ambiante pendant 2 h. La phase organique est lavée avec une solution de NaHCO₃ saturée (2 fois 10 mL), avec de l'eau (1 fois 10 mL) et avec de la saumure (1 fois 10 mL). La phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂ (2 fois 30 mL). Les deux phases organiques collectées sont séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'éluion cyclohexane/AcOEt 100/0 à 100/10 v/v) pour conduire au produit **14** obtenu sous la forme d'une huile incolore (880 mg – Rdt : 99 %).

CCM : R_f = 0,9 (cyclohexane/AcOEt 8/2 v/v).

RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) δ = 7,40 (m, 2H₃₊₅), 7,11 (m, 2H₂₊₆), 3,87 (t, 1H_b, J = 6,9), 2,81 (t, 1H_a, J = 6,9), 1,05 (m, 21H_{c+d}).

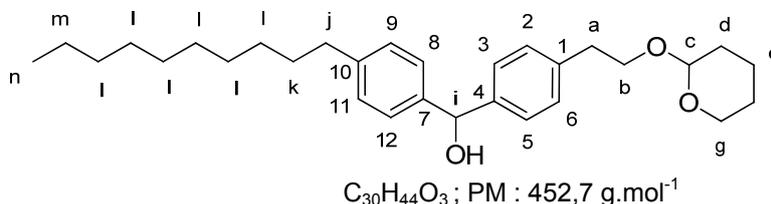
RMN ¹³C (75 MHz ; CDCl₃) δ = 139,0 (C₁), 131,9 (C₃₊₅), 131,6 (C₂₊₆), 120,6 (C₄), 65,1 (C_b), 39,8 (C_a), 18,6 (C_d), 12,7 (C_c).

Masse : ESI m/z = 357,1 [M+H]⁺, masse calculée = 356,1 g.mol⁻¹

HRMS m/z (avec ⁷⁹Br et un isobutyl en moins) = 313,0638,

masse calculée (avec ⁷⁹Br et un isobutyl en moins) = 313,0623 g.mol⁻¹.

Synthèse du (4-décylphényl)(4-(2-(tétrahydro-2H-pyran-2-yloxy)éthyl)phényl) méthanol (15)



13 (667 mg – 2,35 mmol) est dissous dans 10 mL de THF sous agitation, sous argon et à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans un ballon sec. Puis du n-butyl lithium (1,76 mL – 2,82 mmol) est ajouté à la solution et celle-ci est laissée sous agitation pendant 1 h. **12** (290 mg – 1,18 mmol) dissous dans 10 mL de THF est ensuite ajouté à la solution maintenue à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le milieu réactionnel revient à température ambiante et la solution est agitée pendant 12 h. 20 mL d'une solution de NaHCO_3 saturée sont ajoutés à la solution et celle-ci est ensuite extraite avec AcOEt. Les phases organiques récupérées sont lavées avec une solution de NaHCO_3 saturée et de la saumure puis séchées sur MgSO_4 , filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'éluion Cyclohexane/AcOEt 100/0 à 85/15 v/v) pour conduire au produit **15** obtenu sous la forme d'une huile incolore (101 mg - Rdt : 19%)

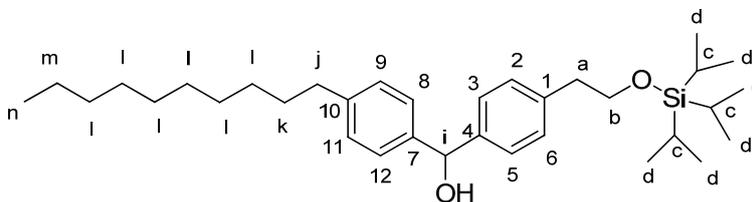
CCM : Rf = 0,2 (Cyclohexane/AcOEt 8/2 v/v).

RMN ^1H (300 MHz ; CDCl_3) δ = 7,32 – 7,13 (m, 8H_{2,3,5,6,8,9,11,12}), 5,80 (s, 1H_i), 4,59 (t, 1H_c, J = 3,4), 3,93 (dt, 1H_b, J = 9,8, 7,2), 3,74 (m, 1H_g), 3,61 (dt, 1H_b, J = 9,6, 7,2), 3,45 (m, 1H_g), 2,90 (t, 2H_a, J = 7,3), 2,59 (t, 2H_j, J = 7,5), 1,84-1,27 (m, 22H_{d,e,f,k,l,m}), 0,90 (t, 3H_n, J = 6,6).

RMN ^{13}C (75 MHz ; CDCl_3) δ = 142,9, 142,6 (C₇₊₄ pour les 2 pics), 141,9 (C₁₀), 139,0 (C₁), 129,7, 129,1, 127,1 (C_{2,3,5,6,8,9,11,12} pour les 3 pics), 99,3 (C_c), 76,6 (C_i), 68,8 (C_b), 62,8 (C_g), 36,7 (C_j), 36,3 (C_a), 32,6, 32,2, 31,3, 30,3, 30,0 (C_{d,k,l} pour les 5 pics), 26,1 (C_f), 23,4 (C_m), 20,1 (C_e), 14,8 (C_n).

Masse : m/z = 459,4 [M+Li]⁺, masse calculée = 452,3 g.mol⁻¹.

Synthèse du (4-décylphényl)(4-(2-(triisopropylsilyloxy)éthyl)phényl)méthanol (16)



L'alcool protégé **14** (957 mg – 2,67 mmol) est dissous dans 10 mL de THF sous agitation, sous argon et à –78 °C dans un bicol sec. Puis du n-butyl lithium (1,8 mL – 2,92 mmol) est ajouté goutte à goutte à la solution et celle-ci est laissée sous agitation à –78 °C pendant 1 h. L'aldéhyde **12** (600 mg – 2,43 mmol) dissous dans 10 mL de THF est ensuite ajouté, goutte à goutte, à la solution maintenue à –78°C puis on laisse le milieu réactionnel revenir à température ambiante et la solution est agitée pendant 12 h. 20 mL d'une solution de NaHCO₃ saturée sont ajoutés à la solution et celle-ci est ensuite extraite avec AcOEt. Les phases organiques récupérées sont lavées avec une solution de NaHCO₃ saturée et de la saumure puis séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'élution Cyclohexane/AcOEt 100/0 à 100/7 v/v) pour conduire au produit **16** obtenu sous la forme d'une huile incolore (892 mg- Rdt : 70%)

CCM : Rf = 0,6 (Cyclohexane/AcOEt 8/2 v/v).

RMN ¹H (400 MHz ; CDCl₃) δ = 7,32 – 7,13 (m, 8H_{2,3,5,6,8,9,11,12}), 5,81 (s, 1H_i), 3,89 (dt, 2H_b, J = 10,6, 7,2), 2,86 (dt, 2H_a, J = 10,6, 7,2), 2,59 (t, 2H_j, J = 7,8), 1,59 (m, 2H_k), 1,30 (m, 14H_{l+m}), 1,05 (m, 21H_{c+d}), 0,89 (t, 3H_n, J = 6,7).

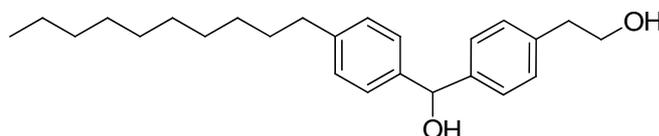
RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃) δ = 142,9, 142,5 (C₇₊₄ pour les 2 pics), 141,9 (C₁₀), 139,2 (C₁), 129,9, 129,1, 127,1 (C_{2,3,5,6,8,9,11,12} pour les 3 pics), 76,7 (C_i), 65,5(C_b), 40,1 (C_a), 36,3 (C_j), 32,6, 32,2, 30,3, 30,2, 30,0 (C_{k,l} pour les 5 pics), 23,4 (C_m), 18,6 (C_d), 14,8 (C_n), 12,7 (C_c).

Masse : ESI m/z = 547,4 [M+Na]⁺, masse calculée = 524,4 g.mol⁻¹.

HRMS m/z (avec un isopropyle en moins) = 481,3496,

masse calculée (avec un isopropyle en moins) = 481,3502 g.mol⁻¹

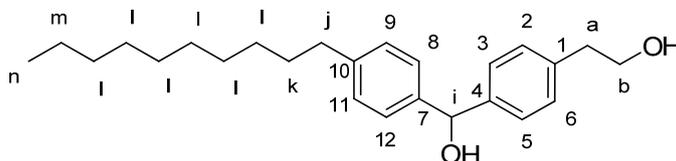
Synthèse du 2-(4-((4-décylphényl)(hydroxy)méthyl)phényl)éthanol (17)



C₂₅H₃₆O₂ ; PM : 368,5 g.mol⁻¹

15 (100 mg – 0,22 mmol) est dissous dans une solution de AcOH/THF/H₂O 4/2/1 v/v/v sous agitation à température ambiante pendant 30 h. 10 mL d'une solution de NaHCO₃ saturée est ajouté à la solution puis celle-ci est extraite avec CH₂Cl₂ (2 fois 20 mL). Les phases organiques récupérées sont lavées avec une solution de NaHCO₃ saturée et de la saumure puis séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit obtenu est utilisé sans purification supplémentaire pour l'étape suivante (synthèse de **18**).

Synthèse du 2-(4-((4-décylphényl)(hydroxy)méthyl)phényl)éthanol (17)



C₂₅H₃₆O₂ ; PM : 368,5 g.mol⁻¹

16 (842 mg – 1,60 mmol) est dissous dans 10 mL de THF sous agitation et du fluorure de tetra-n-butylammonium (3 mL – 3 mmol) est ajouté à la solution. Celle-ci est laissée sous agitation pendant 1,5 h. 10 mL d'une solution de NaHCO₃ saturée sont ajoutés à la solution et celle-ci est ensuite extraite avec AcOEt. Les phases organiques récupérées sont lavées avec une solution de NaHCO₃ saturée puis séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient

d'élution CH₂Cl₂/MeOH 100/0 à 98/2 v/v) pour conduire au produit **17** obtenu sous la forme d'un solide blanc (427 mg- Rdt : 73%).

CCM : Rf = 0,5 (CH₂Cl₂/MeOH 9/1 v/v).

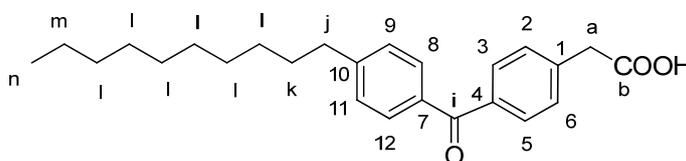
RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) δ = 7,36 – 7,14 (m, 8H_{2,3,5,6,8,9,11,12}), 5,82 (s, 1H_i), 3,85 (m, 2H_b), 2,86 (t, 2H_a, J = 6,5), 2,58 (t, 2H_j, J = 7,8), 1,59 (m, 2H_k), 1,26 (m, 14H_{l+m}), 0,89 (t, 3H_n, J = 6,7).

RMN ¹³C (75 MHz ; CDCl₃) δ = 143,0 (C₇), 142,9 (C₄), 141,8 (C₁₀), 138,3 (C₁), 129,7 (C_{9,11}), 129,2 (C_{2,6}), 127,4 (C_{8,12}), 127,1 (C_{3,5}), 76,6 (C_i), 64,2 (C_b), 39,5 (C_a), 36,3 (C_j), 32,6, 32,1, 30,3, 30,2, 30,0 (C_{k+l} pour les 5 pics), 23,4 (C_m), 14,8 (C_n).

Masse : ESI m/z = 351,2 [M+H-H₂O]⁺, masse calculée = 368,3 g.mol⁻¹,

HRMS m/z = 368,2738, masse calculée 368,2715 g.mol⁻¹.

Synthèse de l'acide (4-(4-décylbenzoyl)phényl)éthanoïque (**18**)



C₂₅H₃₂O₃ ; PM : 380,5 g.mol⁻¹

17 (410 mg – 1,11 mmol) est dissous dans 10 mL d'acétone puis 1 mL de réactif de Jones 2,67 M (26,72 g de trioxyde de chrome, 23 mL d'acide sulfurique concentré, 77 mL d'eau) est ajouté goutte à goutte à la solution. Celle-ci est agitée à température ambiante pendant 2 h. L'excès de réactif est réduit par quelques gouttes d'isopropanol. 20 mL d'eau sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel pour dissoudre le précipité de sel de chrome. L'acétone est évaporée sous pression réduite. La phase aqueuse est alors extraite avec du CH₂Cl₂ (4 fois 20 mL). Les phases organiques récupérées sont séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'élution Cyclohexane/AcOEt 95/5 à 85/15 v/v) pour

conduire au produit **18** obtenu sous la forme d'un solide blanc (384 mg - Rdt : 91%).

CCM : Rf = 0,4 (CH₂Cl₂/MeOH 9/1 v/v).

Point de fusion : 71,0 – 72,5 °C.

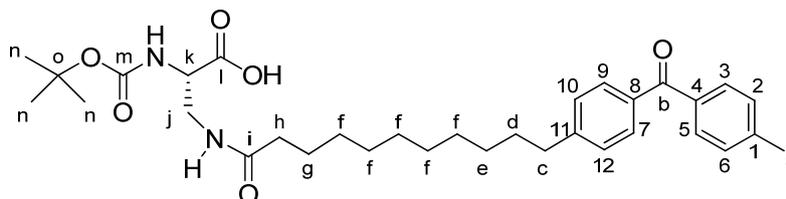
RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) δ = 7,77 (dd, 4H_{3,5,8,12}, J = 12,8, 8,2), 7,35 (dd, 4H_{2,6,9,11}, J = 38,7, 8,1), 3,76 (s, 2H_a), 2,69 (t, 2H_j, J = 7,7), 1,64 (m, 2H_k), 1,28 (m, 14H_{l+m}), 0,89 (t, 3H_n, J = 6,4).

RMN ¹³C (75 MHz ; CDCl₃) δ = 196,8 (C_i), 177,4 (C_b), 149,0 (C₁₀), 138,3, 137,6, 135,6 (C_{1,4,7} pour les 3 pics), 131,0, 130,0, 129,0 (C_{2,3,5,6,8,9,11,12} pour les 3 pics), 41,6 (C_a), 36,7 (C_j), 32,6, 31,8, 30,2, 30,0 (C_{k+l} pour les 4 pics), 23,3 (C_m), 14,8 (C_n).

Masse : ESI m/z = 381,2 [M+H]⁺, masse calculée = 380,2 g.mol⁻¹.

4.4. Synthèse des sondes lipidiques à partir des acides gras **9** et **18**

Synthèse de l'acide (**S**)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-3-(11-(4-(4-méthylbenzoyl)phényl)undécánamido)propanoïque (**9.1**)



9 (190 mg – 0,5 mmol) est dissous dans 3 mL de CH₂Cl₂. La DIEA (194 mg – 1,5 mmol) et le PyBOP (260 mg – 0,5 mmol) sont ajoutés à la solution. Après 10 min d'agitation à température ambiante, le Boc-L-Dpr-OH (100 mg - 0,5 mmol) préalablement dissous dans 4 mL de CH₂Cl₂ et 3 mL de MeOH est ajouté au milieu réactionnel. La solution est agitée à température ambiante et sous argon pendant 2,5 h. La phase organique est ensuite lavée avec de l'eau distillée (2 fois 15 ml) puis la phase aqueuse est extraite avec CH₂Cl₂ (2 fois 20 ml). Les

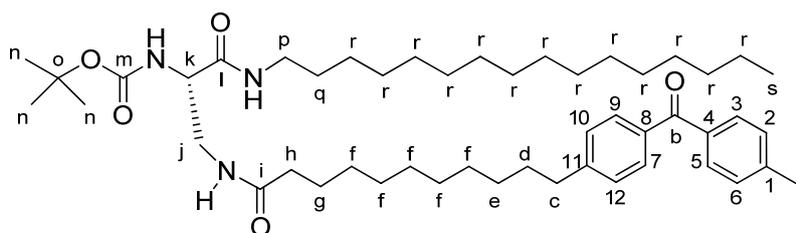
deux phases organiques collectées sont séchées sur Na_2SO_4 et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'éluion $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 100/0 à 100/10 v/v) pour conduire au produit **9.1** obtenu sous la forme d'un solide blanc (258 mg – Rdt : 90 %).

CCM : $R_f = 0,3$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1 v/v).

RMN ^1H (300 MHz ; CDCl_3) $\delta = 7,69$ (m, 4H), 7,27 (m, 4H), 4,14 (m, 1H), 3,74 (q, $J = 7$ Hz, 1H), 2,65 (m, 2H), 2,42 (s, 3H), 2,17 (m, 2H), 1,62 – 1,21 (m, 25H).

Masse : $m/z = 567,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, masse calculée = 566,3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Synthèse du (S)-tert-butyl 1-(hexadécylamino)-3-(11-(4-(4-méthylbenzoyl)phényl)undécylamido)-1-oxopropan-2-ylcarbamate (**9.2**)



$\text{C}_{49}\text{H}_{79}\text{N}_3\text{O}_5$; PM : 790,2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

9.1 (150 mg – 0,26 mmol) est dissous dans 4,5 mL de CH_2Cl_2 . La DIEA (102 mg – 0,79 mmol) et le PyBOP (138 mg – 0,26 mmol) sont ajoutés à la solution. Après 10 min d'agitation à température ambiante, de l'hexadécylamine (63 mg-0,265 mmol) est ajoutée au milieu réactionnel. La solution est agitée à température ambiante et sous argon pendant 5 h. La phase organique est ensuite lavée avec 20 mL d'eau distillée puis la phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (2 fois 20 mL). Les deux phases organiques collectées sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'éluion $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 100/2 à 100/4 v/v) pour conduire au produit **9.2** obtenu sous la forme d'un solide blanc et gras (134 mg – Rdt : 64 %).

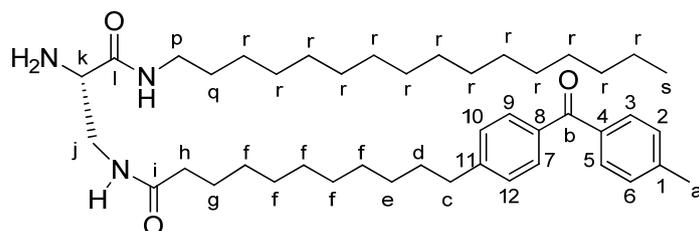
CCM : Rf = 0,8 (CH₂Cl₂/MeOH 9/1 v/v).

RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) δ = 7,73 (dd, 4H_{2,6,10,12}, J = 8,1, 2,7), 7,29 (d, 4H_{3,5,7,9}, J = 7,4), 6,82 (s, 1H_{NH}), 6,27 (s, 1H_{NH}), 5,99 (s, 1H_{NH}), 4,16 (m, 1H_k), 3,74 (m, 1H_j), 3,51 (m, 1H_j), 3,23 (m, 2H_p), 2,69 (t, 2H_h, J = 7,6), 2,45 (s, 3H_a), 2,19 (t, 2H_c, J = 7,7), 1,67 – 1,25 (m, 53H_{d,e,f,q,r}), 0,89 (m, 3H_s).

RMN ¹³C (75 MHz ; CDCl₃) δ = 196,9 (C_b), 148,5 (C₁₁), 143,6 (C₁), 136,1, 135,9 (C₄₊₈ pour les 2 pics), 130,8, 129,6, 128,9, 81,0 (C_o), 55,9 (C_k), 42,7 (C_j), 40,2 (C_p), 37,3 (C_h), 36,7 (C_c), 32,6 (C_r), 31,8 (C_d), 30,4, 30,2, 30,2, 30,1, 30,0, 29,9 (C_{e+f+r} pour les 6 pics), 29,0 (C_n), 27,5 (C_q), 26,4 (C_g), 23,4 (C_r), 22,3 (C_a), 14,8 (C_s).

Masse : m/z = 790,6 [M+H]⁺, masse calculée = 789,6 g.mol⁻¹.

Synthèse du (S)-N-(2-amino-3-(hexadécylamino)-3-oxopropyl)-11-(4-(4-méthyl benzoyl)phényl)undécaneamide (9.3)



C₄₁H₇₁N₃O₃ ; PM : 690,1 g.mol⁻¹

9.2 (130 mg – 0,16 mmol) est dissous dans un mélange CH₂Cl₂/TFA 50/50 v/v. La solution est agitée à température ambiante pendant 2 h. La phase organique est ensuite diluée avec 75 mL de CH₂Cl₂ puis lavée avec une solution de NaHCO₃ 2M (3 fois 25 ml). La phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂ (2 fois 50 mL) et les deux phases organiques collectées sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite pour conduire au produit **9.3** obtenu sous la forme d'un solide blanc (95 mg – Rdt : 86 %) sans purification supplémentaire.

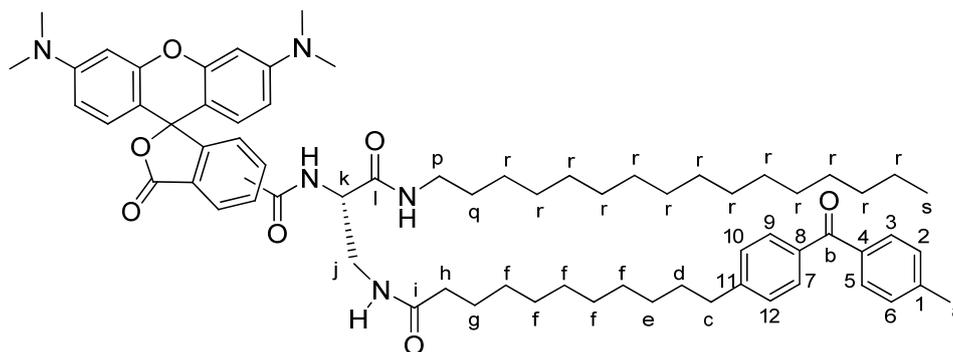
CCM : Rf = 0,6 (CH₂Cl₂/MeOH 9/1 v/v).

RMN ¹H (400 MHz ; CDCl₃) δ = 7,72 (dd, 4H_{2,6,10,12}, J = 8,1, 2,7), 7,53 (t, J = 5,6 Hz, 1H_{NH}), 7,29 (d, 4H_{3,5,7,9}, J = 7,4), 6,31 (m, 1H_{NH}), 3,65 (m, 1H_k), 3,47 (m, 2H_j), 3,24 (q, 2H_p, J = 6,7), 2,68 (t, 2H_h, J = 7,7), 2,45 (s, 3H_a), 2,18 (t, 2H_c, J = 7,6), 1,63 (m, 4H), 1,51 (m, 2H_{NH2}), 1,28 (m, 40H_{d,e,f,q,r}), 0,89 (t, 3H_s, J = 6,8).

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃) δ = 196,9 (C_b), 175,0 (C_i), 173,9 (C_l), 148,5 (C₁₁), 143,6 (C₁), 136,1, 135,9 (C₄₊₈ pour les 2 pics), 130,9, 129,6, 128,9, 55,9 (C_k), 44,3 (C_j), 39,9 (C_p), 37,5 (C_h), 36,7 (C_c), 32,6 (C_r), 31,8 (C_d), 30,4, 30,3, 30,2, 30,1, 30,0, 29,9 (C_{e+f+r} pour les 6 pics), 27,7 (C_q), 26,4 (C_g), 23,4 (C_r), 22,3 (C_a), 14,8 (C_s).

Masse : m/z = 690, 5 [M+H]⁺, masse calculée = 689,5 g.mol⁻¹.

Synthèse de Rhod-Dpr(CO-C₁₀-BP-C₁)-NH-C₁₆H₃₃ (9.4)



C₆₉H₉₁N₅O₇ ; PM : 1102,5 g.mol⁻¹

43 mg 5,6 tétraméthyl-carboxy-rhodamine (5,6-CTMR) (0,099 mmol) sont dissous dans 3 mL de CH₂Cl₂. De la DIEA (30 mg – 0,230 mmol) et le PyBOP (52 mg – 0,099 mmol) sont ajoutés à la solution. Après 20 min d'agitation à température ambiante, **9.3** (53 mg – 0,077 mmol) préalablement dissous dans 3 mL de CH₂Cl₂ et deux gouttes de méthanol sont ajoutées au milieu réactionnel. La solution est agitée à température ambiante et sous argon pendant 24 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'élution CH₂Cl₂/MeOH 100/0 à 100/12 v/v) pour

conduire au produit **9.4** obtenu sous la forme d'un solide violet (63 mg – Rdt : 74 %).

CCM : Rf = [0,8 ; 0,7] (CH₂Cl₂/MeOH 8,5/1,5 v/v).

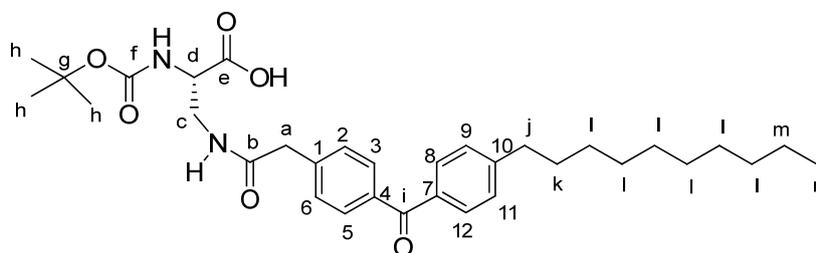
RMN ¹H (500 MHz ; CDCl₃) δ = 8,79 (m,1H), 8,65 (m,1H), 8,09 (m,1H), 7,75 (m, 2H), 7,72 (d, 4H, J = 8,1), 7,56 (m, 2H), 7,26 (m, 4H), 6,91 (m, 1H), 6,56 (m, 2H), 4,11 (m, 1H), 3,90 (m, 2H), 3,25-3,13 (m, 14H), 2,65 (m, 2H), 2,44 (s, 3H), 2,19 (m, 2H), 1,61 (m, 4H), 1,28 (m, 40H), 0,87 (m, 3H).

RMN ¹³C (125 MHz ; CDCl₃) δ = 197,0, 176,4, 170,7, 167,8, 156,5, 156,0, 148,6, 143,6, 142,9, 136,0, 135,8, 130,9, 129,6, 128,9, 126,2, 125,3, 118,7, 111,6, 97,6, 64,7, 54,4, 44,2, 42,7, 41,3, 40,5, 37,5, 36,7, 32,6, 31,8, 30,4, 30,3, 30,2, 30,1, 30,0, 29,9, 27,7, 26,4, 23,4, 22,3, 14,8.

Masse : HRMS : m/z = 1102,6951 [M+H]⁺, masse calculée = 1101,6918 g.mol⁻¹.

HPLC : Tr = 13,6 min.

Synthèse de l'acide (S)-2-(tert-butoxycarbonylamino)-3-(2-(4-(4-décyl benzoyl)phényl)acétamido)propanoïque (18.1)



C₃₃H₄₆N₂O₆ ; PM : 566,7 g.mol⁻¹

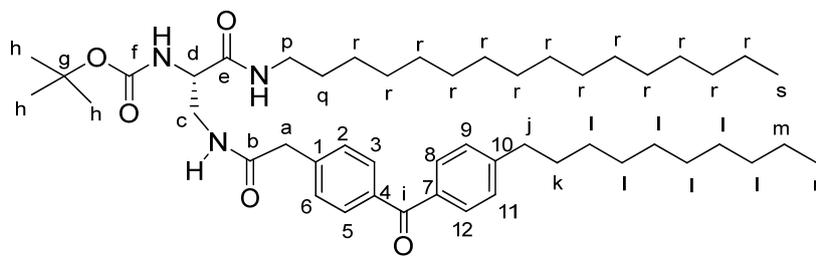
18 (190 mg – 0,5 mmol) est dissous dans 3 mL de CH₂Cl₂. De la DIEA (250 µL – 2,5 mmol) et le PyBOP (260 mg – 0,5 mmol) sont ajoutés à la solution. Après 10 min d'agitation à température ambiante, le Boc-L-Dap-OH (100 mg- 0,5 mmol) préalablement dissous dans 4 mL de CH₂Cl₂ et 3 mL de MeOH est ajouté au milieu réactionnel. La solution est agitée à température ambiante et sous argon pendant 12 h. La phase organique est ensuite lavée avec une solution de NaHCO_{3sat} (2 fois 15 ml) puis la phase aqueuse est extraite avec CH₂Cl₂ (2 fois

20 ml). Les deux phases organiques collectées sont séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'éluion $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 100/0 à 100/15 v/v) pour conduire au produit **18.1** obtenu sous la forme d'un solide blanc (138 mg – Rdt : 50%).

CCM : $R_f = 0,3$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1 v/v).

Masse : $m/z = 467,2$ $[\text{M}+\text{H}-\text{Boc}]^+$, $565,2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, masse calculée = $566,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Synthèse du (S)-tert-butyl 3-(2-(4-(4-décylbenzoyl)phényl)acétamido)-1-(hexadécylamino)-1-oxopropan-2-ylcarbamate (18.2)



$\text{C}_{49}\text{H}_{79}\text{N}_3\text{O}_5$; PM : $790,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

18.1 (138 mg – 0,24 mmol) est dissous dans 5 mL de CH_2Cl_2 . La DIEA (200 μL – 1,21 mmol) et le PyBOP (164 mg – 0,32 mmol) sont ajoutés à la solution. Après 10 min d'agitation à température ambiante, de l'hexadécylamine (59 mg- 0,24 mmol) est ajoutée au milieu réactionnel. La solution est agitée à température ambiante et sous argon pendant 12 h. La phase organique est ensuite lavée avec 20 mL d'eau distillée puis la phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 (2 fois 20 mL). Les deux phases organiques collectées sont séchées sur MgSO_4 , filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 100/0 à 100/4 v/v) pour conduire au produit **18.2** obtenu sous la forme d'un solide blanc et gras (104 mg – Rdt : 54 %).

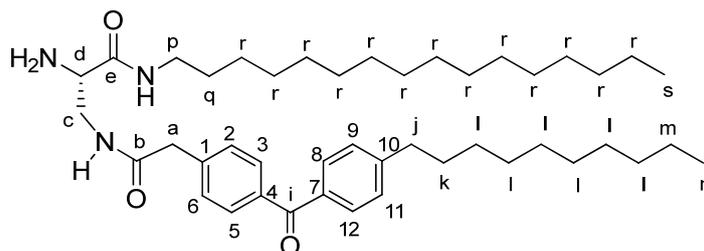
CCM : Rf = 0,5 (CH₂Cl₂/MeOH 9/1 v/v).

RMN ¹H (400 MHz ; CDCl₃) δ = 7,77 (dd, 4H_{2,6,10,12}, J = 17,5, 8,1), 7,33 (m, 4H_{3,5,7,9}), 6,68 (s, 1H_{NH}), 6,37 (s, 1H_{NH}), 5,83 (d, 1H_{NH} J = 6,5), 4,17 (m, 1H_d), 3,72 (m, 1H_c), 3,64 (s, 2H_a), 3,50 (m, 1H_c), 3,21 (q, 2H_p, J = 6,5), 2,69 (t, 2H_j, J = 7,6), 1,67 – 1,25 (m, 53H_{h,k,l,m,q,r}), 0,89 (t, 6H_{s,n}, J = 6,6).

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃) δ = 196,5 (C_i), 172,6 (C_b), 170,9 (C_f), 149,0 (C₁₀), 139,5 (C_f), 137,8 (C₁), 135,6 (C_{4,7}), 131,3, 130,9, 129,8, 129,1 (C_{2,3,5,6,8,9,11,12} pour les 4 pics), 81,2 (C_g), 44,2 (C_c), 40,3 (C_a), 36,7 (C_p), 31,9, 30,4, 30,3, 30,2, 30,1, 30,0 (C_{j,k,l,r} pour les 6 pics), 29,0 (C_h), 27,5 (C_{q,r}), 23,4 (C_{m,r}), 14,8 (C_{n,s}).

Masse : m/z = 690,4 [M+H-Boc]⁺, masse calculée = 789,6 g.mol⁻¹.

Synthèse du (S)-2-amino-3-(2-(4-(4-décylbenzoyl)phényl)acétamido)-N-hexadécylpropanamide (18.3)



C₄₉H₇₉N₃O₅; PM : 690,1 g.mol⁻¹

18.2 (100 mg – 0,16 mmol) est dissous dans un mélange CH₂Cl₂/TFA 50/50 v/v. La solution est agitée à température ambiante pendant 5 h. La phase organique est ensuite diluée avec 50 mL de CH₂Cl₂ puis lavée avec une solution de NaHCO_{3sat} (3 fois 50 ml). La phase aqueuse est extraite avec du CH₂Cl₂ (2 fois 50 mL) et les deux phases organiques collectées sont séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite pour conduire au produit **18.3** obtenu sous la forme d'un solide blanc (83 mg – Rdt : 95 %) sans purification supplémentaire.

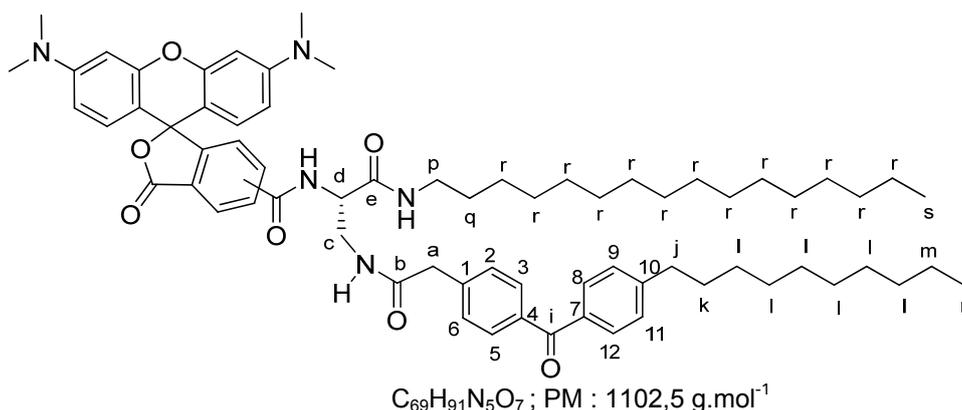
CCM : Rf = 0,6 (CH₂Cl₂/MeOH 9/1 v/v).

RMN ¹H (400 MHz ; CDCl₃) δ = 7,75 (dd, 4H_{2,6,10,12}, J = 17,5, 8,1), 7,44 (s, 1H_{NH}), 7,34 (m, 4H_{3,5,7,9}), 6,52 (s, 1H_{NH}), 3,63 (s, 2H_a), 3,45 (m, 2H_c), 3,21 (m, 2H_p), 2,69 (t, 2H_j, J = 7,6), 1,65 (m, 2H_q), 1,48 (m, 2H_{NH2}), 1,25 (m, 42H_{k,l,m,r}), 0,88 (t, 6H_{s,n}, J = 6,6).

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃) δ = 196,5 (C_i), 172,6 (C_b), 149,0 (C₁₀), 139,5 (C₄), 137,8 (C₁), 135,6 (C₇), 131,3, 130,9, 129,8, 129,1 (C_{2,3,5,6,8,9,11,12} pour les 4 pics), 55,7 (C_d), 44,2 (C_c), 40,3 (C_a), 36,7 (C_p), 31,9, 30,4, 30,3, 30,2, 30,1, 30,0 (C_{j,k,l,r} pour les 6 pics), 27,5 (C_{q,r}), 23,4 (C_{m,r}), 14,8 (C_{n,s}).

Masse : m/z = 690, 5 [M+H]⁺, masse calculée = 689,5 g.mol⁻¹.

Synthèse de Rhod-Dpr(CO-C₅-BP-C₆)-NH-C₁₆H₃₃ (**18.4**)



57 mg de 5,6 tétraméthyl-carboxy-rhodamine (5,6-CTMR) (0,131 mmol) sont dissous dans 3 mL de CH₂Cl₂. De la DIEA (80 µL – 0,50 mmol) et le PyBOP (68 mg – 0,131 mmol) sont ajoutés à la solution. Après 20 min d'agitation à température ambiante, **18.3** (70 mg – 0,101 mmol) préalablement dissous dans 3 mL de CH₂Cl₂ est ajouté au milieu réactionnel. La solution est agitée à température ambiante et sous argon pendant 24 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'élution CH₂Cl₂/MeOH 100/0 à 100/12 v/v) pour conduire au produit **18.4** obtenu sous la forme d'un solide violet (74 mg – Rdt : 66 %).

CCM : Rf = [0,5 ; 0,6] (CH₂Cl₂/MeOH 8,5/1,5 v/v).

RMN ¹H (500 MHz ; CDCl₃) δ = 11,01 (s, 1H), 8,78 (m, 1H), 8,12 (m, 1H), 7,78 (m, 2H), 7,61 (m, 4H), 7,27 (m, 4H), 7,10 (m, 2H), 6,66 (m, 1H), 6,52 (m, 2H), 3,63 (s, 2H), 4,75 (m, 2H), 3,18-3,07 (m, 14H), 2,69 (m, 2H), 1,60-1;18 (m, 44H), 0,87 (t, 6H, J = 6,5).

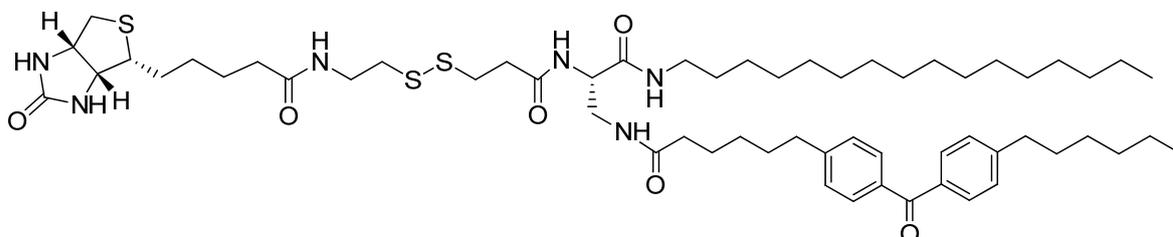
RMN ¹³C (125 MHz ; CDCl₃) δ = 196,8, 170,6, 157,1, 156,6, 149,3, 148,8, 142,7, 137,8, 135,6, 131,3, 130,9, 129,8, 129,1, 126,4, 125,4, 118,7, 111,6, 97,2, 54,3, 44,2, 42,6, 40,3, 36,7, 31,9, 30,4, 30,3, 30,2, 30,1, 30,0, 27,5, 23,4, 14,8.

Masse : m/z = 1102,6 [M+H]⁺, masse calculée = 1101,7 g.mol⁻¹,

HRMS m/z = 1102,6946 [M+H]⁺, masse calculée = 1101,6918 g.mol⁻¹.

HPLC : Tr = 14,1 ; 14,3 min (2 isomères).

Synthèse du N-((S)-3-(hexadécylamino)-3-oxo-2-(3-((2-(5-((3aR,4R,6aS)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)ethyl)disulfanyl)propanamido)propyl)-6-(4-(4-hexylbenzoyl)phenyl)hexanamide (19)



L'acide 3-[2-N-(biotinyl)aminoéthyl]dithio]propanoïque (23 mg - 0,05 mmol) est dissous dans 1 mL de DMF et 0,500 mL de CH₂Cl₂. De la DIEA (56 mg - 0,4 mmol) et le PyBOP (30 mg - 0,06 mmol) sont ajoutés à la solution. Après 20 min d'agitation à température ambiante, **4** (30 mg - 0,04 mmol) préalablement dissous dans 1 mL de CH₂Cl₂ et 0,5 mL de DMF. La solution est agitée à température ambiante et sous argon pendant 12 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par HPLC (colonne C₄), pour conduire au produit **19** obtenu sous la forme d'un solide blanc (7 mg - Rdt : 16 %).

Masse : m/z = 1080,4 [M+H]⁺, masse calculée = 1079,6 g.mol⁻¹,

HRMS m/z = 1079,6483 [M+H]⁺, masse calculée = 1078,6397 g.mol⁻¹

HPLC : Tr = 30,0 min

***III. Caractérisation, développement et
optimisation***

1. Caractérisation de l'activité des sondes lipidiques

Après la synthèse des 6 sondes lipidiques fluorescentes (3 analogues avec le groupement benzophénone à distance variable et 3 autres analogues avec des PFL différentes, chap. II), les propriétés attendues de celles-ci ont été étudiées, à savoir, leur fluorescence (pour les 6) et leur capacité de photomarquage (pour les 3 premières) dans les conditions expérimentales choisies.

1.1. Etude de la fluorescence

Tout d'abord, les propriétés spectrales des sondes lipidiques ont été vérifiées par spectroscopie de fluorescence. Des spectres d'excitation et d'émission des sondes lipidiques insérées dans des liposomes ont été mesurés à deux pH différents et à plusieurs temps d'irradiation. Les deux pH choisis (pH = 7,4 et pH = 5,0) sont ceux optimaux pour induire le processus de fusion virale soit d'un virus pH-dépendant (induction de la fusion virale à pH acide), soit d'un virus pH-indépendant (induction de la fusion virale à pH neutre chap. I.1.). Les temps d'irradiation (0 s, 20 s, 45 s et 90 s) ont été choisis pour trouver un compromis entre une irradiation efficace et une irradiation destructrice pour le matériel biologique testé par la suite : on veut le meilleur rendement de photomarquage possible pour une dégradation minimale du matériel biologique utilisé.

Les maxima des spectres d'excitation et d'émission des sondes lipidiques testées sont 560 ± 2 nm et 585 ± 2 nm respectivement aux deux pH (fig. III.1 **A** et **B**) et aux différents temps d'irradiation testés (fig. III.1 **C** et **D**). Ces maxima sont typiques des dérivés de la rhodamine. La tête rhodamine fluorescente des sondes lipidiques n'est donc pas affectée dans les différentes conditions expérimentales. L'intensité de la fluorescence des sondes lipidiques diminue faiblement en fonction du temps croissant d'irradiation, une faible perte de la fluorescence est observée mais aucune destruction totale n'est à déplorer. La

partie rhodamine des molécules étudiées est donc stable vis-à-vis de l'irradiation UV à 365 nm correspondant à la photoactivation des sondes lipidiques et aux deux pH testés. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature concernant la stabilité des dérivés du rhodol vis-à-vis des variations de pH⁸⁸. Au final, ces deux paramètres expérimentaux n'ont qu'une faible influence sur les caractéristiques de fluorescence des 6 sondes lipidiques synthétisées. Pour vérifier que la stabilité de la tête rhodamine des sondes lipidiques ne soit pas spécifique de la structure de ceux-ci, nous avons reproduit ces expériences sur des liposomes PC/chol 60/35 (mole/mole) contenant 5% (mole/mole) d'une molécule fluorescente : le chlorure d'octadécyl Rhodamine B (R₁₈) commercial. Les propriétés spectrales de fluorescence de ce lipide sont bien connues notamment lors de son utilisation pour des tests de fusion virale⁸⁹. La fluorescence des liposomes contenant R₁₈ varie de la même manière par rapport aux conditions expérimentales, pH et irradiation, que celle des sondes lipidiques étudiées (fig. III.1 E et F). On peut en conclure que la stabilité de la fluorescence de la rhodamine observée dans nos conditions expérimentales est une propriété intrinsèque de la rhodamine et est indépendante du squelette qui lui est attaché.

⁸⁸ J.E. Whitaker, R.P. Haugland, D. Ryan, P. C. Hewitt, F. G. Prendergast (1992). Fluorescent rhodol derivatives: versatile, photostable labels and tracers. *Anal. Biochem.* 207, 267-279.

⁸⁹ D. Hoekstra, T. de Boer, K. Klappe, J. Wilschut (1984). Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes. *Biochemistry* 23, 5675-5681.

III. Caractérisation, développement et optimisation

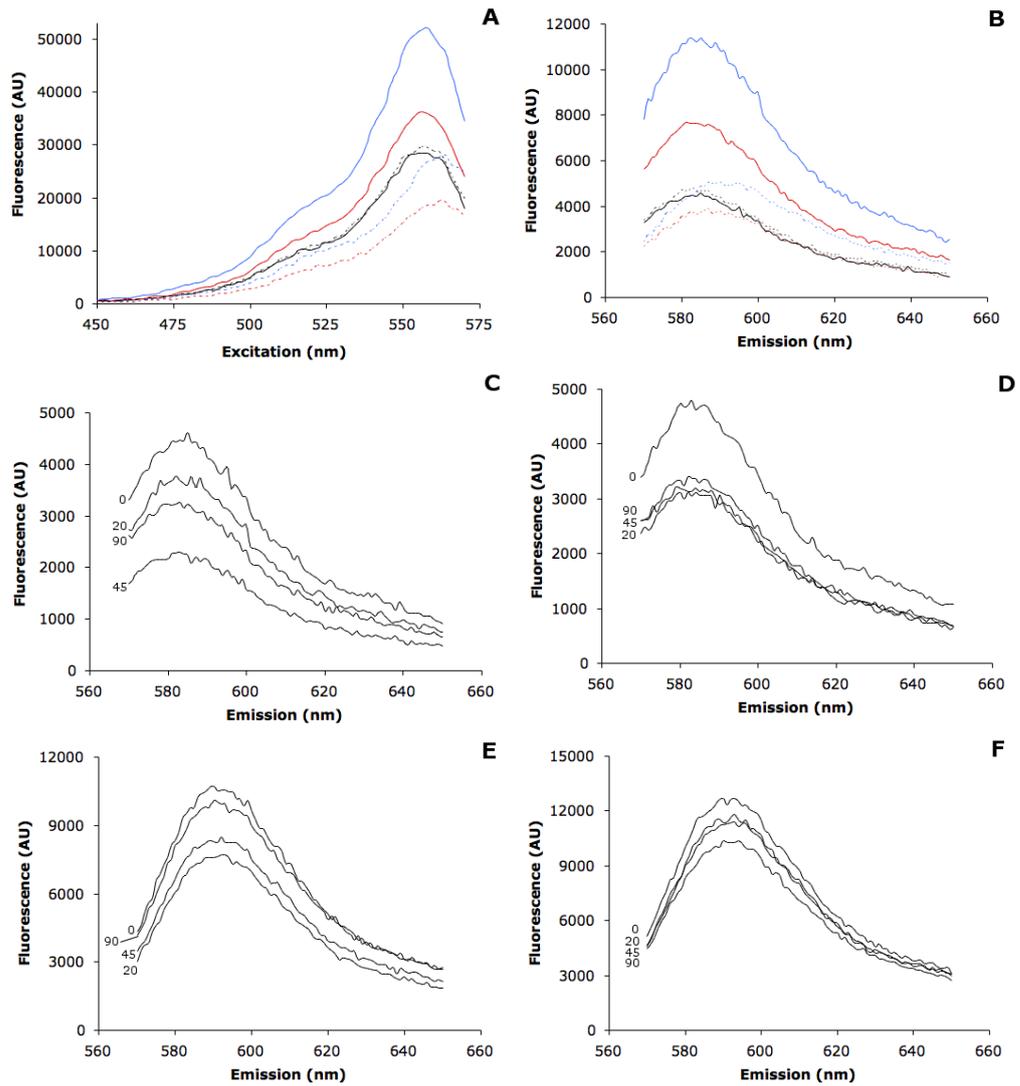


Figure III.1 : Caractéristiques fluorescentes des sondes lipidiques : médiane (en noir), distale (en rouge) et proximale (en bleu) **A**, spectre d'excitation à pH = 7,4 (lignes pleines) ou à pH = 5,0 (lignes en pointillé). **B**, spectre d'émission. **C** et **D** spectre d'émission de la sonde lipidique (medium) de référence à pH = 7,4 (**C**) et pH = 5,0 (**D**), après 0, 20, 45, 90 s d'irradiation. **E** et **F** spectre d'émission de R₁₈ à pH = 7,4 (**E**) et pH = 5,0 (**F**), après 0, 20, 45, 90 s d'irradiation.

1.2. Capacité de photomarquage des sondes lipidiques

Dans un premier temps, la capacité de photomarquage a été étudiée puis le protocole de photomarquage des sondes lipidiques a été optimisé avec la sonde lipidique de référence (SLR) médiane **5** (chap. II.2). Dans un second temps le protocole de photomarquage optimisé est appliqué avec les sondes lipidiques fluorescentes proximale **18.4** et distale **9.4** (chap. II.3.2.) sur différentes protéines membranaires.

1.2.1) Conditions d'irradiation

Le photomarquage par les sondes lipidiques est réalisé en irradiant en continu le complexe protéine ou hexane/sonde lipidique à 365 nm avec une lampe au mercure de 400 W (Source « Flood » Dymax, Equipements Scientifiques SA) à une distance de 10 cm environ sans système de refroidissement dans une enceinte fermée. Le temps d'irradiation est précisé pour chaque expérience.

1.2.2) Etude du photomarquage de la sonde lipidique de référence

a/ en solution organique

Dans un premier temps, pour tester la capacité de réaction du groupement benzophénone des sondes lipidiques sur une liaison C-H dans un système hydrophobe (chap. I.5.4.), la SLR est solubilisée dans un mélange de $\text{CHCl}_3/n\text{-hexane}$ 1/2 v/v et est irradiée pendant 45 s. L'hexane est en très large excès par rapport à la SLR. Le ratio molaire hexane/sonde lipidique est largement plus élevé >500/1 par rapport au ratio protéine/sonde lipidique testé par la suite du fait que le système hexane/sonde lipidique en solution organique est moins organisé qu'un système en micelles de détergent ou en liposome utilisé par la suite.

III. Caractérisation, développement et optimisation

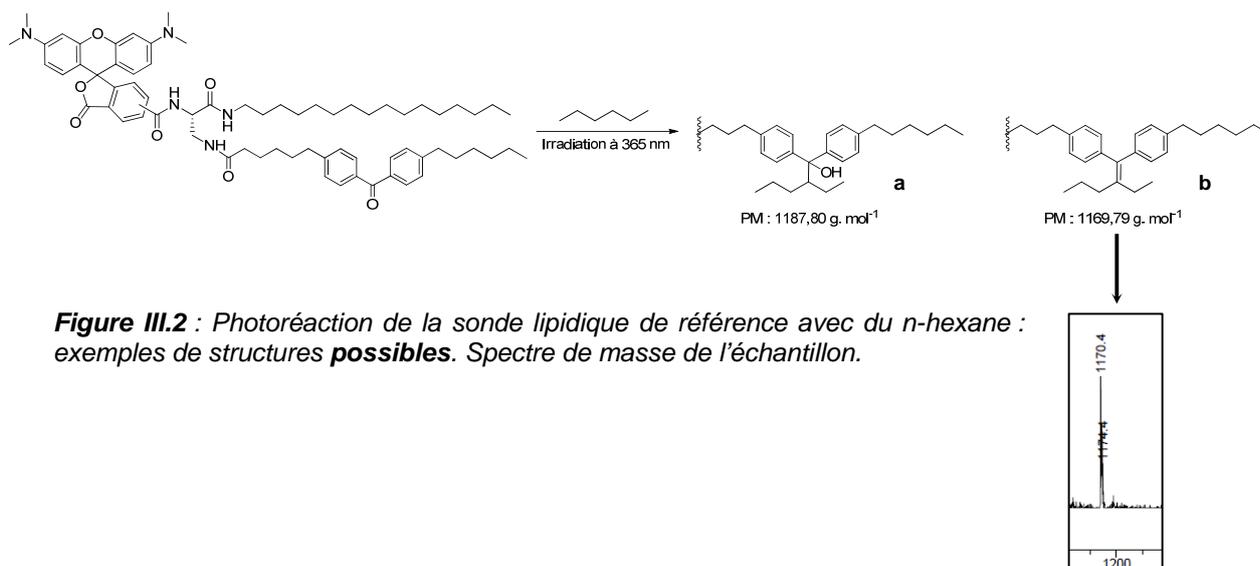


Figure III.2 : Photoréaction de la sonde lipidique de référence avec du *n*-hexane : exemples de structures **possibles**. Spectre de masse de l'échantillon.

Après irradiation puis analyse de l'échantillon en spectrométrie de masse, un adduit à $m/z = 1170,4$ $[M+H^+]$ est observé (fig. III.2). Celui-ci correspond à l'addition du *n*-hexane sur le groupement benzophénone de la sonde lipidique testée et à l'élimination d'une molécule d'eau (fig III.2 structure **b**). La structure **a** n'est pas observée en spectrométrie de masse (LC-ESI) du fait que l'analyse est effectuée en milieu acide. La sonde lipidique est donc capable de réagir de manière covalente en solution, avec un environnement hydrophobe, ici avec l'hexane dans le $CHCl_3$.

b/ sur les protéines membranaires

Dans un second temps, la capacité de photomarquage de la SLR est testée sur un système modèle de protéines membranaires en détergent. Deux protéines ont été testées : la BmrA et la bactériorhodopsine (bR) (chap. I.4). La BmrA est solubilisée avec 0,3 % de dodécylphosphocholine (FC 12) comme détergent dans un tampon Tris HCl à pH = 8,0 et la bR est solubilisée dans l'eau quand elle nous est fournie par Sigma-Aldrich. La BmrA en détergent et la bR sont donc mises en contact avec la SLR préalablement solubilisée en micelles de détergent (FC12) à pH = 8,0. Le ratio molaire protéine/sonde lipidique est de 1 pour 15. Cet excès permet d'éviter les problèmes d'accessibilité de la sonde

lipidique à la protéine, en effet il n'existe pas d'affinité particulière entre la sonde lipidique et les protéines testées qui aurait permis un rapprochement spécifique.

L'incubation se fait pendant une heure à 4 °C à l'obscurité suivie d'une irradiation de 45 secondes. L'échantillon est ensuite déposé sur un gel d'électrophorèse. Après migration, le résultat est analysé à l'aide d'un FluorImager Typhoon 8600 pour détecter la fluorescence de la rhodamine sur le gel, puis celui-ci est coloré au bleu de Coomassie pour détecter la protéine (fig. III.3).

Sonde lipidique en détergent

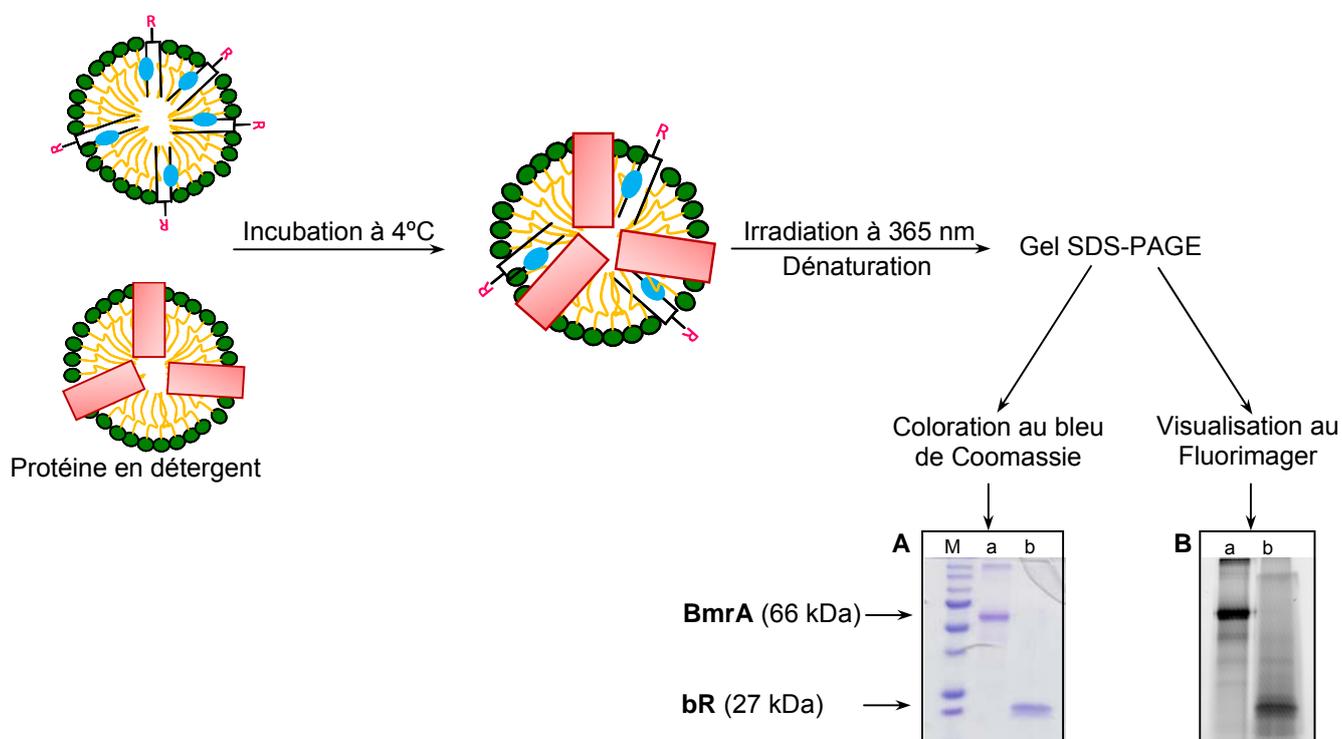


Figure III.3 : Protocole de photomarquage et photomarquage de BmrA et de bR avec la sonde lipidique de référence. **A**, coloration au bleu de Coomassie. **B**, analyse au fluorimager. M. marqueur, a. BmrA + SLR irradiée, b. bR + SLR irradiée.

L'analyse au FluorImager (fig. III.3 B) permet de révéler des bandes fluorescentes. Il n'y a pas de fluorescence sur le gel quand la solution micellaire protéine/sonde lipidique n'est pas irradiée et ni BmrA, ni bR ne donnent un signal

fluorescent sur le gel. Après coloration du gel au bleu de Coomassie (fig. III.3 **A**), les bandes fluorescentes sont corrélées avec les protéines BmrA et bR, suggérant que la sonde lipidique est bien capable de réagir avec son environnement et de se fixer de manière covalente à la protéine.

Les conditions opératoires c'est-à-dire le rapport protéine/sonde lipidique, les temps d'incubation et d'irradiation sont ensuite optimisées. Une étude sur l'influence du ratio, du temps d'incubation et du temps d'irradiation sur l'efficacité du photomarquage de la protéine par la SLR est ainsi effectuée avec BmrA (66 KDa).

1.3. Optimisation des conditions opératoires

Une évaluation semi-quantitative de photomarquage peut être effectuée en fonction de l'intensité de la bande sur le gel analysée au fluorimager (image de droite) : la dégradation de la protéine s'observe en fonction de l'intensité de la bande sur le gel coloré en bleu de Coomassie (image de gauche) sachant que la quantité de protéine déposée sur le gel est identique pour toutes les expériences et pour chaque puits (10 µg de protéine). Pour pouvoir visualiser correctement sur gel d'électrophorèse le marquage de la protéine par la sonde lipidique en fluorescence au fluorimager sans que le signal ne sature, l'excédant de sonde lipidique n'ayant pas réagi est découpé en bas de gel et éliminé avant d'effectuer l'analyse.

1.3.1) Influence du rapport protéine/sonde lipidique

La SLR est mise en contact avec la protéine à différents ratio protéine/sonde lipidique allant de 1/1 à 1/45 pendant une heure à 4°C puis irradiée pendant 45s. Les différents échantillons sont déposés sur gel d'électrophorèse.

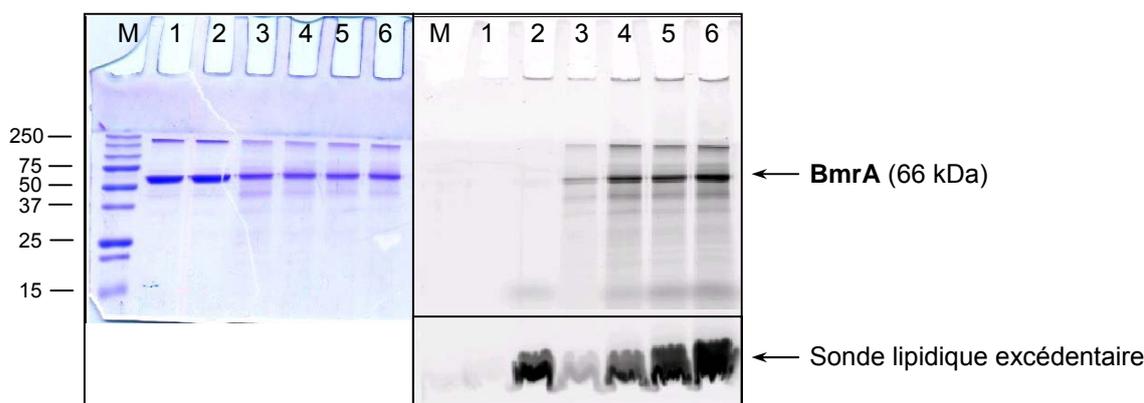


Figure III.4 : Photomarquage de *BmrA* avec la SLR à différents ratio *BmrA/SLR*, coloration au bleu de coomassie, analyse au fluorimager.

M	Marqueur standard all blue	5	<i>BmrA</i> + SLR, 1/15 45 s UV
1	<i>BmrA</i> sans irradiation	6	<i>BmrA</i> + SLR, 1/30 45 s UV
2	<i>BmrA</i> + SLR, 1/15 sans irradiation	7	<i>BmrA</i> + SLR, 1/45 45 s UV
3	<i>BmrA</i> + SLR, 1/1 45 s UV		

Si la solution micellaire *BmrA*/sonde lipidique n'est pas irradiée, il n'y a pas de marquage de la protéine par la sonde lipidique, celle-ci ne se fixe pas sur la protéine. Il n'y a pas de bande visible au fluorimager à 66 kD et la sonde lipidique se retrouve en totalité en bas de gel (fig. III.4, puits 2). Par contre, une fois la solution micellaire *BmrA*/sonde lipidique irradiée, le rendement de photomarquage augmente quand le ratio protéine/sonde lipidique augmente de 1/1 à 1/15 (fig. III.4, puits 3 et 4) puis celui-ci stagne (fig. III.4, puits 4 à 6) quand le ratio augmente de 1/15 à 1/45. La quantité de sonde lipidique en excès n'ayant pas réagi avec la protéine, visible en bas de gel, augmente quand le ratio protéine/sonde lipidique augmente tandis que le rendement de photomarquage n'augmente plus (fig. III.4, puits 4, 5, 6). Au vu de ces résultats, le ratio 1/15 protéine/sonde lipidique semble le plus adapté et sera utilisé dans la suite de l'optimisation du protocole.

Néanmoins, en prévision des expériences futures consommant une plus grande quantité de protéine et toujours dans un but d'optimiser ce protocole, un ratio protéine/sonde lipidique intermédiaire de 1/5 est testé. Ces conditions donnent les mêmes résultats qu'avec un ratio 1/15. C'est donc le ratio protéine/sonde lipidique 1/5 qui semble le plus efficace pour conduire au meilleur

rendement de photomarquage en consommant le minimum de sonde lipidique. Ce ratio sera donc appliqué pour la suite des manipulations hors optimisation.

1.3.2) Influence du temps d'incubation entre la BmrA et la sonde lipidique

Deux temps d'incubation entre la protéine et la sonde lipidique ont été testés à savoir 1 heure et 1 nuit à deux temps d'irradiation différents (45 s et 1 min).

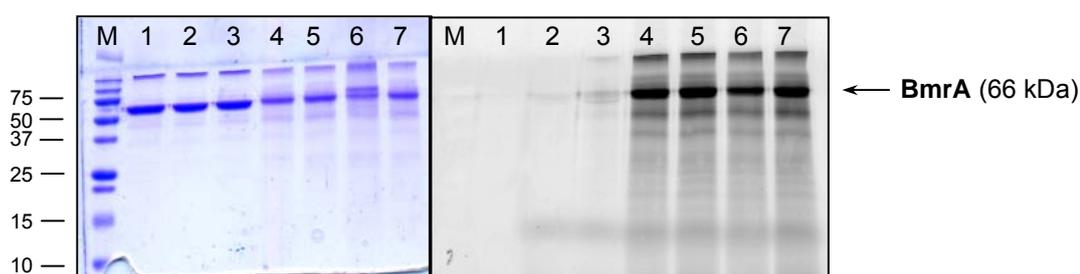


Figure III.5 : Photomarquage de BmrA avec la SLR à deux temps d'incubation différents, coloration au bleu de coomassie, analyse au fluorimager.

M marqueur standard all blue

1 BmrA sans irradiation

2 BmrA + SLR (1/15) sans irrad (1 nuit)

3 BmrA + SLR (1/15) sans irrad (1 h)

4 BmrA + SLR (1/15) 45 s UV (1 nuit)

5 BmrA + SLR (1/15) 45 s UV (1 h)

6 BmrA + SLR (1/15) 1 min UV (1 nuit)

7 BmrA + SLR (1/15) 1 min UV (1 h)

Le temps d'incubation entre 1h ou une nuit, n'a pas d'influence sur le rendement de photomarquage de la protéine comme on l'observe sur la figure III.5 (puits 4 et 5), l'intensité de fluorescence visualisée au fluorimager est identique pour les deux temps d'incubation testés. On remarque aussi qu'il n'y a pas de marquage de la protéine s'il n'y a pas d'irradiation (fig. III.5 puits 2 et 3) même avec un temps d'incubation d'une nuit. Il n'y a donc pas d'interaction non spécifique entre la sonde lipidique et la protéine. Au vu de ces résultats, la quantité de protéine photomarkuée n'est pas influencée par le temps d'incubation. Le temps d'incubation de 1 h est largement suffisant et efficace pour avoir un rendement de photomarquage optimum et sera donc appliqué par la suite.

1.3.3) Influence du temps d'irradiation entre la BmrA et la sonde lipidique

Après incubation, la solution micellaire protéine/sonde lipidique est soumise à des temps d'irradiation allant de 30 secondes à 2 minutes selon les conditions exposées en 1.3.1). Les différents échantillons sont déposés sur gel d'électrophorèse.

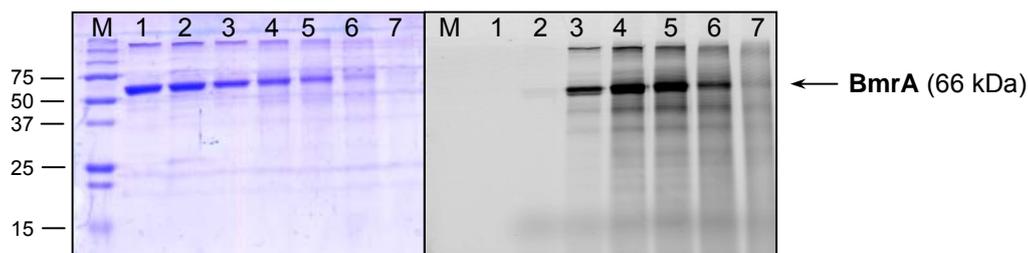


Figure III.6 : Photomarkage de BmrA avec la SLR à des temps d'irradiation différents, coloration au bleu de coomassie, analyse au fluorimager.

M marqueur standard all blue	4 BmrA + SLR (1/15) 45 s UV
1 BmrA seule sans irradiation	5 BmrA + SLR (1/15) 1 min UV
2 BmrA + SLR (1/15) sans irrad	6 BmrA + SLR (1/15) 1 min 30 s UV
3 BmrA + SLR (1/15) 30 s UV	7 BmrA + SLR (1/15) 2 min UV

Plus le temps d'irradiation de la solution micellaire protéine/sonde lipidique augmente, plus l'intensité de la bande de gel colorée en bleu de Coomassie correspondant à la BmrA diminue. L'irradiation provoque une dégradation de la protéine du fait de la chaleur que dégage la lampe mais aussi du fait des autres longueurs d'ondes inférieures à 300 nm émises par cette même lampe (fig. III.7).

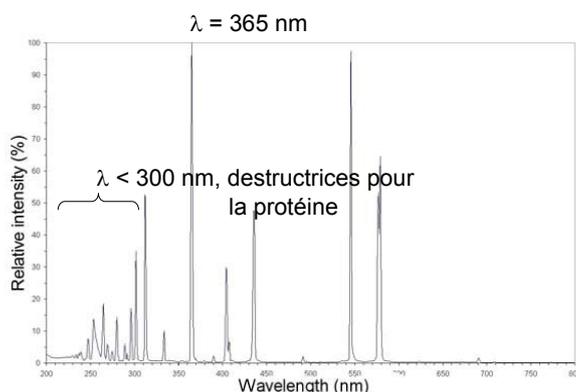


Figure III.7 : Spectre d'émission du mercure

La dégradation de la protéine est limitée jusqu'à un temps d'irradiation continu de 45 s (fig. III.6 puits 3 et 4) par rapport à la protéine non irradiée (fig. III.6 puits 1 et 2). A partir d'une minute d'irradiation la protéine se dégrade plus fortement (fig. III.6 puits 5, 6 et 7) jusqu'à être totalement détruite à 2 min d'irradiation (fig. III.6 puits 7 : la bande de gel colorée en bleu de Coomassie est quasi inexistante au niveau de la masse correspondant à la BmrA).

L'intensité de fluorescence de la bande de gel correspondant à la BmrA marquée par la sonde lipidique visualisée au fluorimager augmente entre 30 s et 1 min d'irradiation (fig. III.6 puits 3, 4 et 5) puis diminue entre 1 min 30 s et 2 min d'irradiation (fig. III.6 puits 6 et 7). La quantité de protéine marquée augmente donc entre 30 s et 1 min d'irradiation.

Si on fait la corrélation entre le rendement de photomarquage visualisé au fluorimager et la dégradation de la protéine visualisé en bleu de Coomassie, le temps d'irradiation de la solution micellaire protéine/sonde lipidique optimal est de 45 s pour la BmrA (fig. III.6 puits 4). C'est le meilleur compromis entre un rendement de photomarquage maximal et une dégradation minimale de la protéine.

En conclusion les conditions optimales de photomarquage des protéines par la SLR qui seront transposées aux autres sondes lipidiques sont une incubation de la protéine en présence de la sonde lipidique pendant une heure à 4 °C, un ratio protéine/sonde lipidique de 1/5 et une irradiation de 45 s avec cette lampe.

1.4. Etude du photomarquage des sondes lipidiques fluorescentes sur différentes protéines

La capacité de photomarquage des trois sondes lipidiques (SL) fluorescentes (médiane, distale et proximale) est testée sur les trois protéines membranaires modèles : BmrA, bR et NS2 (chap. I.4). La solution micellaire protéine/sonde lipidique 1/5 est irradiée 45 s puis l'échantillon est déposé sur gel

d'électrophorèse puis celui-ci est d'abord visualisé en fluorescence avec le FluorImager (image de droite) pour identifier le marquage et ensuite coloré au bleu de Coomassie (image de gauche) pour identifier la protéine. La protéine seule non irradiée est aussi déposée sur le gel comme contrôle sauf pour BmrA (contrôle effectué ci-dessus). La même quantité de protéines (15 µg) est déposée dans chaque puits sauf indication contraire.

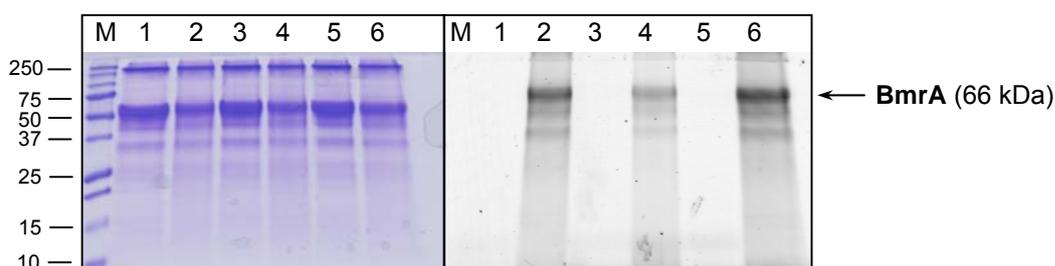


Figure III.8 : Photomarquage de BmrA avec les sondes lipidiques (SL) fluorescente, coloration au bleu de coomassie, analyse au fluorimager.

M marqueur standard all blue	4 BmrA + SL distale irradiée
1 BmrA + SL médiane non irradiée	5 BmrA + SL proximale non irradiée
2 BmrA + SL médiane irradiée	6 BmrA + SL proximale irradiée
3 BmrA + SL distale non irradiée	

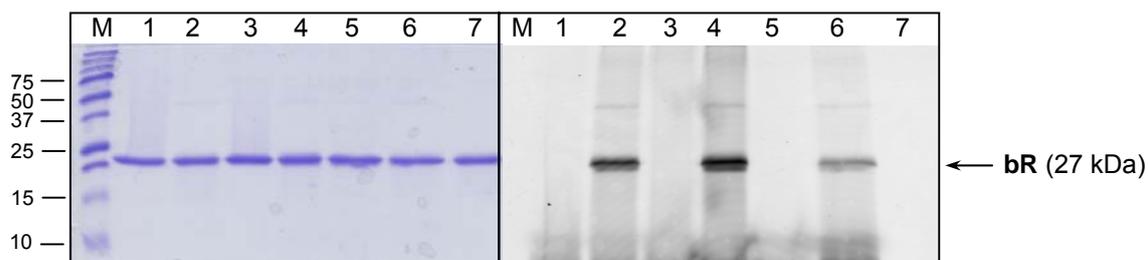


Figure III.9 : Photomarquage de bR avec les sondes lipidiques (SL) fluorescente, coloration au bleu de coomassie, analyse au fluorimager.

M marqueur standard all blue	4 bR + SL distale irradiée
1 bR + SL médiane non irradiée	5 bR + SL proximale non irradiée
2 bR + SL médiane irradiée	6 bR + SL proximale irradiée
3 bR + SL distale non irradiée	7 bR seule non irradiée

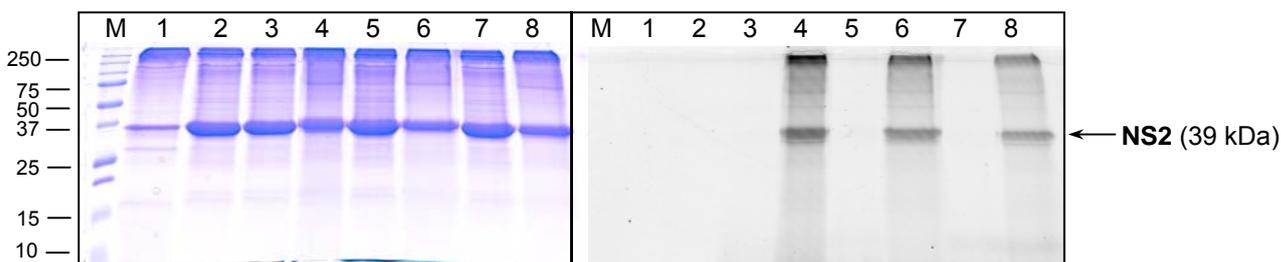


Figure III.10 : Photomarquage de NS2 avec les sondes lipidiques (SL) fluorescente, coloration au bleu de coomassie, analyse au fluorimager.

M marqueur standard all blue	4 NS2 + SL médiane irradiée
1 NS2 seule non irradiée 10 μ g	5 NS2 + SL distale non irradiée
2 NS2 seule non irradiée 20 μ g	6 NS2 + SL distale irradiée
3 NS2 + SL médiane non irradiée	7 NS2 + SL proximale non irradiée
	8 NS2 + SL proximale irradiée

Une fois les gels colorés en bleu de Coomassie, chaque série de bandes visibles est corrélée avec la protéine analysée : BmrA à 66 kDa, bR à 27 kDa et NS2 à 39 kDa. Aucune des trois protéines seules non irradiées ne génère un signal fluorescent (figs. III.6 puits 1, III.9 puits 7 et fig. III.10 puits 1 ou 2). La solution micellaire protéine/sonde lipidique ne génère pas non plus de fluorescence si elle n'est pas irradiée (cf. les puits impairs sur les trois figures). Seules les solutions micellaires protéine/sonde lipidique irradiées génèrent de la fluorescence visible au fluorimager quelle que soit la protéine étudiée (cf. les puits pairs sur les trois figures). Toutes les solutions micellaires protéine/sonde lipidique irradiées sont fluorescentes : les trois sondes lipidiques fluorescentes synthétisées (médiane, distale et proximale) ont donc une capacité à photomarquer ces trois protéines membranaires. Aucune interaction non spécifique protéine/sonde lipidique influençant la réaction photochimique n'est observable. Ces trois sondes ont donc la capacité de se lier de manière covalente aux protéines membranaires hydrophobes.

En fonction de la position de la benzophénone sur la chaîne grasse de la sonde lipidique et de la protéine utilisée, une variation de la quantité de protéine photomarkée est observée (figs. III.8, 9, 10). L'efficacité du marquage est donc

influencée par la profondeur du groupement benzophénone sur les sondes lipidiques et dépend de chaque protéine.

Ainsi une nouvelle génération de sondes lipidiques permettant de réaliser du photomarquage d'affinité de matériels biologiques hydrophobes a été synthétisée. Elle est basée sur l'utilisation de molécules lipidiques contenant un groupement photoréactif et un groupement fluorescent pour la détection des adduits formés lors de la réaction de photomarquage.

Cette nouvelle génération de sondes lipidiques offre plusieurs avantages : sa synthèse est relativement simple, les sondes lipidiques sont stables dans une membrane du fait de leur deux chaînes grasses, la photoactivation est réalisée à une longueur d'onde non destructrice pour le matériel biologique. Après photoactivation, le groupement benzophénone réagit de façon covalente avec son environnement immédiat dans la membrane : soit un lipide, soit une région hydrophobe de protéine membranaire. La tête rhodamine permet la détection et le suivi du produit de la réaction de photomarquage.

Ces sondes lipidiques sont un nouvel outil robuste et efficace pour l'étude et l'identification de zones hydrophobes de protéines. Cette partie du travail fait actuellement l'objet d'un brevet CNRS⁹⁰ et d'une publication⁹¹.

⁹⁰ L. Bourel-Bonnet, B. Hilbold, E. I. Pécheur (25/03/2011). Composés à groupements chromophore et photoréactif. Brevet n° 11/52498

⁹¹ B. Hilbold, M. Perrault, C. Ehret, S. L. Nui, E. I. Pécheur, L. Bourel-Bonnet. Benzophenone-containing Fatty Acids and their related Photosensitive Fluorescent New Probes: Design, physico-chemical properties and Preliminary Functional Investigation. *Bioorg. Med. Chem.*, publication soumise BMC-D-11-01103

2. Développement d'une méthode d'étude et d'identification de protéines

2.1. Introduction

Le développement des techniques et des appareils en spectrométrie de masse a révolutionné la biologie et plus particulièrement celui de la protéomique. L'utilisation de la spectrométrie de masse pour l'étude de la structure et du rôle des protéines a conduit à un grand nombre de découvertes durant ces vingt dernières années allant de l'identification de protéines⁹² à l'analyse des voies de transduction du signal⁹³ en passant par l'identification de biomarqueurs⁹⁴. Trois stratégies ont été développées pour préparer et analyser des échantillons biologiques par spectrométrie de masse : l'approche "bottom-up" **(1)**, l'approche "middle-down" **(2)** et l'approche "top-down" **(3)** (fig. III.11).

⁹² D. S. Chu, H. Liu, P. Nix, T. F. Wu, E. J. Ralston, J. R. Yates, B. J. Meyer (2006). Sperm Chromatin Proteomics Identifies Evolutionarily Conserved Fertility Factors. *Nature*, 443, 101-105.

⁹³ J. M. Koomen, E. B. Haura, G. Bepler, R. Sutphen, E. R. Remily-Wood, K. Benson, M. Hussein, L. A. Hazlehurst, T. J. Yeatman, L. T. Hildreth, T. A. Sellers, P. B. Jacobsen, D. A. Fenstermacher, W. S. Dalton (2008). Proteomic Contributions to Personalized Cancer Care. *Mol. Cell. Proteom.*, 7, 1780-1794.

⁹⁴ L.M. de Godoy, J. V. Olsen, J. Cox, M. L. Nielsen, N. C. Hubner, F. Frohlich, T. C. Walther, M. Mann (2008). Comprehensive Mass-Spectrometry-Based Proteome Quantification of Haploid Versus Diploid Yeast. *Nature*, 455, 1251-1254.

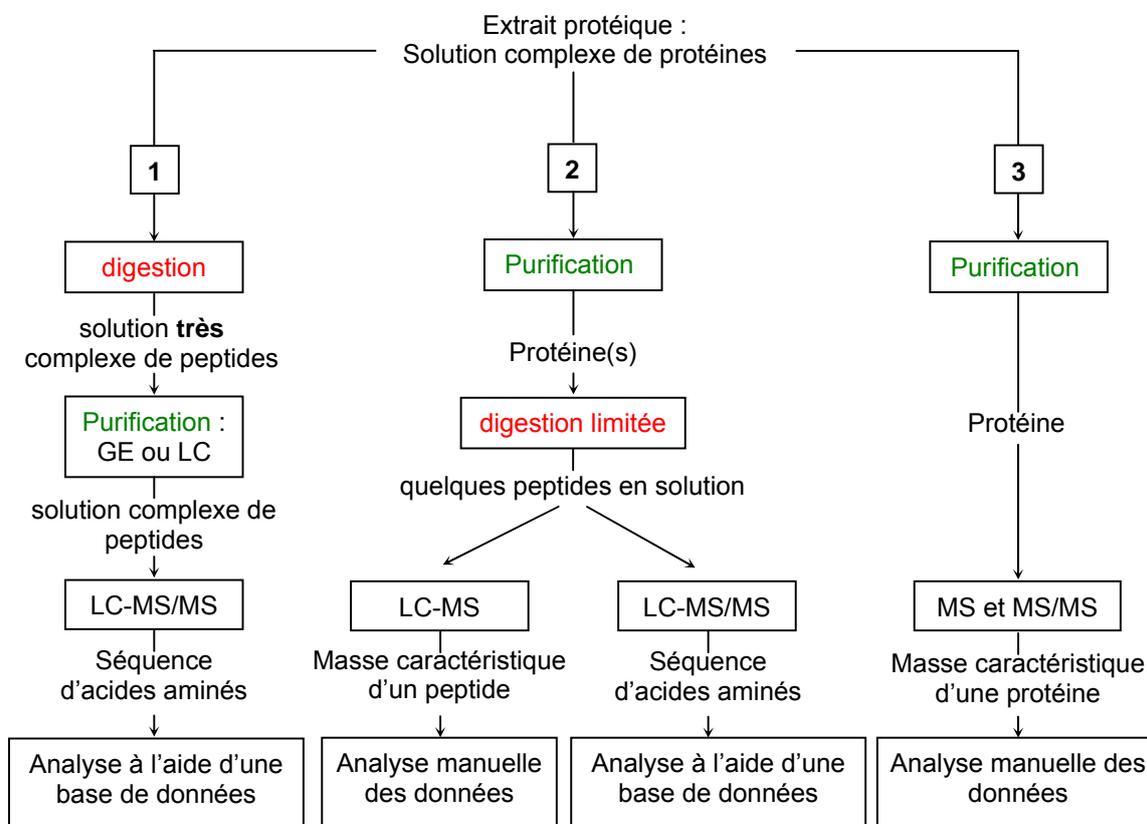


Figure III.11 : schéma des différentes approches d'analyse par spectroscopie de masse pour la protéomique : 1 approche bottom-up, 2 approche middle-down, 3 approche top-down

1 L'approche "bottom-up"

Cette stratégie mise en œuvre pour l'analyse d'un mélange plus ou moins complexe de protéines en solution est la stratégie classique et la plus répandue. Elle consiste à découper une ou un mélange de protéine(s) à analyser en petits peptides (< 3 kDa) par digestion enzymatique ou chimique. La digestion enzymatique s'effectue, dans la plupart des cas par la trypsine. Les fragments peptidiques obtenus doivent être suffisamment petits mais assez significatifs pour permettre l'identification d'une protéine.

Dans certains cas l'échantillon est purifié grossièrement pour diminuer sa complexité soit avant la digestion (sur gel d'électrophorèse ou par chromatographie), soit après digestion. Dans d'autres cas de figure, l'échantillon peut être directement purifié par LC-ESI-MS.

Cette technique permet d'identifier une protéine dont la séquence primaire est préalablement connue parmi un mélange de protéines, soit par une empreinte massique d'un peptide d'une protéine donnée, soit par fragmentation (tandem MS : MS/MS). Dans le premier cas, l'identification de la protéine s'effectue par comparaison de masse grâce à une base de données contenant un ensemble de masses chacune correspondant à un fragment peptidique unique caractéristique d'une protéine. Dans le second cas, l'identification de la protéine est basée sur les informations produites par la fragmentation d'un précurseur polypeptidique chargé de la protéine pour former des fragments peptidiques chargés. La séquence du précurseur polypeptidique chargé est déduite par la masse des fragments ioniques générés.

Généralement cette stratégie ne donne pas d'information complète sur la séquence entière de la protéine : il y a un risque de perte d'information. Elle ne permet pas non plus d'avoir des informations sur les éventuelles modifications de séquence obtenues lors de mutations ou sur la structure de la protéine car dans ce cas la séquence du peptide modifié ne sera pas répertoriée dans la base de données.

L'approche "bottom-up", avec le développement d'appareils performants (LC-ESI-MS/MS) et de solutions informatiques, est une technique largement utilisée pour l'analyse et l'identification automatisée à haut débit de protéines et d'échantillon complexe de mélanges protéiques.

2 L'approche "middle-down"

Cette stratégie consiste à analyser une protéine ou un mélange simple de protéines après une digestion limitée, soit enzymatique avec des protéases spécifiques choisies (comme par exemple l'endoprotéinase GluC ou AspN), soit

chimique avec le bromure de cyanogène (CNBr). Les peptides obtenus ont une masse plus élevée que ceux produits par l'approche "bottom up" (entre 3 et 20 kDa).

Cette technique combine les avantages des deux autres techniques : il est possible d'avoir accès à la séquence complète de la protéine, la caractérisation de modifications de la séquence peptidique est possible et enfin l'identification automatisée des peptides est envisageable grâce à une base de données.

3 L'approche "top-down"

Cette stratégie consiste à analyser directement la protéine intacte sans digestion protéolytique préalable. Cette approche est rendue possible grâce au haut pouvoir de résolution massique et à la précision des spectromètres de masse à transformée de Fourier développés ces dernières années⁹⁵. Cette approche a été mise au point récemment, avec le développement des techniques de spectrométrie de masse comme le MALDI-TOF et l'ESI. Elle convient pour l'analyse des protéines de bas poids moléculaire allant jusqu'à 60 kDa mais certaines équipes ont pu analyser des protéines allant jusqu'à 100 kDa⁹⁶.

Cette méthode a permis l'analyse d'interactions protéine/protéine non covalentes⁹⁷, de sonder la structure secondaire et même tertiaire de certaines protéines d'intérêt^{98,99}. L'analyse de protéines par cette approche commence par une étape de purification permettant de disposer de la protéine seule en solution,

⁹⁵ K. Breuker, M. Jin, X. Han, H. Jiang, F. W. McLafferty (2008). Top-Down Identification and Characterization of Biomolecules by Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, 19, 1045-1053.

⁹⁶ N. Siuti and N. L. Kelleher (2007). Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry. *Nat Methods*, 4, 817-821.

⁹⁷ N. L. Kelleher, S. V. Taylor, D. Grannis, C. Kinsmand, H. J. Chiu, T. P. Begley, F. W. McLafferty (1998). Efficient sequence analysis of the six gene products (7-74 kDa) from the *Escherichia coli* thiamin biosynthetic operon by tandem high-resolution mass spectrometry. *Protein Sci.*, 7, 1796-1801.

⁹⁸ J. A. Loo, C. G. Edmonds, R. D. Smith (1990). Primary Sequence Information from Intact Proteins by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Science*, 248, 201-204.

⁹⁹ A. Miranker, C. V. Robinson, S. E. Radford, R. T. Aplin, C. M. Dobson (1993). Detection of Transient Protein Folding Populations by Mass Spectrometry. *Science*, 262, 896-900.

ou au moins de réduire l'hétérogénéité de l'échantillon à analyser. Ensuite l'échantillon protéique est soit analysé directement par ESI soit purifié en direct par RP – HPLC puis analysé par ESI. Une analyse de masse à haute résolution est obtenue. Les avantages de cette méthode sont l'accès à la séquence complète de la protéine étudiée et sa capacité à localiser et caractériser des modifications survenues sur la protéine analysée.

Deux de ces trois approches, "middle-down" et "top-down", ont été utilisées en vue de l'identification et la caractérisation des zones photomarquées des trois protéines modèles (BmrA, bR et NS2) par la sonde lipidique de référence (SLR, fig. III.12).

Ainsi un gel d'électrophorèse de contrôle est réalisé à chaque étape des analyses développées ci-dessous. Celui-ci nous permet de vérifier l'état de la protéine étudiée par coloration du gel au bleu de Coomassie et la qualité de marquage de la protéine avec la sonde lipidique par fluorescence à l'aide du FluorImager.

Après photoactivation, la protéine peut potentiellement être plusieurs fois marquée par la sonde lipidique. L'adduit de photomarquage formé (protéine + sonde lipidique) a alors une masse de $m = M_p + (n \times 1102,5)$ en g.mol^{-1} où M_p est la masse de la protéine non marquée et n le nombre de sondes lipidiques ayant réagi avec la protéine (fig. III.12 A).

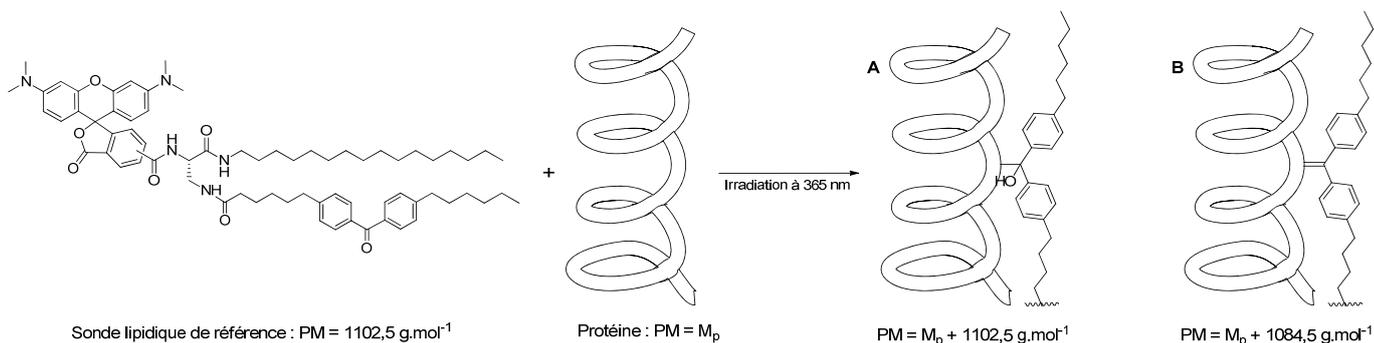


Figure III.12 : masses et structures possible des adduits de photomarquage formés entre une protéine et la sonde lipidique de référence

En milieu acide, l'adduit de photomarquage a tendance à se dégrader et à perdre une molécule d'eau (fig. III.12 **B**) : le produit de couplage a alors une masse $m = M_p + (n \times 1084,5)$.

2.2. Approche middle-down

Cette stratégie nous permet d'identifier, après digestion limitée d'une protéine, la séquence peptidique marquée par la sonde lipidique. A une bande de gel photomarkuée visualisée en fluorescence par le fluorimager (cf. ci-dessous : bandes encadrées en rouge) pourra être attribuée une séquence peptidique caractérisée en LC-MS/MS ou en MALDI-TOF après purification de l'échantillon. Cette attribution doit permettre d'identifier la région membranaire marquée de la protéine analysée.

2.2.1) Digestion enzymatique limitée des protéines

Les solutions de protéines ou de protéines marquées sont digérées par une enzyme spécifique pour limiter leur fragmentation. L'enzyme utilisée ici est la protéase Glu-C V8. Il s'agit d'une sérine endopeptidase nommée *Glutamyl endopeptidase* (EC 3.4.21.19). Cette enzyme a été choisie du fait de sa forte spécificité de coupure après un résidu glutamate ou aspartate en fonction du tampon (phosphate ou acétate) et du pH (7,8 ou 4,0) utilisés¹⁰⁰. Cette protéase est produite par la souche V8 de *Staphylococcus aureus*. L'enzyme nous est fournie sous forme lyophilisée.

Les solutions micellaires de protéines ou de protéines marquées à étudier ont été mises en contact avec l'enzyme à 37°C, dans un tampon spécifique et pendant une durée déterminée. Pour limiter le nombre de fragments produits par la digestion enzymatique, le temps de digestion a été optimisé en fonction de chaque protéine utilisée.

¹⁰⁰ J. Houmard and G. R. Drapeau (1972). Staphylococcal Protease: A Proteolytic Enzyme Specific for Glutamoyl Bonds. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3506-3509

a/ Cas n° 1 : la BmrA

Les premiers tests de digestion enzymatique avec la Glu-C V8 ont été effectués sur la BmrA. L'enzyme a été solubilisée dans l'eau. Le gel d'électrophorèse de la digestion de BmrA est présenté ci-dessous.

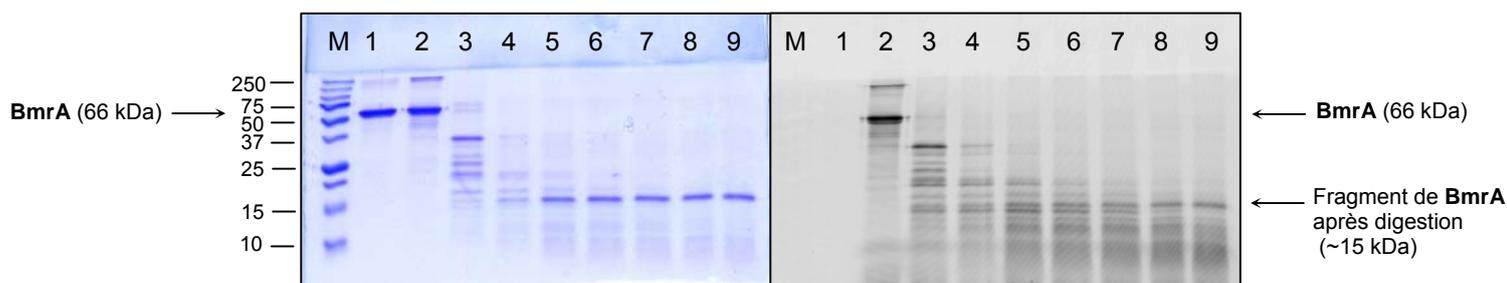


Figure III.13 : Photomarkage de BmrA avec la sonde lipidique de référence (SLR) à différents temps de digestion, coloration au bleu de Coomassie, analyse au fluorimager

M marqueur standard All blue

1 BmrA seule sans irradiation

2 BmrA + SLR, 45 s, pas de digestion

3 BmrA + SLR, 45 s UV, digestion 1 min

4 BmrA + SLR, 45 s UV, digestion 5 min

5 BmrA + SLR, 45 s UV, digestion 10 min

6 BmrA + SLR, 45 s UV, digestion 15 min

7 BmrA + SLR, 45 s UV, digestion 20 min

8 BmrA + SLR, 45 s UV, digestion 30 min

9 BmrA + SLR, 45 s UV, digestion 45 min

Différents temps de digestion ont été testés allant de 1 à 45 min (fig. III.13), le temps optimum de digestion de la BmrA est de 5 min à 37 °C dans un tampon tris HCl 20 mM à pH = 7,8 (puits 4). Un peptide majoritaire à ~15 kDa est obtenu. Il est à remarquer que ce peptide est marqué par la sonde lipidique : la bande fluorescente est visible au fluorimager.

b/ Cas n° 2 : la bactériorhodopsine (bR)

Un premier essai de digestion de cette protéine a été effectué dans un tampon tris HCl 20 mM à pH = 7,8 (condition identique au cas n° 1 avec l'enzyme solubilisée dans l'eau milliQ) à des temps de digestion allant de 5 min à 5h : aucune digestion n'a été observée.

Temps de digestion	Tampon d'incubation	Tampon de solubilisation de Glu-C V8	
< 5 h	Tris HCl 20mM pH = 7,8	H ₂ O	→ pas de digestion
< 5 h	AcNH ₄ 100 mM pH = 4,0	H ₂ O	→ pas de digestion
> 12 h	Tris HCl 20mM pH = 7,8	H ₂ O	→ pas de digestion
> 12 h	Tris HCl 20mM pH = 7,8	AcNH ₄ 100 mM pH = 4,0	→ digestion
> 12 h	AcNH ₄ 20 mM pH = 8,0	AcNH ₄ 100 mM pH = 4,0	→ digestion

Tableau III.1 : paramètres testés pour la digestion de la bactériorhodopsine.

Après ajustement des différents paramètres : condition de solubilisation de l'enzyme, tampon et durée de la digestion (tab. III.1), on obtient une digestion partielle de la bR par l'enzyme solubilisée dans un tampon acétate d'ammonium 100 mM à pH = 4,0 et dans un tampon acétate d'ammonium 20 mM à pH = 8,0 pendant 15 h à 37 °C (fig. III.14).

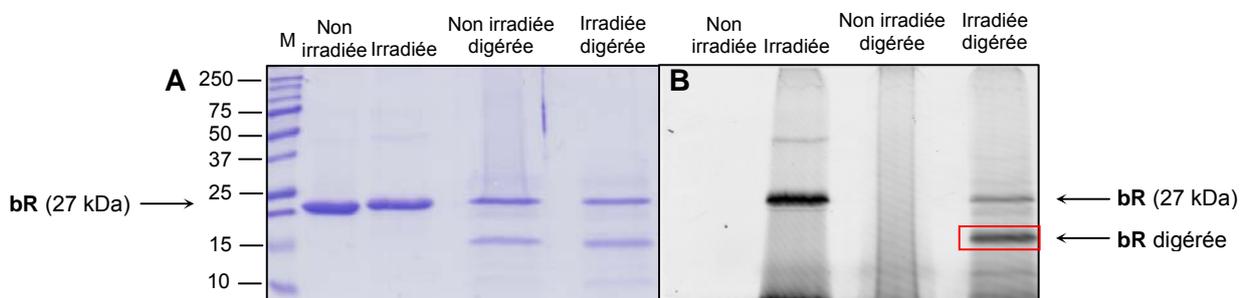


Figure III.14 : Photomarquage de bR avec la sonde lipidique de référence (SLR), digestion avec Glu-C V8, coloration au bleu de Coomassie, analyse au fluorimager. M, marqueur All Blue standard.

Un fragment peptidique majoritaire à ~15 kDa (encadré en rouge sur la fig. III.14) issu de la digestion de la bR est marqué par la sonde lipidique. D'autres fragments issus de la digestion sont visibles mais en quantité fortement minoritaire.

c/ Cas n° 3 : NS2, une protéine de VHC

La digestion de NS2 est effectuée avec les conditions expérimentales suivantes : l'enzyme est solubilisée dans un tampon acétate d'ammonium 100 mM à pH = 4,0 ; la mise en contact de la protéine et de l'enzyme puis la digestion se font dans un tampon Tris HCl 20 mM à pH = 8,0, le temps de digestion optimal est de 4 min.

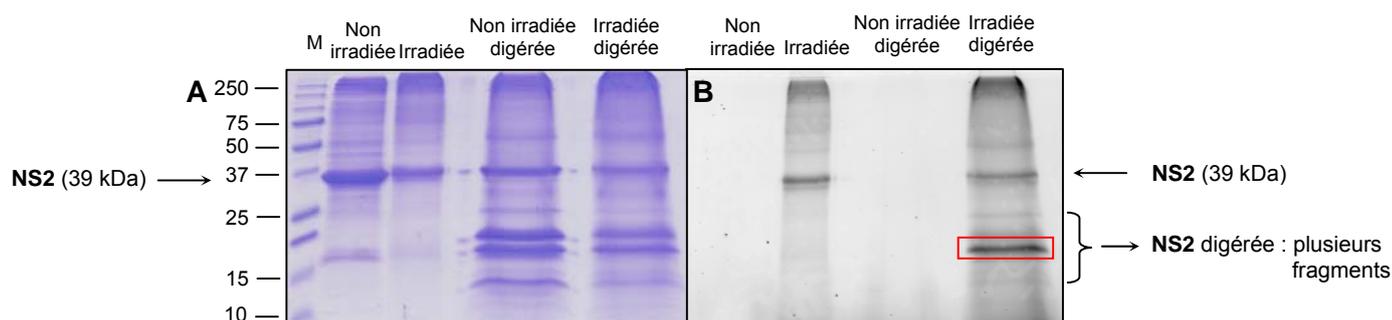


Figure III.15 : Photomarkage de NS2 avec la sonde lipidique de référence (SLR), digestion avec Glu-C V8, coloration au bleu de Coomassie, analyse au fluorimager. M, marqueur All Blue standard.

La digestion enzymatique de cette protéine produit deux fragments peptidiques majoritaires entre 15 et 20 kDa. Seul un de ces deux fragments est marqué par la sonde lipidique (encadré en rouge sur la figure III.15).

Pour les trois protéines étudiées le temps de digestion avec la protéase Glu-C V8 a été optimisé. Il varie de 4 min à plus de 12 heures en fonction de l'accessibilité des résidus acides glutamiques au sein de la protéine et de la compacité de celle-ci en micelles de détergent. Ces temps de digestion ne permettent pas une digestion totale de la protéine, malheureusement si la digestion est trop longue, un grand nombre de petits fragments est obtenu rendant impossible leur purification et, au final, leur identification en spectrométrie de masse. La digestion de chaque protéine produit au moins un fragment marqué par la sonde lipidique visible en fluorescence. C'est ce fragment que l'on va essayer d'identifier plus précisément grâce à diverses techniques.

2.2.2) Purification et identification

Avant de pouvoir effectuer une analyse par spectrométrie de masse, l'échantillon digéré est purifié afin de diminuer la complexité de la solution à analyser. Plusieurs techniques de purification ont été testées, soit sur gel d'électrophorèse soit en solution.

a/ Purification et identification par SDS-PAGE : digestion trypsique 'in-gel'

Les différents fragments peptidiques produits par la digestion sont séparés sur un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) en fonction de la taille apparente du fragment. La bande correspondant au fragment peptidique d'intérêt est découpée et est extraite du gel par une digestion à la trypsine (fig. III.16). Les avantages de cette technique sont l'utilisation de faible quantité de protéine (< 15 µg, néanmoins suffisante pour pouvoir visualiser la protéine en bleu de Coomassie sur le gel) et la robustesse de la méthode. C'est une technique optimisée et utilisée en routine pour l'identification de protéines, elle est facile à mettre en place et c'est l'une des méthodes les plus utilisées pour purifier des protéines.

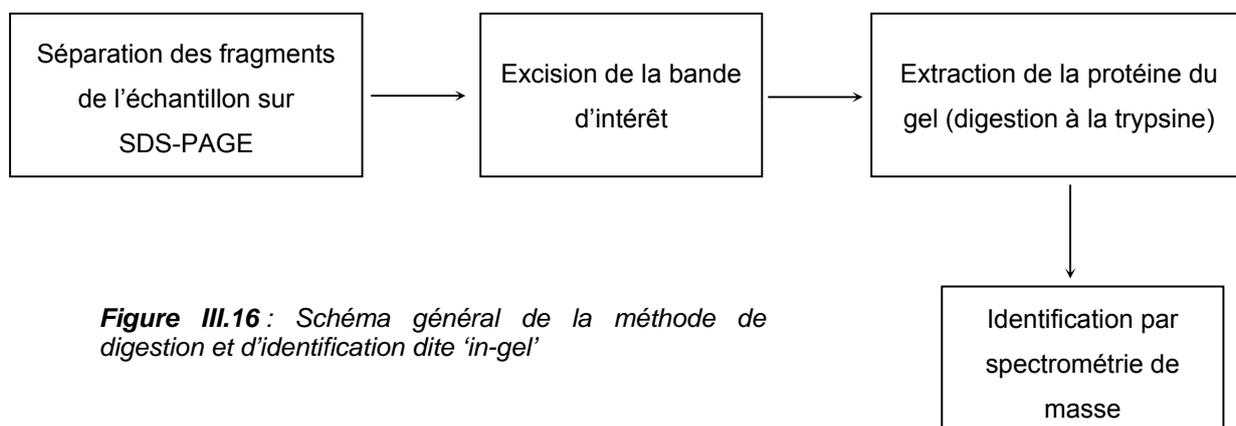


Figure III.16 : Schéma général de la méthode de digestion et d'identification dite 'in-gel'

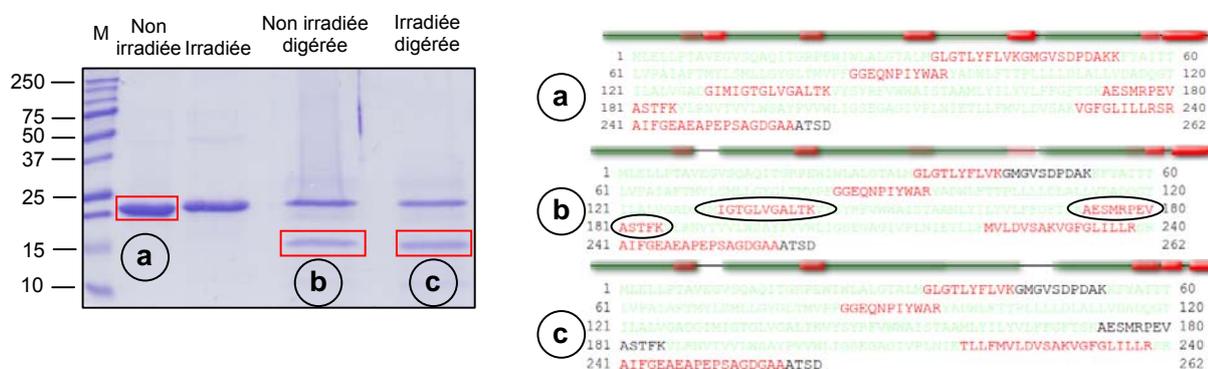
Malheureusement cette technique souffre de plusieurs désavantages. D'abord dans le cas qui nous intéresse, avec des protéines hydrophobes, un mauvais rendement d'extraction de la protéine du gel est à déplorer. Ensuite il est généralement difficile de réaliser ces différentes manipulations sans avoir de

contaminant qui vont biaiser les analyses. Enfin l'analyse par LC-MS/MS donne, en théorie, accès à la séquence du peptide à analyser, c'est une analyse qualitative et non quantitative : on ne peut pas savoir si le peptide identifié est majoritaire ou minoritaire dans le morceau de protéine purifié par SDS-PAGE.

Cette méthode a tout de même été appliquée à la bR et à NS2 avec des quantités de protéine de l'ordre de 30 µg pour pallier le faible rendement d'extraction de celles-ci hors du gel. Les bandes d'intérêts excisées du gel sont celles encadrées en rouge (cf. ci-dessous). Après extraction des fragments de protéines du gel par la trypsine, celles-ci ont été analysées par LC-MS/MS afin de déterminer la séquence de ces fragments protéiques.

- La bactériorhodopsine (bR)

Voici le résultat des analyses en LC-MS/MS de la bR **(a)**, de la bR digérée **(b)** et de la bR digérée et marquée avec la SLR **(c)** : les bandes encadrées en rouge sur le gel ont été analysées (fig. III.17). Toutes les bandes à analyser ont subi le même traitement (excision, digestion à la trypsine, analyse).



Fragments peptidiques correspondant aux bandes excisées du gel (encadrées en rouge), les peptides en rouge ont été caractérisés

Figure III.17 : Résultats des analyses de la bR en LC-MS/MS après digestion 'in gel', M : marqueur All Blue standard

Chaque séquence (à droite) correspond à sa bande de gel respective (à gauche) analysée en LC-MS/MS. Les fragments peptidiques caractérisés et

identifiés par LC-MS/MS via la base de données Uniprot KB 2010 sont en rouge sur la figure III.17 à droite.

Il n'y a pas de différences significatives entre les fragments peptidiques caractérisés pour la bR seule **(a)** et ceux caractérisés pour la bR digérée **(b)**. Les séquences des fragments peptidiques caractérisés en spectrométrie de masse sont dispersées sur toute la longueur de la séquence de la protéine. On a un recouvrement de 33 % de la séquence de la bR pour l'analyse de la bR non digérée **(a)** et de 30 % pour l'analyse du segment peptidique digéré **(b)**. On ne peut donc pas déterminer, avec précision, à quel(s) segment(s) transmembranaire(s) correspond le fragment digéré **(b)** de bR encadré en rouge sur le gel.

La seule différence expérimentale entre les fragments peptidiques **(b)** et **(c)** est l'irradiation de la protéine induisant le marquage de celle-ci. Cette modification est visible par fluorescence sur le fragment peptidique **(c)**, la bande de gel analysée est visible en fluorescence au fluorimager. Ces deux fragments peptidiques correspondent donc à un même fragment de la protéine l'un marqué **(c)** l'autre non **(b)**. Les peptides caractérisés en LC-MS/MS pour le fragment **(c)** sont aussi dispersés sur toute la séquence de la protéine. On ne peut donc pas localiser quel(s) segment(s) transmembranaire(s) sont marqués par la sonde lipidique en faisant la comparaison des fragments peptidiques caractérisés pour la protéine entière **(a)** et ceux de la protéine digérée et marquée **(c)**.

Une autre analyse de ces séquences peptidiques **(a)**, **(b)** ou **(c)** caractérisées en LC-MS/MS peut être menée. Le photomarquage de la protéine par la sonde lipidique induit une modification de la séquence de la protéine au niveau du marquage. Cette modification n'est ni visible ni identifiable par LC-MS/MS : le fragment peptidique marqué ne peut pas être caractérisé car il n'est plus reconnu par la base de données du fait de sa modification. Dans ce cas, les peptides entourés sur la figure III.17 **(b)** (à droite) ne sont plus reconnus lorsque la protéine est marquée **(c)**. Le recouvrement de la séquence primaire de la bR n'est alors plus que de 22 %. Ces fragments peptidiques sont des zones de la

bR potentiellement marquées par la sonde lipidique. Ils correspondent aux hélices transmembranaires 4 et 6 de la bactériorhodopsine.

La non caractérisation de ces peptides en LC-MS/MS peut aussi venir de la manière de préparer l'échantillon à analyser. Le rendement d'extraction (digestion à la trypsine non complète) de la protéine du gel peut être plus faible est donc certains peptides ne sont pas extraits de la bande de gel et donc ne sont pas présents dans la solution à analyser. Mais il est à remarquer que ces analyses ont été réalisées plusieurs fois par un même opérateur et donnent les mêmes résultats. C'est-à-dire qu'il y a un même recouvrement de séquence entre la protéine seule et la protéine digérée non marquée et un recouvrement plus faible entre la protéine marquée et digérée avec les mêmes fragments peptidiques non caractérisés. Cette deuxième hypothèse est donc peu probable quant à la non caractérisation des ces peptides.

- NS2

Voici le résultat des analyses en LC-MS/MS de NS2 (a) (fig. III.18), de NS2 digérée (b) et de NS2 digérée et marquée avec la SLR (c). Toutes les bandes à analyser ont subi le même traitement (excision, digestion à la trypsine, analyse).



Fragments peptidiques correspondant aux bandes excisées du gel (encadrées en rouge), les peptides en vert ont été caractérisés

Figure III.18 : Résultats des analyses de NS2 en LC-MS/MS après digestion "in gel", M : marqueur All Blue standard

La stratégie d'identification précédemment utilisée a été appliquée à une deuxième protéine, NS2. Les fragments peptidiques en vert ont été caractérisés (fig. III.18 à droite). Chaque séquence correspond à sa bande de gel respective analysée en LC-MS/MS. La bande du gel analysée est celle qui est visible en fluorescence au fluorimager (fig. III.18, bande encadrée en rouge).

Les conclusions de ces analyses pour caractériser le fragment peptidique marqué par la sonde lipidique sont sensiblement les mêmes qu'avec bR. Il n'y a pas de différence entre les fragments peptidiques identifiés en LC-MS/MS de la protéine seule **(a)** et de ceux de la protéine digérée **(b)**. On a un recouvrement de la séquence primaire de NS2 identique entre les séquences **(a)** et **(b)**. La seule différence, en jaune sur la figure III.18 (côté droit) peut être attribuée à un site probable de clivage de la protéase Glu-C V8 utilisée pour la digestion partielle de la protéine car ce site de clivage ne peut pas être attribué à la trypsine. Pour les mêmes raisons que pour la bR, le fragment peptidique entouré sur la séquence **(b)** (et qui n'est plus caractérisé en LC-MS/MS sur la séquence de NS2 digérée et marquée **(c)**) peut être une zone de NS2 marquée par la sonde lipidique. Cette zone correspond au 2^{ème} segment transmembranaire de la protéine.

L'utilisation de cette méthode nous permet d'émettre un faisceau d'hypothèses sur la localisation précise de zones marquées sur ces deux protéines. Pour lever toutes les ambiguïtés liées à cette méthode plusieurs autres solutions ont été mises en place.

b/ Purification et identification 'en solution'

Ces méthodes de purification et d'identification nécessitent une plus grande quantité de protéine, entre 150 et 200 µg du fait d'un nombre plus important d'étapes avant l'analyse. Garder les échantillons en solution nous permet d'effectuer une analyse directe de masse en MALDI-TOF et donc de disposer d'une information quantitative sur le rendement de photomarquage des protéines par la sonde lipidique.

- Purification par RP-HPLC

L'avantage de cette technique est que l'échantillon purifié est solubilisé dans un solvant organique : la phase mobile de la colonne de chromatographie, dans notre cas de l'acétonitrile en présence de 0,1 % de TFA (nos produits hydrophobes sont élués à 80% d'acétonitrile sur une colonne C₈). Les problèmes de détergents et de sels contenus dans le tampon sont donc résolus. L'analyse en spectrométrie de masse est alors effectuée dans de meilleures conditions. L'échantillon, en sortie de colonne est trop dilué pour une analyse directe en spectrométrie de masse : celui-ci est lyophilisé puis resolubilisé dans un minimum d'acétonitrile. L'absorbance à deux longueurs d'onde est enregistrée en sortie de colonne HPLC : 220 nm correspondant à la longueur d'onde d'absorption des liaisons peptidiques et 550 nm longueur d'onde d'absorption de la rhodamine. Les fragments de protéines marquées absorbent, en HPLC, aux deux longueurs d'onde choisies. Des résultats cohérents en spectrométrie de masse sont obtenus sur les échantillons contrôles. Après purification de la BmrA seule par HPLC, un spectre de masse des fractions HPLC correspondant à la protéine est obtenu avec une valeur de m/z caractéristique de celle-ci (fig. III.19 **A**).

Après digestion à la Glu-C V8 et purification de la BmrA, un spectre de masse des fractions HPLC majoritaires (fig. III.19 **B'** encadré en rouge) confirme que la digestion de la BmrA produit un fragment majoritaire à ~15 kDa (fig. III.19 **C**). Le spectre de masse de la BmrA mise en contact avec la sonde lipidique (sans irradiation) indique que la séparation HPLC de ces deux entités n'est pas efficace (fig. III.19 **C** et **C'**). Le fragment majoritaire produit par la digestion de la protéine ne peut pas être séparé de la sonde lipidique avec les gradients et la colonne utilisés en HPLC.

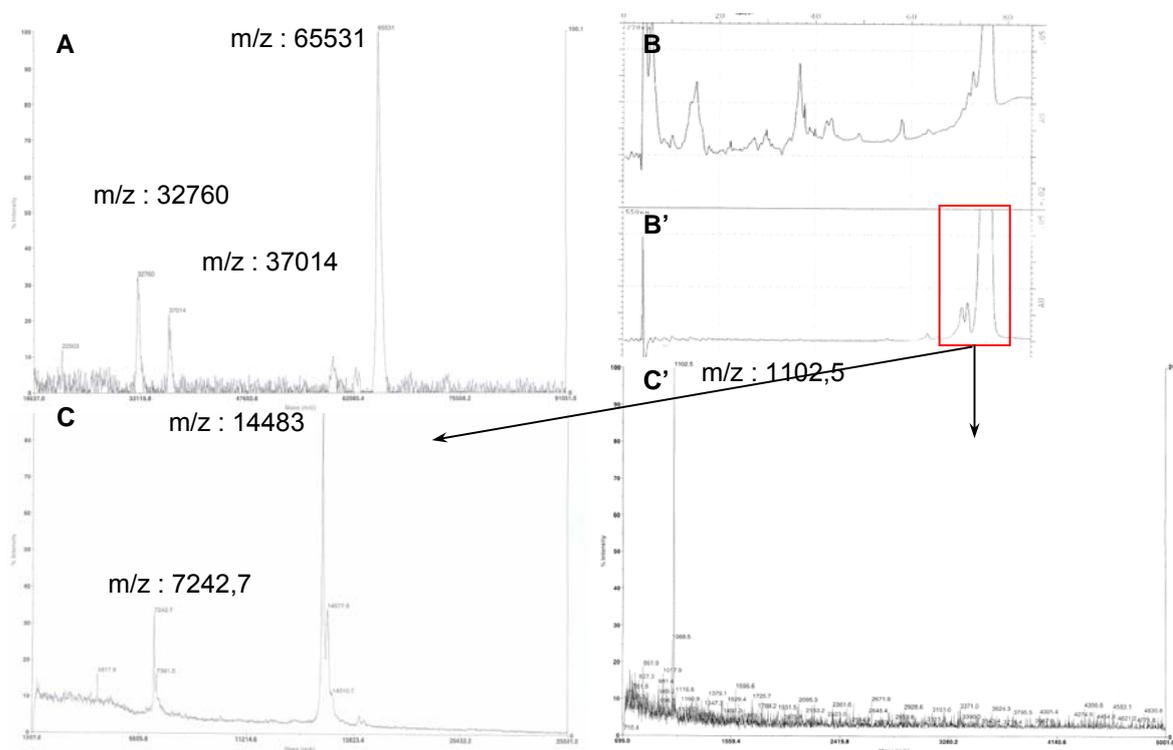


Figure III.19 : **A** spectre de masse de la BmrA en MALDI-TOF après purification par HPLC, **B** chromatogramme HPLC de la BmrA digérée à 220 nm, **B'** chromatogramme HPLC de la BmrA digérée à 550 nm, **C** spectre de masse de la BmrA en MALDI-TOF digérée après purification par HPLC (fraction encadrée en rouge), **C'** spectre de masse de la sonde lipidique présente dans l'échantillon (fraction encadrée en rouge).

La séparation des fragments non marqués des fragments marqués de l'échantillon semble être efficace par HPLC (fig. III.20 **A** et **A'**). Malheureusement le rendement de photomarquage et le rendement de purification (expérience complète comprenant la séparation, la concentration et le resolubilisation) avec des protéines hydrophobes telles que la BmrA, ne sont pas suffisants. Certains fragments marqués ne sont pas séparables des fragments non marqués du fait de la faible différence d'hydrophobicité entre ces deux entités. On a donc un mélange de fragments de protéine non marquée et de fragments de protéine marquée. En fait, seuls les petits fragments moins hydrophobes comme la queue cytosolique en position C-terminale de la BmrA sont séparés des autres fragments. Cette expérience ne produit pas assez de matériel marqué pour avoir des résultats exploitables en spectrométrie de masse malgré une quantité de

protéine importante au départ. Les spectres de masse obtenus (fig. III.20 **B** et **B'**) correspondant à la fraction majoritaire marquée en HPLC (fig. III.20 **A** et **A'** encadrée en rouge) sont similaires à ceux de la même expérience où la protéine est non marquée (ci-dessus). On retrouve un fragment de la BmrA digérée non marquée à ~15 kDa, d'autres pics non interprétables (fig. III.20 **B**) et la sonde lipidique en excès (fig. III.20 **B'**). La multiplication des étapes avec cette méthode de purification n'est pas favorable à un bon rendement : l'échantillon digéré peut former des agrégats non séparables lors de la séparation HPLC, les fragments de protéines hydrophobes traînent sur tout le gradient HPLC : la séparation n'est finalement pas si efficace et l'échantillon lyophilisé est difficilement resolubilisable (l'échantillon reste adsorbé aux parois du tube en plastique utilisé).

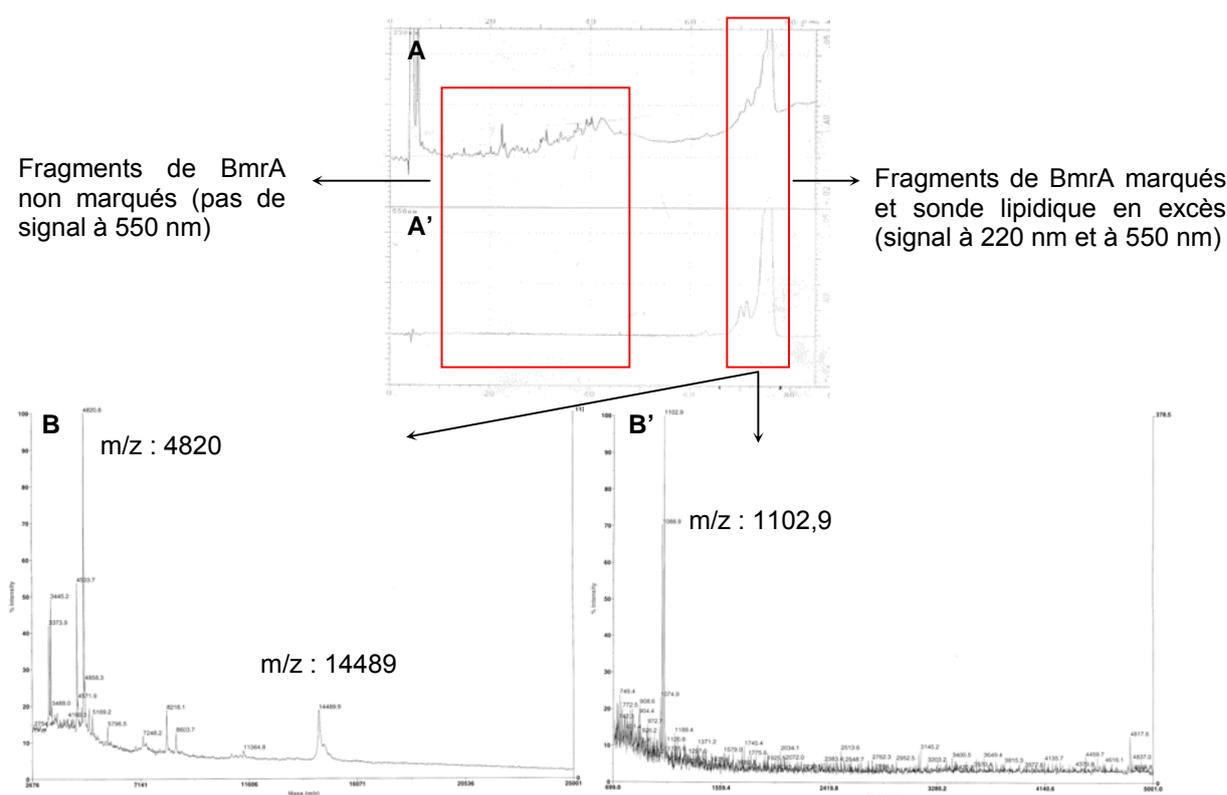


Figure III.20 : **A** chromatogramme HPLC de la BmrA digérée et marquée à 220 nm, **A'** spectre HPLC de la BmrA digérée et marquée à 550 nm, **B** spectre de masse de la BmrA en MALDI-TOF digérée et marquée après purification par HPLC, **B'** spectre de masse de la sonde lipidique présente dans l'échantillon.

Cette méthode a été testée sur la BmrA sans donner de résultats exploitables en spectrométrie de masse (MALDI-TOF) en comparant les spectres de masse de la protéine marquée (fig. III.20) de celle où elle n'est pas marquée (cf. fig. III.19). Malgré une étape de purification par HPLC, l'échantillon à analyser reste trop hétérogène pour déterminer avec précision les zones marquées de la protéine par la sonde lipidique.

- Purification par chromatographie d'exclusion stérique (CES) :
application à la BmrA

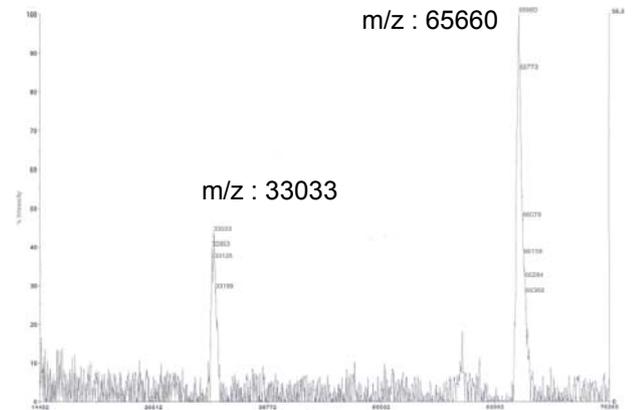
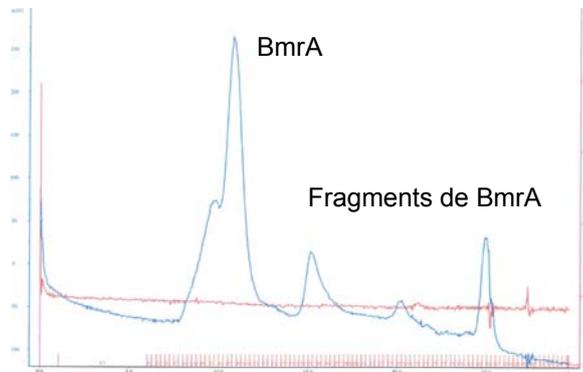
Cette technique permet de séparer chaque fragment protéique issu de la digestion en fonction de leur taille apparente. A la différence de la méthode dite 'in-gel' (vue précédemment) les fragments protéiques sont séparés en solution dans un tampon salin contenant un détergent. Ces conditions sont nécessaires pour solubiliser la protéine et de la sonde lipidique dans un milieu aqueux. Après digestion de la BmrA par le Glu-C V8 (cf. ci-dessus) un peptide majoritaire à ~15 kDa est obtenu. Cette solution est éluée sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique (CES) et après concentration et dessalage de l'échantillon celui-ci est analysé en spectrométrie de masse par MALDI-TOF. Trois analyses sont effectuées (fig. III.21) : la BmrA seul irradiée **(a)**, la BmrA digérée en présence de la sonde lipidique **(b)** et la BmrA en présence de la sonde lipidique ayant subi une irradiation puis digérée **(c)**.

III. Caractérisation, développement et optimisation

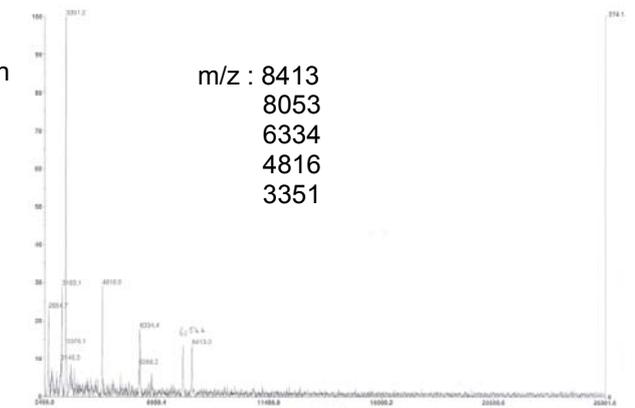
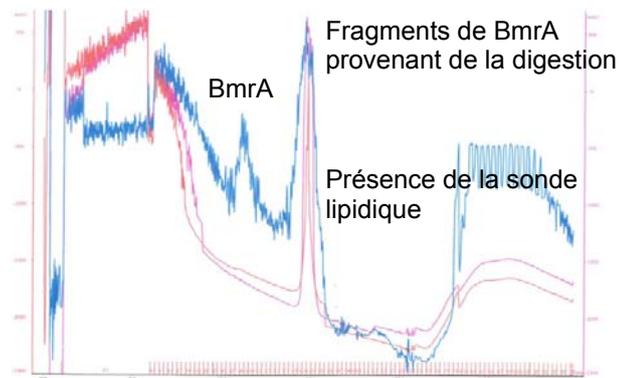
Profils chromatographiques

Spectres de masse MALDI

BmrA
Irradiée
(a)



BmrA digérée en
présence de la
sonde lipidique
(b)



BmrA irradiée en
présence de la
sonde lipidique
et digérée
(c)

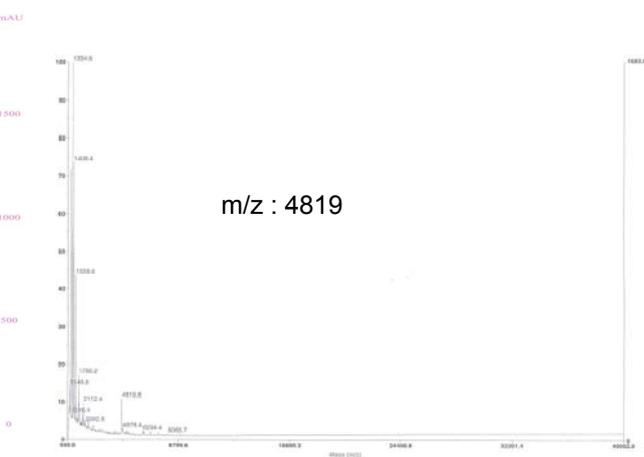
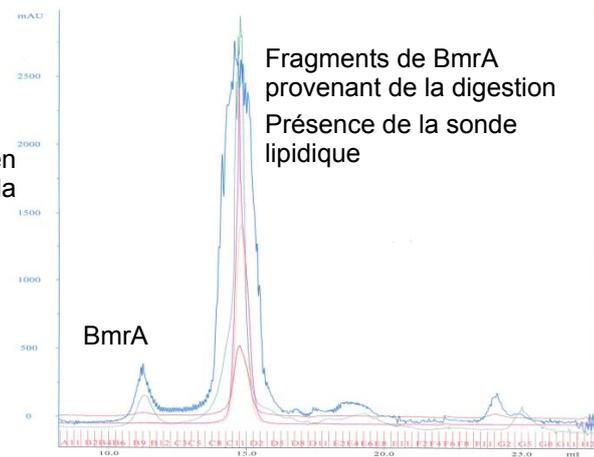


Figure III.21 : Analyses effectuées sur la BmrA, sur les profils chromatographiques le chromatogramme bleue est obtenue à $\lambda = 220$ nm et le chromatogramme rouge à $\lambda = 550$ nm.

La détection des fractions en sortie de colonne est effectuée à deux longueurs d'onde différentes : à 220 nm pour détecter la liaison amide et à 550 nm pour détecter la rhodamine.

L'irradiation de la BmrA par notre lampe au mercure conduit à une légère dégradation de celle-ci (fig. III.21 **a** côté gauche) principalement en fragments de petite taille. Le pic majoritaire correspond à la BmrA non dégradée de m/z observé égale à ~66 kDa (fig. III.21 **a** côté droit).

Après digestion de la BmrA, le fragment majoritaire obtenu en CES (fig. III.21 **b** côté gauche) correspond à des fragments de protéine allant de 3000 à 8000 Da en MALDI-TOF (fig. III.21 **b** côté droit). Ces résultats ne sont pas en adéquation avec les observations effectuées sur Gel SDS-PAGE ou en HPLC. Ceci est dû au fait que les fragments de protéine forment des agrégats après la digestion et ont donc une taille apparente plus grande que la masse de chaque fragment respectif. On observe ce même phénomène avec la sonde lipidique. Celle-ci est éluée en même temps que tous ces fragments de protéines alors qu'elle n'a qu'une masse moléculaire de 1102,5 Da et qu'elle n'est pas attachée de manière covalente à la protéine (échantillon non irradié). Elle reste sous forme de micelles de détergent lors de cette séparation (fig. III.21 **b** côté gauche courbe rouge). Après vérification sur gel SDS-PAGE de la fraction purifiée par CES, on a bien un fragment de protéine non marquée et la sonde lipidique (fig. III.22), les différents m/z obtenus sur le spectre de masse MALDI-TOF proviennent alors soit du fragment visible sur gel soit de contaminants ou de fragments non visibles sur gel (fragments trop petits ou non visibles en bleu de Coomassie). Après irradiation de l'échantillon, un fragment de BmrA est obtenu (fig. III.21 **c** côté gauche), celui-ci est marqué par la sonde lipidique comme le montre la figure III.22 où le fragment marqué est visible en fluorescence (encadré en rouge). Malheureusement après concentration et dessalage de l'échantillon, celui-ci ne contient pas assez de protéine marquée pour pouvoir interpréter correctement l'analyse en spectrométrie de masse.

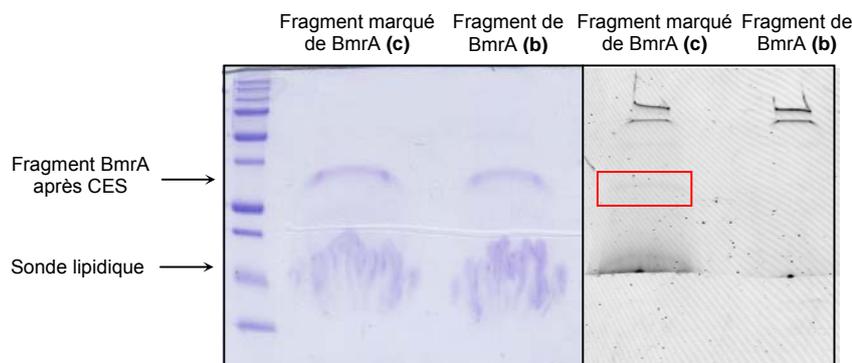


Figure III.22 : Vérification du contenu des échantillons **b** (non marqué) et **c** (marqué) reconcentrés et dessalés sur gel SDS-PAGE après CES

Cette méthode a été utilisée pour son bon rendement de purification contrairement à une purification par HPLC. Malheureusement l'avantage majeur de cette méthode, c'est-à-dire la séparation par taille apparente des protéines en tampon, devient dans notre cas un désavantage puisque l'échantillon purifié en fin de colonne est solubilisé en présence de sel et de détergent pour garder la protéine soluble : deux éléments ne permettant pas de réaliser des analyses correctes en spectrométrie de masse. Une étape de dessalage supplémentaire serait nécessaire ce qui ferait baisser le rendement de purification de la protéine. Cette méthode, tout comme celle utilisant l'HPLC comme moyen de purification, ne donne pas de résultats exploitables quant à l'identification précise d'une zone marquée de la protéine en spectrométrie de masse. Un fragment de protéine marqué en solution est tout de même isolé après purification de l'échantillon : la purification de fragments de protéine par CES est efficace.

Une dernière approche, utilisant la méthode "middle-down" en MALDI-TOF, a été mise en place pour identifier plus directement des zones marquée de la BmrA par comparaison des spectres de masse de la protéine digérée (fig. III.23 **A**) avec ceux de la protéine digérée et marquée (fig. III.23 **B**) sans purification.

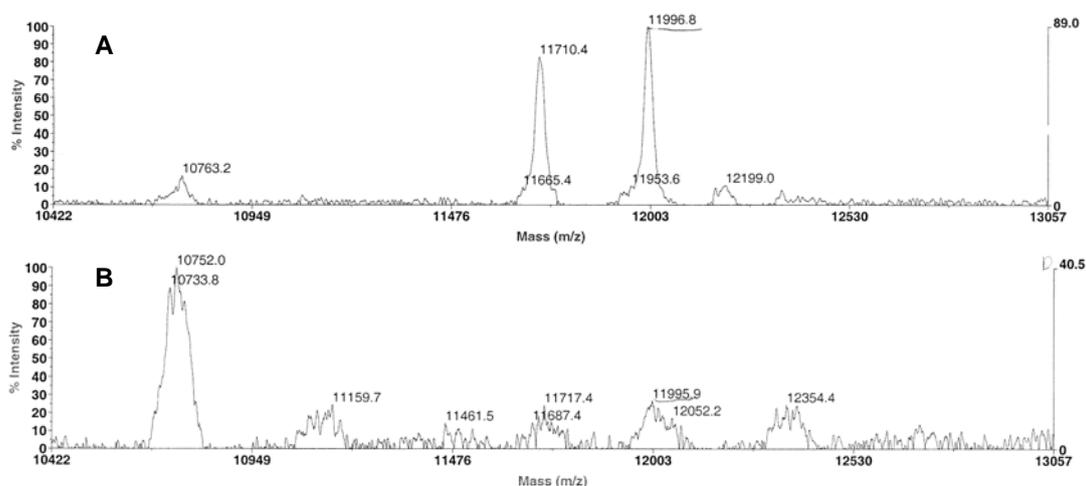


Figure III.23 : Spectre de masse en MALDI-TOF de BmrA digérée **A** et de la BmrA digérée et marquée **B**.

Après vérification par SDS-PAGE, un fragment de BmrA est marqué (fig. III.22) à ~15 kDa. En outre la digestion de BmrA produit bien un fragment de protéine non marquée ayant une masse de ~12 kDa (spectre **A**). En comparant les spectres **A** et **B**, aucune différence notable n'est visible au niveau du nombre de massifs. Le massif correspondant à la protéine marquée (spectre **B**) par la sonde lipidique doit être décalé vers une masse supérieure de $n \times 1102,5 \text{ g.mol}^{-1}$ ou $n \times 1084,5 \text{ g.mol}^{-1}$ (chap. III.2.1.) à celui de la protéine non marquée (spectre **A**). Aucun pic du spectre **B**, non présent sur le spectre **A**, ne peut être attribué à une masse d'un fragment de protéine marquée. Aucune conclusion ne se dégage quant à l'identification de zones marquées de BmrA avec cette méthode.

Les méthodes de purification et d'identifications des zones marquées des protéines en solution n'apportent pas de nouvelles informations quant à la localisation précise de ces zones marquées certainement du fait d'un rendement de photomarquage faible avec la méthode d'irradiation utilisée et d'une étape supplémentaire de purification de l'échantillon ou encore à cause d'une mauvaise sensibilité des spectromètres de masse pour l'analyse de protéines hydrophobes.

2.3. Approche “top-down” LC-ESI et MALDI-TOF

Le but de l'utilisation de cette méthode avec une analyse en LC-ESI ou en MALDI-TOF est de déterminer le rendement de photomarquage sur la protéine c'est-à-dire connaître la quantité de sondes lipidiques qui s'est fixée sur la protéine. L'excédent de sondes lipidiques ne perturbe pas le résultat de l'analyse du fait que sa masse moléculaire est de 1102,5 Da, masse inférieure à celle des protéines étudiées. Les protéines utilisées sont purifiées en fin de production par chromatographie d'exclusion stérique. Elles nous sont fournies avec une bonne pureté et aucune purification supplémentaire n'est nécessaire. Les solutions de protéines et de protéines marquées sont donc analysées directement. Cette méthode nécessite de 30 à 70 µg de protéine en fonction de la concentration de l'échantillon.

L'analyse en LC-ESI nous permet de purifier “en direct” notre échantillon avant l'analyse en spectrométrie de masse sans rajouter d'étapes. Moins un échantillon est manipulé avant l'analyse, plus il est concentré en protéine marquée.

2.3.1) Analyse de la bR en LC-ESI et MALDI-TOF

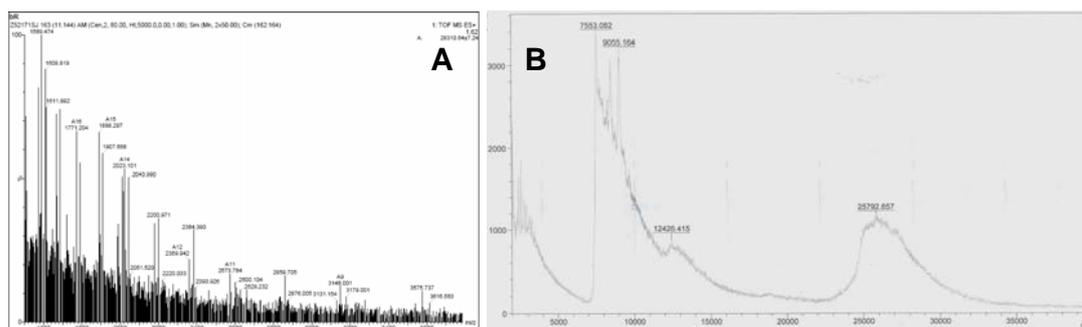


Figure III.24 : Spectre de la bR en LC-ESI A et en MALDI B

Comme on peut le voir sur ce spectre de masse (fig. III.24 A), le signal correspondant à bR est pratiquement dans le bruit de fond de l'analyse : un très mauvais rapport signal sur bruit est à déplorer. La bR non marquée est

difficilement identifiable avec cette méthode même avec une concentration élevée de protéine en solution. Cette difficulté vient du fait que la bR est une protéine très hydrophobe et difficilement ionisable (sur le spectre elle est 9 à 16 fois chargée). Le rendement de photomarquage n'étant pas suffisant, le spectre de masse de la protéine marquée n'est pas exploitable puisqu'on aurait encore moins de signal correspondant à la protéine marquée. Le spectre de la bR obtenu en MALDI-TOF (fig. III.24 B) n'a pas non plus une résolution suffisante (massif trop large) pour être exploité du fait de la présence de sels et de détergents dans l'échantillon à analyser.

2.3.2) Analyse de NS2 en LC-ESI et MALDI-TOF

De meilleurs résultats sont obtenus avec NS2 en LC-ESI du fait que cette protéine est moins hydrophobe et plus facilement ionisable que bR (sur le spectre, fig. III.25 A, elle est 15 à 32 fois chargée).

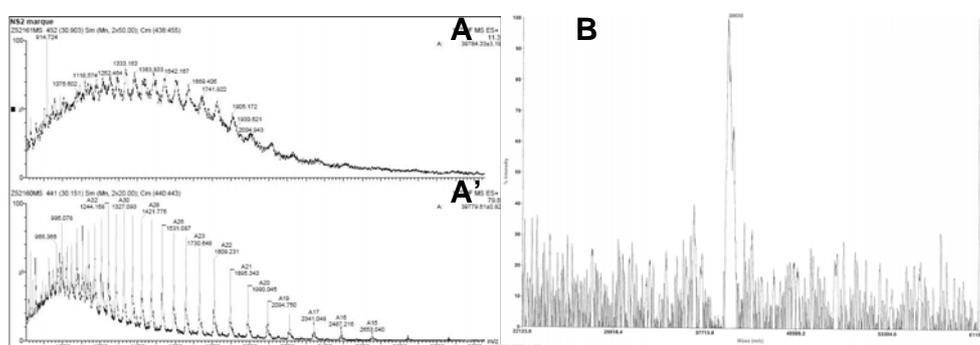


Figure III.25 : Spectre de NS2 marquée **A** et non marquée **A'** en LC-ESI, spectre de NS2 marquée en MALDI-TOF **B**.

Malgré une séparation en direct par chromatographie liquide, l'échantillon de protéines marquées reste trop hétérogène, on a un mélange de protéines marquées par une ou plusieurs sondes lipidiques et de protéines non marquées. La variation d'hydrophobicité des ces différentes entités n'est pas suffisante pour pouvoir les séparer. Les colonnes et les méthodes utilisées en LC-ESI n'ont pas un pouvoir de séparation assez grand pour discriminer toutes les entités de l'échantillon. On ne peut donc pas affirmer avec certitude que le spectre de

masse de l'échantillon marqué (fig. III.25 spectre **A**) correspond à la protéine marquée seule. Le décalage des pics de masse entre l'échantillon marqué et l'échantillon non marqué n'est pas clairement identifiable entre ces deux spectres (fig. III.25 **A** et **A'**). Le spectre **B** sur la figure III.25 en MALDI-TOF de NS2 marquée montre un seul pic à $m/z = 39656$ Da correspondant à la protéine non marquée mono chargée, aucun pic n'est visible et attribuable à la protéine marquée sur le spectre **B** de la figure III.25. Ce pic devrait avoir un m/z supérieur à celui de la protéine seule du fait du marquage de la protéine. Ce pic n'est pas visible à cause du rendement de photomarquage trop faible, de la mauvaise désorption de la protéine de la matrice ou encore à cause de la présence de détergent.

Au vu des résultats obtenus avec ces différentes méthodes de purification et d'identification par spectrométrie de masse, certaines étapes du protocole de photomarquage doivent être améliorées. Le rendement de photomarquage est trop faible du fait d'une irradiation trop courte et doit donc être amélioré pour augmenter la proportion de protéine marquée par rapport à la non marquée. La complexité de l'échantillon est encore trop grande malgré les étapes de purification. Ces deux paramètres sont à améliorer par des moyens complémentaires pour disposer de résultats interprétables en spectrométrie de masse. Au vu des résultats, la séparation de la protéine marquée de celle non marquée ne peut pas être menée avec des outils comme la chromatographie ou le gel d'électrophorèse. Cette séparation doit se faire par d'autres moyens comme par exemple l'immobilisation des protéines marquées sur des billes magnétiques pour les séparer des non marquées restées en solution.

Avec l'optimisation du rendement de photomarquage et du rendement de purification, et le développement de méthodes et d'appareils en spectrométrie de masse, l'identification de protéines et de fragments de protéines hydrophobes modifiés ou non sera plus aisée en spectrométrie de masse dans un futur proche.

3. Optimisation du procédé de photomarquage

Suite aux conclusions apportées au chapitre précédent, différentes stratégies ont été mises en place pour s'affranchir des problèmes posés.

3.1. Augmentation du rendement de photomarquage

Pour augmenter le rendement de photomarquage, il faut augmenter le temps d'irradiation de la solution micellaire protéine/sonde lipidique en évitant la dégradation de la protéine utilisée due à notamment à la chaleur dégagée par la lampe au mercure utilisée. La solution micellaire protéine/sonde lipidique a donc été irradiée par pulses **P** de 30 s d'irradiation suivies d'un temps de refroidissement de 90 s.

Plusieurs stratégies de refroidissement ont été testées. La première **(a)** qui est la plus simple à mettre en place, est le refroidissement par air en ouvrant l'enceinte après chaque temps d'irradiation. La deuxième **(b)** est une amélioration de la première permettant le refroidissement de la cuve en quartz avec de la glace : le support qui tient la cuve (un bécher) est rempli de glace, l'enceinte est ouverte entre chaque irradiation. La troisième **(c)** stratégie mise en place consiste en la fabrication d'une enceinte ventilée en permanence permettant le renouvellement de l'air à l'intérieur de celle-ci et avec un système de refroidissement de la cuve avec un circuit d'eau glacée (photo fig. III.26). Un contrôle de la température de l'enceinte et de la cuve en quartz est effectué, celle-ci n'excède pas 32°C dans l'enceinte et 22°C dans la cuve en quartz.



Figure III.26 : enceinte d'irradiation, **A** vue globale, **B** système de ventilation de l'enceinte, **C** système de refroidissement de la cuve, **D** intérieur de l'enceinte

3.1.1) Résultats

Pour chaque stratégie de refroidissement des tests ont été menés avec la bactériorhodopsine (bR) comme protéine et la sonde lipidique de référence (SLR) comme sonde lipidique. La solution micellaire protéine/SLR a été soumise à un nombre croissant de pulses **P** (**P** = 30 s d'irradiation + 90 s de refroidissement) allant de 1 à 40 avec les différents systèmes de refroidissement. Un gel d'électrophorèse a été effectué pour visualiser la quantité de protéine marquée par la SLR (visualisation en fluorescence au fluorimager : image de droite) et pour visualiser la dégradation de la protéine (coloration au bleu de Coomassie : image de gauche). La quantité de protéine déposée sur le gel est identique pour toutes les expériences et pour chaque puits : 10 µg. Pour chaque test, la bR seule et la bR irradiée avec les conditions initiales **CI** (**CI** = 45 s d'irradiation continues) sont déposées sur le gel pour pouvoir suivre la

dégradation de la protéine et la variation de la quantité de protéines marquée par rapport aux résultats obtenus avec les **CI**.

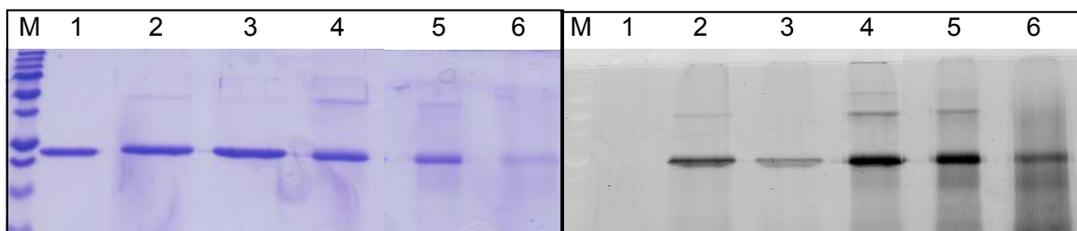


Figure III.27 : Photomarkage de *bR* avec la SLR avec le système de refroidissement **(a)**, coloration au bleu de Coomassie, analyse au fluorimager

<i>M</i> marqueur standard All blue	4 <i>bR</i> + SLR, 5 P
1 <i>bR</i> seule sans irradiation	5 <i>bR</i> + SLR, 10 P
2 <i>bR</i> + SLR, CI	6 <i>bR</i> + SLR, 20 P
3 <i>bR</i> + SLR, 1 P	

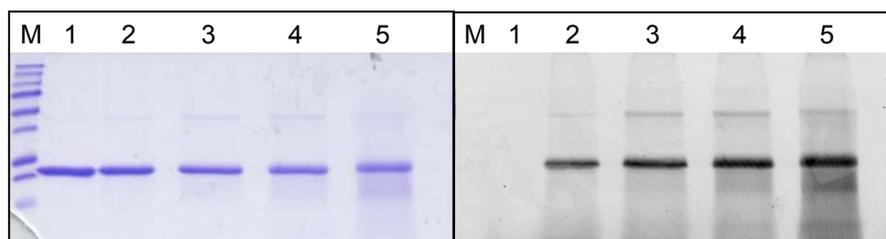


Figure III.28 : Photomarkage de *bR* avec la SLR avec le système de refroidissement **(b)**, coloration au bleu de Coomassie, analyse au fluorimager

<i>M</i> marqueur standard All blue	3 <i>bR</i> + SLR, 5 P
1 <i>bR</i> seule sans irradiation	4 <i>bR</i> + SLR, 10 P
2 <i>bR</i> + SLR, CI	5 <i>bR</i> + SLR, 20 P

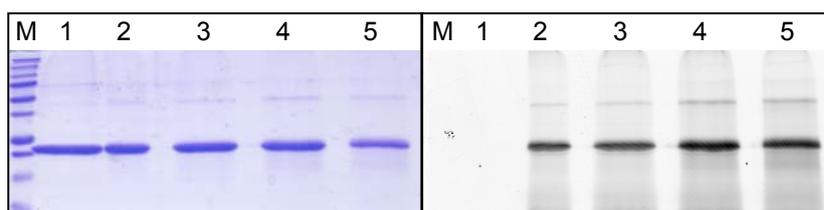


Figure III.29 : Photomarkage de *bR* avec la SLR avec le système de refroidissement **(c)**, coloration au bleu de Coomassie, analyse au fluorimager

<i>M</i> marqueur standard All blue	3 <i>bR</i> + SLR, 5 P
1 <i>bR</i> seule sans irradiation	4 <i>bR</i> + SLR, 10 P
2 <i>bR</i> + SLR, CI	5 <i>bR</i> + SLR, 20 P

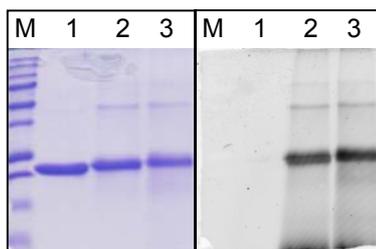


Figure III.30 : Photomarkage de bR avec la SLR avec le système de refroidissement (c), coloration au bleu de Coomassie, analyse au fluorimager

M marqueur standard All blue
1 bR seule sans irradiation
2 bR + SLR, 20 P
3 bR +SLR, 40 P

3.1.2) Discussion

La quantité de protéine photomarkée par cette méthode de pulse est supérieure (au bout de 5 pulses) à la quantité de protéine photomarkée lorsque l'échantillon est irradié avec les conditions initiales (comparer puits 2 avec le puits 3 ou 4 des fig. III.27, 28, 29). Cette quantité augmente aussi lorsque le nombre de pulses augmente comme on peut le visualiser au fluorimager sur les gels d'électrophorèses des ces trois figures : l'intensité de fluorescence de la bande correspondant à la protéine marquée augmente quand le nombre de pulses augmente. Les expériences sont menées de 1 à 40 pulses c'est-à-dire de 30 s à 20 min d'irradiation cumulée sur l'échantillon.

Le système de refroidissement (a) n'est pas assez efficace pour avoir des temps d'irradiation effectifs élevés car la protéine commence à se dégrader à partir de 5 min d'irradiation effective (10 P : fig. III.27 puits 5) pour être totalement dégradée au bout de 10 min d'irradiation effective (20 P : fig. III.27 puits 6) mais la quantité de protéine marquée augmente significativement entre 45 s d'irradiation (conditions initiales : fig. III.27 puits 2) et 2 min 30 s d'irradiation (fig. III.27 puits 4). Pour améliorer ce système de refroidissement, de la glace a été ajoutée dans le support de la cuve pour disposer d'une enceinte réfrigérée (système de refroidissement (b)). Les résultats obtenus (fig. III.28) sont concluants du fait qu'on n'observe plus qu'une légère dégradation de la protéine quand elle est irradiée 10 min (fig. III.28, puits 5) et que l'intensité de

fluorescence de la protéine marquée augmente entre les différents puits ayant un nombre de pulses croissant. Le troisième système de refroidissement **(c)** mis en place nous permet d'avoir un contrôle de la température de l'enceinte et de la cuve pour minimiser la dégradation de la protéine irradiée à des temps allant jusqu'à 20 min (fig. III.29 et fig. III.30). Ce dernier système de refroidissement est donc optimal pour irradier des protéines sur des temps longs sans la dégrader et donc avoir un meilleur rendement de photomarquage.

Une autre source d'irradiation a été testée avec NS2 : une source d'irradiation par LED à 365 nm (Lumos 43, Atlas photonics). Cette source ne dégage pas de chaleur et est monochromatique, elle est donc moins destructrice pour le matériel biologique testé comme on peut le voir sur la figure III.31. Ce test est effectué sur la protéine NS2 marquée par la SLR en irradiant la solution micellaire jusqu'à 2 h en continu (fig. III.31 puits 5), aucune dégradation de la protéine n'est observée. Cette source d'irradiation nous permet donc d'irradier sur des durées plus longues en continu (pas de temps de refroidissement nécessaire) les protéines testées pouvant ainsi augmenter le rendement de photomarquage.

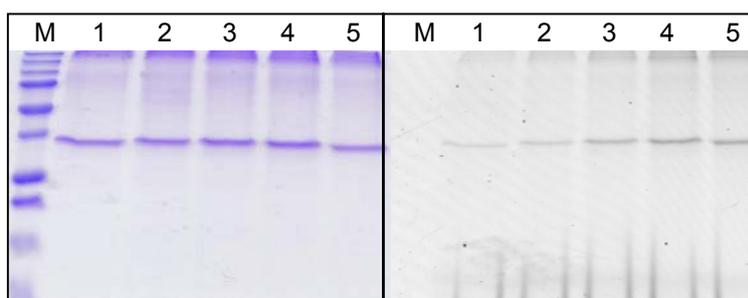


Figure III.31 : Photomarquage de NS2 par la SLR, irradiation avec une source LED, coloration au bleu de Coomassie, analyse au fluorimager

M marqueur standard All blue	3 NS2 + SLR irradiée 20 min
1 NS2 + SLR irradiée 5 min	4 NS2 + SLR irradiée 60 min
2 NS2 + SLR irradiée 10 min	5 NS2 + SLR irradiée 120 min

Les protocoles d'irradiation utilisés pour cette source et pour d'autres sources testées comme le laser sont en cours de développement (optimisation

du temps, de la longueur d'onde et de la puissance d'irradiation). Une fois ces protocoles optimisés, ils seront utilisés en lieu et place du protocole actuel pour marquer le matériel biologique par la sonde lipidique de manière plus efficace.

3.2. Double purification de l'adduit de photomarquage

Cette méthode est basée sur une double purification de la solution à analyser après photomarquage grâce à une nouvelle sonde lipidique biotinylée **19** (pour rappel fig. III.32) avec l'utilisation d'abord du His-Tag porté par la protéine et ensuite de l'interaction forte existante entre la biotine de la sonde lipidique et la streptavidine.

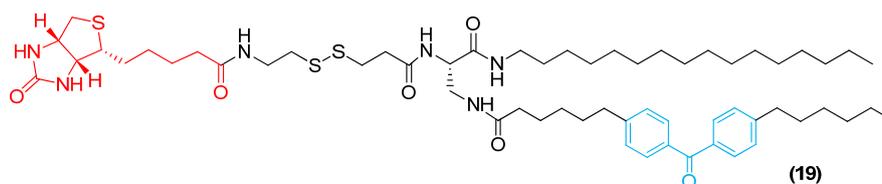


Figure III.32 : sonde lipidique photoactivable et biotinylée **19**

Cette méthode nous a permis d'enrichir l'échantillon à analyser en protéines marquées et de baisser la complexité de celui-ci en diminuant les quantités des entités n'ayant pas réagi : la sonde lipidique biotinylée en excès et la protéine non marquée (n'ayant pas réagi avec la sonde lipidique).

La streptavidine est une protéine d'origine bactérienne homologue de l'avidine, isolée de l'actinobactérium *Streptomyces avidinii* ayant une structure tétramérique. L'interaction entre la streptavidine et la biotine est la plus forte interaction non covalente observée à ce jour dans la nature avec une constante de dissociation de $K_d = 4.10^{-14} \text{ M}^{101}$. La structure du complexe biotine/streptavidine a été résolue pour la première fois en 1989 par Hendrickson

¹⁰¹ N. M. Green (1990). Avidin and Streptavidin. Methods Enzymol., 184, 51-67

et son équipe¹⁰², montrant une structure en tonneau β pour chacun des quatre monomères permettant une interaction forte entre ces poches et la biotine via des liaisons hydrogène et des interactions de Van der Waals. La streptavidine est très utilisée en biologie moléculaire à cause de la résistance du complexe biotine/streptavidine formé aux solvants organiques, aux dénaturants, aux détergents, à la digestion protéolytique et aux températures et pH extrêmes.

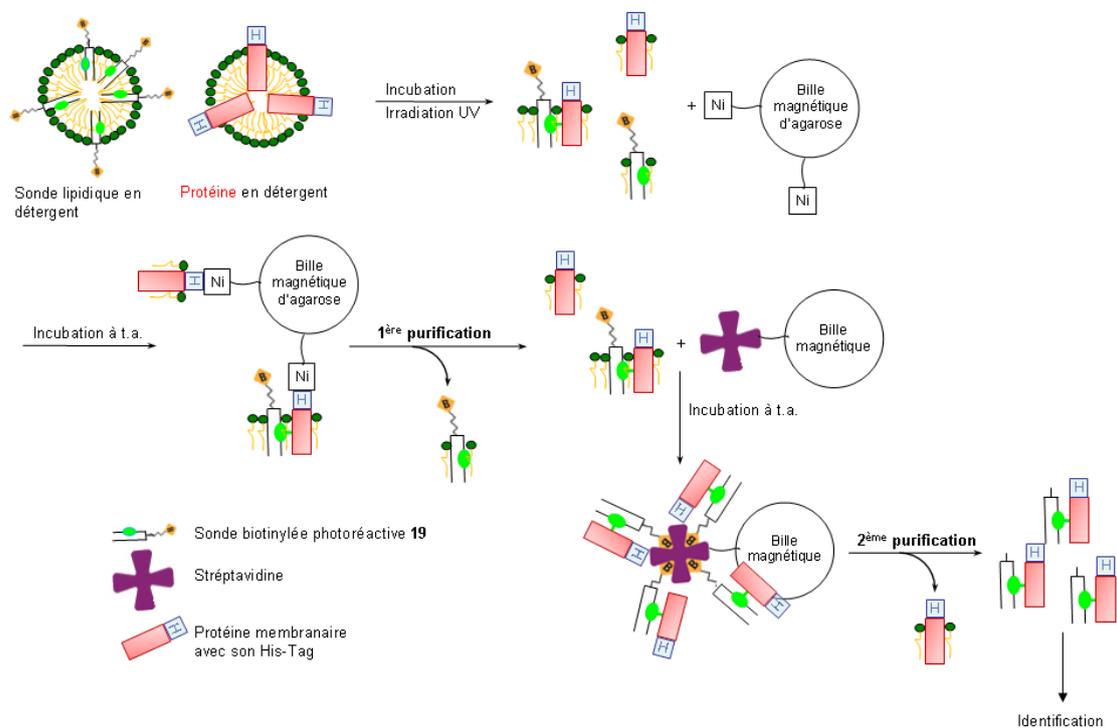


Figure III.33 : Double purification d'une protéine His-Tag marquée par la sonde lipidique biotinyllée

La purification se déroule en deux étapes (fig. III.33). La première étape de cette purification consiste à enlever l'excédant de sonde lipidique biotinyllée n'ayant pas réagi avec la protéine. Pour ce faire, la protéine est immobilisée sur des billes magnétiques Ni-NTA-Agarose via son His-Tag (fig. III.33, **1^{ère} purification**). Ces billes magnétiques sont constituées d'agarose fonctionnalisé

¹⁰² W. A. Hendrickson, A. Pahler, J. L. Smith, Y. Satow, E. A. Merritt, R. P. Phizackerley (1989). Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86, 2190-2194

avec de l'acide nitrilotriacétique complexant du nickel. Les résidus histidine du tag sont immobilisés sur les billes en complexant le nickel. Une fois l'excédant de sonde lipidique enlevé par lavage successif, la protéine est décrochée des billes grâce à de l'imidazole.

La deuxième étape consiste à enlever la protéine n'ayant pas réagi avec la sonde lipidique biotinylée. Pour ce faire, la protéine marquée est immobilisée sur des billes magnétiques fonctionnalisées avec de la streptavidine via le résidu biotine de la sonde accrochée à la protéine (fig. III.33, **2^{ème} purification**). Comme l'interaction biotine/streptavidine est trop forte pour être cassée et pour ne pas être gêné par le complexe billes magnétiques/biotine/streptavidine lors des analyses, la séparation de la protéine marquée du complexe billes magnétiques/biotine/streptavidine est effectuée en milieu réducteur permettant la coupure du pont disulfure situé entre le groupement photoréactif et la biotine de la sonde lipidique **19** (fig. III.32).

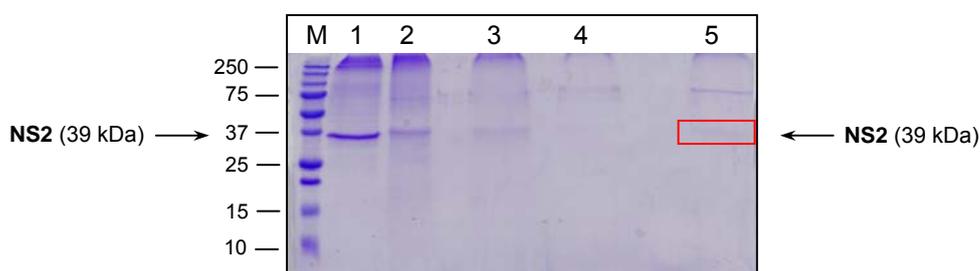


Figure III.34 : Photomarquage et double purification de l'échantillon marqué, essai avec NS2, coloration au bleu de Coomassie

M marqueur standard All blue	3 surnageant après la 2^{ème} purification
1 NS2 seule sans irradiation	4 surnageant après la 1^{ère} purification
2 NS2 + 19 , irradiée	5 surnageant après la dénaturation

Malgré l'optimisation de la méthode d'irradiation, la protéine après irradiation est tout de même dégradée par rapport à la protéine non irradiée (fig. III.34 puits 1 et 2). Le surnageant prélevé avant le décrochage de la protéine des billes d'agarose après la première purification ne contient pas de protéine, (fig. III.34 puits 4) ce qui veut dire que toute la quantité de protéines (marquées et non marquées) contenue dans l'échantillon est immobilisée par les billes

d'agarose. Par contre le surnageant prélevé avant la dénaturation lors de la deuxième purification avec les billes magnétiques streptavidine contient de la protéine (fig. III.34 puits 3) : c'est de la protéine non marquée ne pouvant pas interagir avec les billes streptavidine. Finalement après dénaturation de l'échantillon en milieu réducteur, le surnageant contient bien de la protéine (fig. III.34 puits 5, bande encadrée en rouge). De plus, des résidus thiols sont retrouvés sur les billes magnétiques streptavidine après dénaturation prouvant bien la présence du complexe sonde lipidique/protéine sur celles-ci. L'identification de ces résidus a été effectuée par un dosage d'Ellman¹⁰³. Malheureusement au final, la quantité de protéine marquée purifiée n'est pas suffisante pour effectuer diverses analyses pour identifier la ou les zone(s) marquée(s) ou pour quantifier le rendement de photomarquage.

Cette méthode de double purification et donc d'enrichissement de notre échantillon en protéine marquée est en cours de développement. Elle nous permet de diminuer la complexité de l'échantillon et donc permettra une analyse plus simple de celui-ci. L'optimisation de cette méthode s'effectue au niveau du choix de la protéine, de la quantité de protéine utilisée, de l'irradiation de l'échantillon et des étapes de purification mises en œuvre, mais elle a déjà donné des résultats encourageants.

¹⁰³ G. L. Ellman (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77

4. Partie expérimentale biochimique

4.1. Molécules utilisées

Le *n*-dodécyl- β -D-maltoside (DDM), le dodécylphosphocholine (FC 12), la L- α -phosphatidylcholine (PC) de jaune d'œuf, le cholestérol (chol, pureté 99%, recristallisé dans du méthanol) et la bactériorhodopsine (bR) lyophilisée de *Halobacterium salinarum* utilisés proviennent de chez Sigma-Aldrich. Le chlorure d'octadécylrhodamine B (R₁₈) utilisée pour les tests de fluorescence provient de chez Molecular Probes.

4.2. Formation des liposomes

A partir des lipides solubilisés dans du chloroforme (PC, chol et sonde lipidique), un mélange est réalisé en fonction de la composition lipidique choisie. Dans notre étude cette composition est PC/chol/sonde lipidique 65/30/5 (ratio molaire) et pour avoir une concentration finale en lipide de 5 mM dans un volume donné (au minimum 300 μ L). Le solvant est évaporé sur une plaque chauffante à 37 °C ou sous flux d'azote pour former un film lipidique. Celui-ci est ensuite repris dans un volume donné de tampon PBS (Phosphate Buffer Saline, 58 mM Na₂HPO₄, 2H₂O, 17 mM NaHPO₄, H₂O, 68 mM NaCl, pH = 7,4). Le film lipidique est détaché grâce à un passage au vortex, ce qui conduit à la formation de liposomes de taille et d'épaisseurs irrégulières. Cette solution subit ensuite au moins 5 cycles de congélation/décongélation dans l'azote liquide (-196°C) et au bain marie à 37°C. La calibration des liposomes s'effectue par filtration à un diamètre de 100 nm grâce à un filtre de polycarbonate (Avestin) à l'aide d'un extrudeur (Hamilton), pour obtenir des liposomes unilamellaires et de taille uniforme. Ces échantillons sont conservés à 4°C au maximum une semaine.

4.3. Fluorimètre

Le fluorimètre utilisé pour les mesures de fluorescence est un Tecan infinite M1000. Cet appareil permet de réaliser des mesures de spectres d'émission et d'excitation des sondes lipidiques fluorescentes en liposome. Les mesures sont réalisées dans une plaque Chimney-Greiner 96 puits noires à fond plats. Les données brutes sont ensuite traitées par informatique (courbe générée par Excel).

4.4. Mesure de la fluorescence

La mesure s'effectue sur des échantillons de 100 μL par puits : 2 μL de solution de liposome PC/chol/sonde lipidique + 98 μL de tampon PBS. Les spectres d'émission sont mesurés à une longueur d'onde d'excitation de 560 nm et à une longueur d'onde d'émission comprise entre 570 et 650 nm, les spectres d'excitation sont mesurés à une longueur d'onde d'émission de 580 nm et à une longueur d'onde d'excitation comprise entre 450 et 570 nm. Tous les spectres sont mesurés à 32 °C. La fluorescence résiduelle de liposomes blancs (PC/chol) est soustraite de la fluorescence enregistrée avec les sondes lipidiques fluorescentes.

4.5. Formation des micelles de détergents contenant les lipides outils

A 50 μL (45,4 nmol) d'une solution à 1 mg/mL (0,9 mM) de sonde lipidique dans CHCl_3 sont ajoutée 25 μL de MeOH (1/2 MeOH/ CHCl_3 v/v) et 3,98 μL (2,27 μmol – 1/50 ancre/détergent n/n) d'une solution de FC 12 à 570 mM (rq : le volume de détergent ne doit pas dépasser 5% du volume total de l'échantillon). Le solvant est évaporé sur une plaque chauffante à 37 °C et séché au lyophilisateur pendant 2 h. Ce film lipidique est resolubilisé dans 50 μL d'eau milliQ et 50 μL d'une solution tampon. Le tampon est choisi en fonction de

l'expérience à mener et est précisé pour chaque expérience. Cette solution peut être conservée pendant une semaine à 4°C.

4.6. Irradiation

L'irradiation est réalisée avec une lampe UV au mercure de 400 W (Source « Flood » Dymax, Equipements Scientifiques SA) à différent temps et sur un échantillon placé dans une cuve en quartz à une distance de 10 cm. L'irradiation est effectuée sur une gamme de longueurs d'onde située autour de 365 nm, maximum d'excitation de la benzophénone. Le volume d'échantillon (au minimum 10 µL) est défini en fonction des expériences effectuées par la suite.

L'irradiation avec le système à LED Lumos 43 d'Atlas photonics (<http://www.atlas-photonics.com>) est aussi effectuée en continu dans une cuve en quartz sans système de refroidissement à une longueur d'onde monochromatique de 365 nm.

4.7. Digestion protéolytique des protéines membranaires photomarquées

La digestion protéolytique a été effectuée avec l'endoprotéinase Glu-C. Dans le tampon approprié cette enzyme coupe spécifiquement la protéine au niveau d'un résidu glutamate. Les protéines membranaires photomarquées sont incubées avec l'enzyme de digestion V8 dans les proportions 1/20 enzyme/protéine p/p à 0°C dans un tampon Tris 20 mM à pH = 8,0 puis la digestion est effectuée à 37 °C pendant un temps voulu (pour BmrA : 5 min). La digestion est stoppée soit en ajoutant du tampon Laemmli 2X (1/1 échantillon/Laemmli v/v) pour déposer sur gel soit en ajoutant quelques µL d'une solution de TFA à 1 % dans l'eau pour arriver à pH = 2 pour faire une purification en HPLC et/ou une mesure de masse ou soit par 2% (v/v) de SDS.

4.8. Analyse des gels

Tous les gels de polyacrylamide (SDS-PAGE) sont fabriqués avec 15 % d'acrylamide et 20 % de glycérol. La migration a été effectuée dans une solution de SDS 1X, à 80 V durant la migration dans le stacking puis à 125 V durant la migration dans le gel de migration.

Après migration de l'échantillon sur gel de polyacrylamide, le résultat obtenu a été tout d'abord scanné à l'aide d'un fluorimager Typhoon 8600 (disponible au CERVI de Lyon) pour détecter la fluorescence de la rhodamine grâce à un laser à 580 nm. Le gel est directement déposé dans la scanner après avoir découpé, au scalpel, la bande de gel comportant l'excédant de sonde lipidique. Ensuite le gel est coloré en bleu de Coomassie (Bleu de Coomassie R250, méthanol 1%, isopropanol 25 %, acide acétique 10 %).

4.9. Analyse HPLC

Les analyses HPLC sont réalisées sur un appareil Waters équipé d'une colonne C₈ Polymeric Reversed-Phase VYDAC 208TP (250 x 10 mm, 10 µm, 300 Å). Les analyses ont été effectuées avec un gradient linéaire durant 45 min de 0 % à 70 % de B puis 30 min pour passer de 70 % à 100 % de B suivies d'un plateau durant 10 min à 100 % de B avec un débit de 1 mL.min⁻¹. Les temps de rétention sont donnés en minute. La détection s'effectue à deux longueurs d'onde 220 et 550 nm. Solvant A : H₂O/ACN 80/20 v/v, 0,1 % TFA, solvant B : H₂O/ACN 20/80 v/v, 0,1 % TFA.

4.10. Purification de la protéine membranaire photomarquée dans un tampon

L'échantillon est purifié par SEC/FPLC (AKTÄpurifier, GE Healthcare) équipé d'une colonne Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare). Après conditionnement (un volume de colonne : 23 mL (VC)) et équilibrage (1VC) de la

colonne avec un tampon [20 mM tris-HCl (pH 8), 0.5 % FC 12 (p/v), 0.2 ou 0.05 M NaCl], l'échantillon (50 μ L) est injecté à un débit de 0,5 mL/min. Les fractions (150 μ L) sont collectées et celles d'intérêt sont choisies en fonction du profil FPLC, concentrées et dessalées jusqu'à 50 μ L par centrifugation (3 passages à 9500 g pendant 25 min) avec une unité de filtration (Amicon Ultra – 0.5 mL 3K Millipore) pour les analyses futures. La détection en sortie de colonne est effectuée à trois longueurs d'onde différentes : 220 nm (liaison amide), 280 nm (fonction aromatiques) et 550 nm (rhodamine).

4.11. Spectrométrie de masse

4.11.1) Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les mesures de masse enregistrées ont été effectuées sur un spectromètre UltraflexTM Maldi-TOF/TOF (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). Cet appareil a été utilisé à un potentiel d'accélération maximum de 25 kV en mode positif avec un laser à azote (337 nm) pulsé. La préparation de l'échantillon est effectuée selon la méthode de la gouttelette séchée. Cette gouttelette est composée de 0,5 μ L d'échantillon à analyser et 0,5 μ L de matrice (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique), déposée sur la cible puis séchée à température ambiante.

4.11.2) Spectrométrie de masse LC-MS/MS

Avant analyse en LC-MS/MS, le peptide à analyser est extrait du gel. Tout d'abord la bande du gel d'intérêt est excisée puis cette bande de gel est décoloré à 37 °C pendant 15 min dans un tampon bicarbonate d'ammonium (tampon ABC) 50 mM/CH₃CN (50/50 v/v). La mixture résultante subit une réduction au DTT dans un tampon ABC 10 mM à 50 °C pendant 15 min. La solution est ensuite alkylée avec de l'iodoacétamide 100 mM pendant 15 min à température ambiante. Pour finir l'extraction du peptide du gel, la solution est digérée à la trypsine pendant 45 min à 50°C avant d'être analysée en LC-MS/MS.

La séparation en LC est effectuée sur un Ultimate 3000 (Dionex) équipé d'une colonne Acclaim PepMap C₁₈ (150 mm, 75 µm, 3µm, 100 Å). Les analyses sont effectuées avec un gradient linéaire de 60 min de 100 % de A (95 % H₂O, 5 % ACN, 0,1 % d'acide formique) à 100 % de B (20 % H₂O, 80 % ACN, 0,1 % d'acide formique). Les mesures de masse enregistrées ont été effectuées sur un spectromètre LTQ Velos (Thermo Scientific) en mode de fragmentation CID.

4.11.3) Spectrométrie de masse LC-MS

La séparation en LC est effectuée sur un Alliance 2695 (Waters, Milford, MA) équipé d'une colonne XBridge BEH300 C₄ (250 mm x 2,1 mm, 3,5 µm). Les analyses sont effectuées avec un gradient linéaire de 25 min de 20 à 60 % de B (100 % ACN, 0,1 % TFA) à 50 °C suivi par un plateau de 5 min à 85 % de B à un débit de 250 µL/min. Le solvant A est 100 % H₂O et 0,1 % TFA. Les mesures de masse enregistrées ont été effectuées sur un spectromètre LCT-TOF (Waters, Milford, MA) en mode positive.

4.12. Double purification

100 µg de NS2 sont incubés avec la sonde lipidique biotinyllée (rapport 1/8 NS2/biotine) à 4°C durant une nuit puis cette solution est irradiée 20 min effectives avec la lampe à mercure utilisant la méthode d'irradiation **(c)** (chap. III., p. 156).

Pour la première purification 100 µL de billes magnétiques d'agarose sont lavées avec 3 mL d'eau, puis elles sont équilibrées avec un tampon d'équilibration (Tris-HCl 10 mM pH = 8,0, imidazole 10 mM, NaCl 300 mM, DPC 0,5 %). La solution de protéines marquées est déposée sur les billes est incubée à température ambiante pendant 10 min. Le surnageant est enlevé en immobilisant les billes magnétiques avec un aimant, puis les billes sont lavées avec un tampon (3 fois 500 µL, Tris-HCl 10 mM pH = 8,0, imidazole 30 mM, NaCl 300 mM, DPC 0,5 %). La protéine immobilisée sur les billes est décrochée avec un tampon d'élution (3 fois 100 µL, Tris-HCl 10 mM pH = 8,0, imidazole 500

mM, DPC 0,5 %). Le surnageant est ensuite mis de côté à 4°C le temps de conditionner les billes magnétiques streptavidine.

80 µL d'une solution à 5 mg/mL de billes magnétique streptavidine pouvant immobiliser 1947 pmol de biotine par mg sont prélevés et déposés dans un Eppendorf. Le surnageant de cette solution est enlevé puis les billes sont lavées avec un tampon AcNH₄ 20 mM pH = 8,0 (2 fois 100 µL). Le surnageant de la première purification est déposé et incubé sur ces billes magnétiques streptavidine pendant 30 min à température ambiante pour immobiliser la protéine marquée avec la biotine. Le surnageant est ensuite enlevé et les billes restantes sont lavées trois fois avec 200 µL d'un tampon AcNH₄ 20 mM pH = 8,0 pour enlever la protéine non marquée. Au final la protéine marquée est décrochée des billes magnétiques en milieu réducteur avec du Laemmli 5X pendant une nuit à 4°C. Le surnageant est déposé sur gel d'électrophorèse.

Un dosage d'Ellman avec de l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) est effectué sur les billes magnétiques stéptavidine en fin de purification pour observer la présence de résidus thiols sur les billes en mesurant une absorbance à 412 nm.

IV Projets annexes

1. "Click Chemistry" sans cuivre sur liposome : un couplage pH-indépendant

La fonctionnalisation en surface des liposomes par des peptides, des protéines ou par des sucres est, de nos jours, largement étudiée^{104,105}. Par exemple pour fonctionnaliser un liposome par un peptide, l'insertion stable de celui-ci dans la bicouche phospholipidique requiert l'extension du peptide par une queue lipidique composée d'une à deux chaînes grasses¹⁰⁶. Malheureusement l'entité amphiphile formée est difficilement manipulable du fait de ses difficultés à être solubilisé. Pour contourner ces difficultés, des stratégies alternatives ont été développées où le composé que l'on veut associer au liposome est lié via une liaison covalente à une ancre lipidique fonctionnalisée qui est déjà insérée dans la membrane du liposome¹⁰⁷. Pour cette stratégie et depuis le milieu des années 2000, la liaison chimique entre l'ancre et le peptide (par exemple) est choisie parmi les liaisons amide, thioether, imine, le pont disulfure ou encore la liaison hydrazone. Malheureusement la formation de ces liaisons chimiques présente certains désavantages et ont souvent besoin de conditions opératoires spécifiques : pH spécifique, besoin d'un agent activateur ou d'un catalyseur, production de produits secondaires et certaines ne sont pas spécifiques.

Pour pallier ces désavantages, une nouvelle réaction de chimie de bioconjugaison à la surface des liposomes a été développée. Cette réaction chimique est bioorthogonale c'est-à-dire inerte vis-à-vis du milieu biologique, non toxique, ne nécessite pas de catalyseur et ne génère pas de produits dérivés. Elle est basée sur la réaction de "Click Chemistry" bien connue et développée

¹⁰⁴ H. Hojo, T. Kojima, K. Yamauchi, M. Kinoshita (1996). Synthesis and liposome-formation of a thermostable lipid bearing cell adhesion peptide sequence. *Tetrahedron Lett.* 37, 7391-7394

¹⁰⁵ P. Scheiré, C. Boeckler, B. Frisch, F. Schuber (2000). Differential reactivity of maleimide and bromoacetyl functions with thiols: Application to the preparation of liposomal diepitope constructs. *Bioconj. Chem.*, 11, 118-123

¹⁰⁶ S. Shahinian, J. R. Silvius (1995). Doubly-Lipid-Modified Protein Sequence Motifs Exhibit Long-Lived Anchorage to Lipid Bilayer Membranes. *Biochemistry*, 34, 3813-3822

¹⁰⁷ M. Fleiner, P. Benzinger, T. Fichert, U. Massing (2001). Studies on protein-liposome coupling using novel thiol-reactive coupling lipids: influence of spacer length and polarity. *Bioconj. Chem.*, 12, 470-475

par Sharpless et son équipe¹⁰⁸ depuis les années 2000 comme étant une cycloaddition de Huisgen catalysée par le cuivre. De récents développements apportés par Bertozzi *et al.*¹⁰⁹ nous permettent maintenant de réaliser cette réaction de "Click Chemistry" sans cuivre entre un alcyne cyclique et un azoture. Cette étude va montrer la faisabilité de cette réaction de couplage en milieu aqueux et à différents pH comme nouveau mode de bioconjugaison à la surface des liposomes.

Tout d'abord deux composés ont été conçus et synthétisés pour pouvoir réagir sélectivement et exclusivement l'un avec l'autre : une ancre lipidique, du dioléylglycéro-éthoxy-éthoxy-éthanamide cyclooct-1-yn-3-glycole (Ancre DOGPEG₄Cyclooctyne) et un azoture soluble dans l'eau et fluorescent, du 2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthanamidecarboxytétraméthylrhodamine (sonde N₃PEG₃CTMR). L'ancre lipidique est composée de deux chaînes grasses et d'une fonction alcyne cyclique. Cette fonctionnalité connue pour être chimiquement inerte *in vivo*¹⁰⁶ lui permet de réagir spécifiquement avec n'importe quel azoture présent dans son environnement. Le caractère amphiphile de cette molécule lui permet de s'insérer de manière stable et irréversible dans la bicouche lipidique des liposomes. Ensuite ce composé est quantitativement incorporé aux liposomes durant leurs formations grâce à ces deux chaînes grasses. Enfin, dans notre étude cette ancre lipidique a réagi avec une sonde fluorescente via une réaction de "Click" en formant un triazole entre l'azoture porté par la sonde fluorescente et l'alcyne cyclique de l'ancre (fig. IV.1). La fluorescence de la sonde couplée nous a permis de suivre et de quantifier la réaction de couplage à la surface des liposomes.

¹⁰⁸ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 2004-2021

¹⁰⁹ N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi (2004). A Strain-Promoted [3+2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 15046-15047

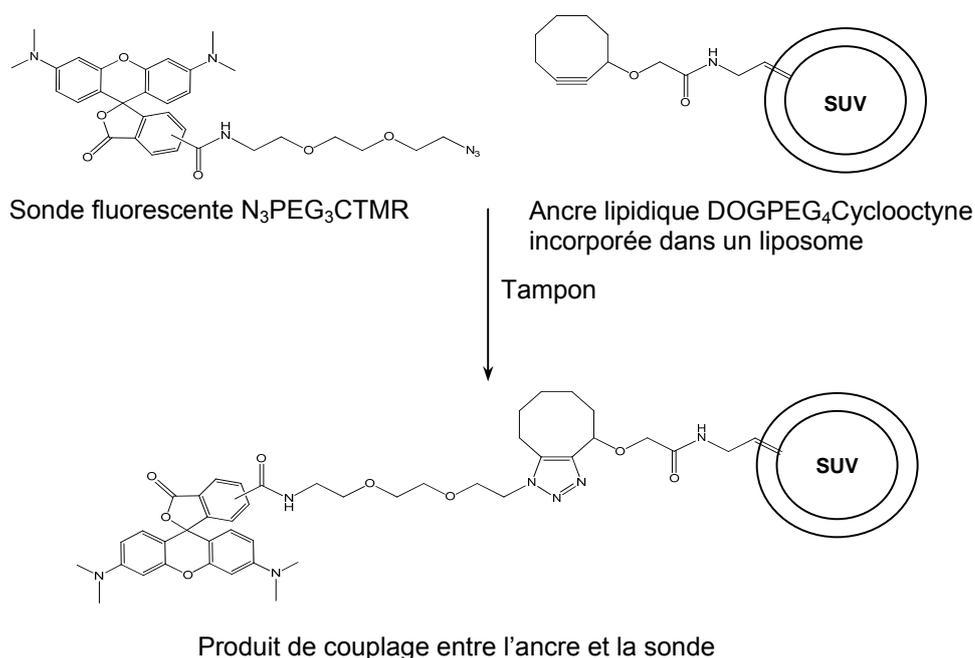


Figure IV.1 : réaction de couplage entre une sonde fluorescente et une ancre lipidique incorporée dans un liposome via une réaction de "Click chemistry"

1.1. Synthèse de l'ancre DOGPEG₄Cyclooctyne

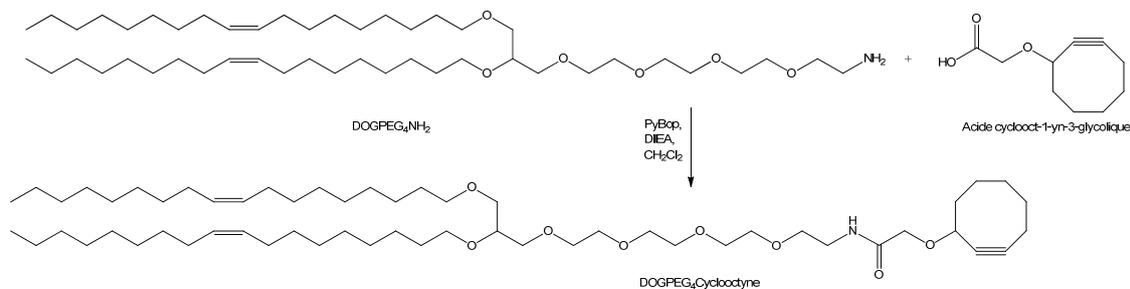


Figure IV.2 : synthèse de l'ancre DOGPEG₄Cyclooctyne

La synthèse de l'ancre alcyne DOGPEG₄Cyclooctyne commence par la production d'un dérivé lipidique de type dyoléylglycérol DOGPEG₄NH₂. Cette molécule est synthétisée en 6 étapes à partir du glycérol, du tétraéthylène glycol

et de l'alcool oléique¹¹⁰. L'amine libre de ce dérivé réagit ensuite avec l'acide cyclooc-1-yn glycolique¹¹¹ préalablement activé par du PyBOP en présence de DIEA solubilisé dans CH₂Cl₂ pour donner l'ancre alcyne DOGPEG₄Cyclooctyne avec un rendement isolé satisfaisant de 55% (fig. IV.2).

1.2. Synthèse de la sonde N₃PEG₃CTMR

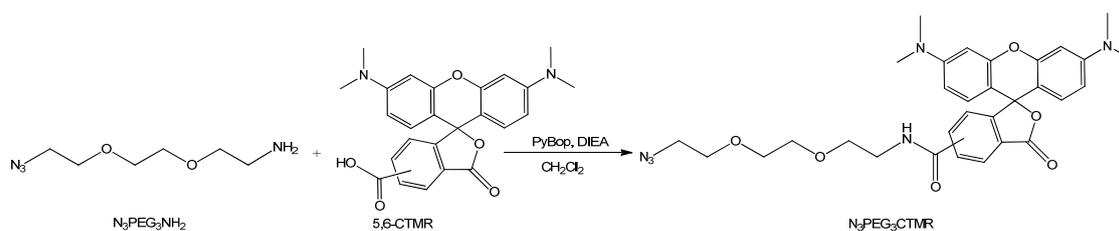


Figure IV.3 : synthèse de la sonde N₃PEG₃CTMR

La sonde N₃PEG₃CTMR est synthétisée en une étape à partir du 2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthanamine (N₃PEG₃NH₂) et de la 5,6-CTMR via un couplage peptidique. Le N₃PEG₃NH₂ est synthétisé en 3 étapes à partir du triéthylène glycol¹¹². La fonction acide de la 5,6-CTMR est d'abord activée avec du PyBOP en milieu basique (DIEA) dans du CH₂Cl₂ puis cette acide activé réagit avec l'amine libre du N₃PEG₃NH₂ pour former le composé N₃PEG₃CTMR avec un bon rendement de 56% (fig. IV.3).

¹¹⁰ S. Espuelas, P. Haller, F. Schuber, B. Frisch (2003). Synthesis of an amphiphilic tetraantennary mannosyl conjugate and incorporation into liposome carriers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 2557-2560

¹¹¹ A. Bernardin, A. Cazet, L. Guyon, P. Delannoy, F. Vinet, D. Bonnaffé, I. Texier (2010). Copper-Free Click Chemistry for Highly Luminescent Quantum Dot Conjugates : Application to in Vivo Metabolic Imaging. *Bioconjugate Chem.*, 21, 583-588

¹¹² G. Budin, M. Moune Dimala, V. Lamour, P. Oudet, C. Mioskowski, S. Meunier, L. Brino, A. Wagner (2010). A Chemical Labeling Strategy for Proteomics under Nondenaturing Condition. *ChemBioChem*, 11, 79-82

1.3. Couplage de la sonde fluorescente à la surface des liposomes

Après incorporation de l'ancre lipidique dans des liposomes, le couplage par "click chemistry" sans cuivre de la sonde fluorescente à la surface des liposomes contenant l'ancre lipidique a été réalisé à trois pH différents en fonction des tampons utilisés (tampon Hepes (10 mM, 100 mM NaCl, pH = 7,4), tampon acétate d'ammonium AcNH₄ (10 mM, 100 mM, pH = 4,0), tampon Borax (10 mM, 100 mM, pH = 9,0)) et à des temps de réaction allant de 1 h à 24 h.

Pour stopper la réaction de couplage entre la sonde fluorescente portant la fonction azoture et l'ancre lipidique portant la fonction alcyne à un temps donné, l'excédant de sonde fluorescente qui n'a pas réagi est enlevée de la solution de liposomes par chromatographie d'exclusion stérique.

Pour calculer le rendement de couplage de la réaction une mesure d'absorbance est enregistrée pour déterminer la quantité de sonde fluorescente immobilisée à la surface des liposomes.

Le contrôle négatif est déterminé dans les mêmes conditions avec des liposomes ne contenant pas d'ancre lipidique. Ces liposomes blancs, après séparation de la sonde fluorescente, ne donnent qu'un faible signal d'absorbance résiduel compris entre 0,02 et 0,06.

1.3.1) Quantification de la quantité de sonde fluorescente ayant réagi avec l'ancre

La loi de Beer-Lambert a été utilisée pour quantifier la quantité de sonde fluorescente couplée à la surface du liposome. Cette loi est une relation linéaire entre l'absorbance A et la concentration C corrigée par un coefficient d'extinction molaire ε si le trajet optique est de 1 cm de long.

D'abord, la longueur d'onde λ_{\max} où l'absorbance de la sonde fluorescente est maximale a été déterminée : $\lambda_{\max} = 551$ nm. Toutes les mesures d'absorbance ont été enregistrées dans la suite de l'étude à cette longueur d'onde. Ensuite le coefficient d'extinction molaire ε a été déterminé pour chaque tampon utilisé (aux différents pH) : l'absorbance de solution de sonde

fluorescente à des concentrations connues pour chaque tampon a été mesurée, le coefficient directeur de la droite formée nous donne le coefficient d'extinction molaire ε (fig. IV.4). Pas de différence significative entre les trois ε correspondant aux trois différents tampons utilisés n'a été trouvée. La sonde fluorescente synthétisée n'est pas sensible aux changements de pH.

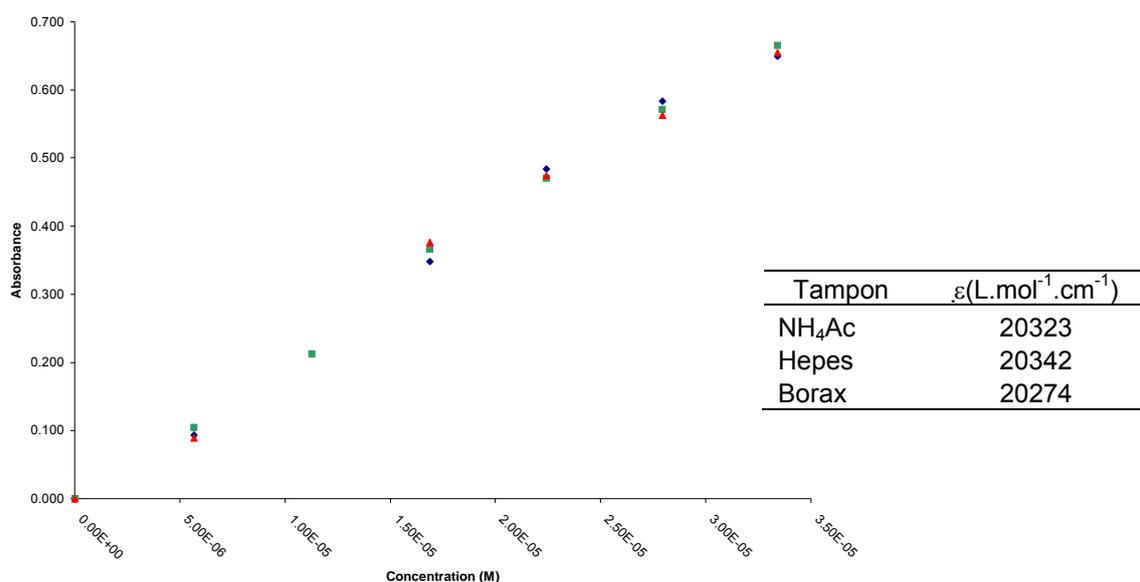


Figure IV.4 : détermination du coefficient d'extinction molaire ε de la sonde fluorescente, mesure de l'absorbance en fonction de la concentration avec les différents tampons : en vert tampon Hepes, en rouge tampon Borax, en bleu tampon AcNH₄. Les coefficients de droite correspondant à ε sont résumés dans le tableau en fonction des tampons.

Finalement la concentration de sonde greffée aux liposomes en solution est déterminée en utilisant la loi de Beer-Lambert avec le ε approprié en mesurant l'absorbance de chaque échantillon à $\lambda = 551$ nm. Cette concentration calculée est comparée à la concentration mesurée d'ancre lipidique incorporée dans les liposomes pour déterminer le rendement de couplage de la réaction. La concentration réelle mesurée d'ancre lipidique présente dans la solution de liposomes est déterminée par un dosage PC. La quantité réelle d'ancre lipidique est déduite de la quantité totale de PC dans un échantillon mesurée par un dosage PC en fonction des proportions des différents lipides composant les liposomes.

1.3.2) Influence de la concentration de l'ancre lipidique dans les liposomes après 24 h de couplage

Les liposomes SUV composés de phospholipides et de cholestérol (PC/PG/Chol 70/30/50 ratio molaire) et contenant de 2,5 à 15 mol % d'ancre lipidique sont préparés dans un tampon Hepes, leur diamètre moyen varie de 45 à 70 nm. La réaction de couplage est stoppée après 24 h de réaction. Une mesure d'absorbance est enregistrée pour déterminer le rendement de couplage de la réaction c'est-à-dire la quantité de sonde fluorescente immobilisée à la surface des liposomes (tab. IV.1). Le rendement de cette réaction de couplage à 24 h est d'environ 100 % pour toutes les concentrations d'ancres lipidiques incorporées dans les liposomes (allant de 2,5 à 15 mol %).

Liposome (% d'ancre)	Absorbance	Ancre lipidique (nmol)	Sonde (nmol)	Rdt. (%)
2.50%	0.385	47.5	48.7	>100
5.00%	0.815	97.6	111.4	>100
7.50%	1.140	148.1	157.7	>100
10.00%	1.503	223	204	91
15.00%	2.201	309	296	96

Tableau IV.1 : rendement de couplage de la réaction entre l'ancre lipidique et la sonde fluorescente

Ces résultats prouvent qu'au bout de 24 h la totalité des fonctions alcynes des ancres lipidiques incorporées dans les liposomes PC/PG/Chol sont disponibles et réagissent avec la sonde fluorescente quelle que soit la quantité allant de 2,5 à 15 % d'ancre lipidique incorporée dans ces liposomes. Soit l'ancre est orientée à l'extérieur du liposome lors de sa formation, soit un phénomène dynamique au niveau de la membrane du liposome permet le transfert de l'ancre lipidique de la membrane intérieur du liposome à la membrane extérieur.

1.3.3) Influence du pH sur la vitesse de réaction de couplage

La réaction de couplage entre l'ancre lipidique et la sonde fluorescente est effectuée à 25 °C protégée de la lumière et sous argon. La réaction est stoppée à différents temps (1, 2, 4, 8 et 24 h) en séparant l'excédant de sonde fluorescente des liposomes par chromatographie d'exclusion stérique.

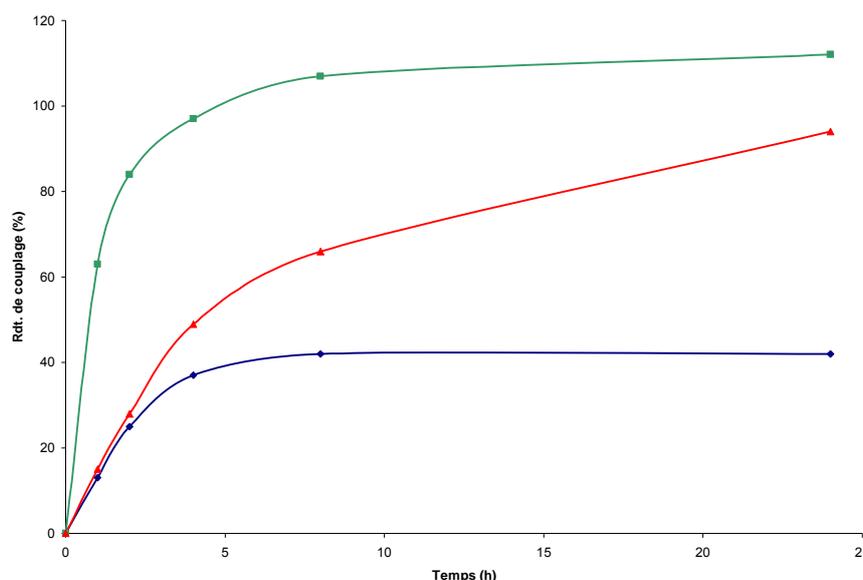


Figure IV.5 : Courbe de la réaction de couplage entre l'ancre lipidique et la sonde fluorescente à différents pH sur 24 h. En vert tampon Hepes à pH = 7,4, en rouge tampon Borax à pH = 9,0 et en bleu tampon AcNH₄ à pH = 4,0.

Les liposomes formés à ces différents pH ont une taille homogène comprise entre 35 et 50 nm de diamètre.

Le rendement maximal et la vitesse de la réaction de couplage varient en fonction du tampon et donc du pH utilisé (fig. IV.5). Le rendement de couplage est déterminé entre la quantité totale mesurée d'ancre lipidique incorporée dans le liposome et la quantité de sonde greffée à ce liposome déterminée par une mesure d'absorbance. Environ huit heures de réaction sont nécessaires pour atteindre un maximum de conversion à pH = 7,4 et à pH = 4,0. Le rendement maximum atteint est de 100 % à pH = 7,4 mais seulement de 40 % à pH = 4,0. En tampon Borax à pH = 9,0, la réaction de couplage est plus lente, le maximum

de conversion n'est pas atteint au bout de 24 h de réaction mais le rendement de couplage est de 94 % tout de même.

Nous avons donc développé une méthode pH-indépendante pour post-fonctionnaliser les liposomes via une réaction de "Click Chemistry" sans cuivre. Le pH et le tampon optimal de cette réaction de couplage en termes de rendement et de vitesse de réaction est le tampon Hepes pH = 7,4, mais la réaction de couplage est aussi possible à différents pH comme pH = 9,0 et pH = 4,0. La baisse de rendement observé de la réaction de couplage n'est pas forcément due uniquement à la réaction de "Click" en elle-même mais peut aussi provenir de la structure et de la dynamique des liposomes formés à ces différents pH.

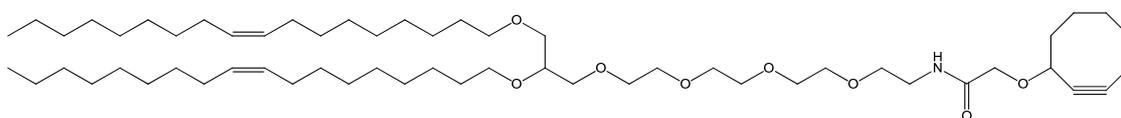
Ce nouveau mode de fonctionnalisation des liposomes apporte plusieurs avantages à la communauté scientifique : il est spécifique (les fonctionnalités alcyne et azoture sont inexistantes dans le monde du vivant), non toxique (pas besoin de catalyseur, pas de résidu de réaction et le produit de couplage est aussi non toxique) et robuste (non sensible aux variations de pH et stabilité chimique des réactifs ainsi que du produit de couplage). Cette nouvelle méthode de bioconjugaison n'as donc pas besoin d'un environnement spécifique pour être réalisée. Ces travaux font l'objet d'un manuscrit en cours de rédaction¹¹³.

¹¹³ B. Hilbold, L. Bourel-Bonnet, B. Frisch. Copper-free click Chemistry on Liposomes: a pH-independent Way of Coupling. Manuscript in progress.

1.4. Partie expérimentale

Les indications générales sur les solvants et réactifs ainsi que sur le matériel et méthode utilisés sont les mêmes que précédemment (chap. II.4 pour la chimie et chap. III.4 pour la biologie) sauf précisions apportées ci-dessous.

Synthèse du dioléylglycéro-éthoxy-éthoxy-éthanamide cyclooct-1-yn-3-glycole (Ancre DOGPEG₄Cyclooctyne)



A une solution d'acide cyclooct-1-yn-3-glycolique (20 mg – 0,109 mmol) dans 2 mL de CH₂Cl₂ anhydre est ajoutée de la DIEA (68 mg – 0,540 mmol) et du PyBOP (68 mg – 0,130 mmol). La solution résultante est agitée pendant 10 min à température ambiante pour l'activation de l'acide. Puis du **DOGPEG₄NH₂** (100 mg – 0,130 mmol) solubilisé dans 2 mL de CH₂Cl₂ anhydre y est ajouté. La solution est agitée à température ambiante pendant 12h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'élution CH₂Cl₂/MeOH 100/0 à 100/5 v/v) pour conduire au produit **DOGPEG₄Cyclooctyne** obtenu sous la forme d'une huile jaune (55 mg – Rdt : 55 %).

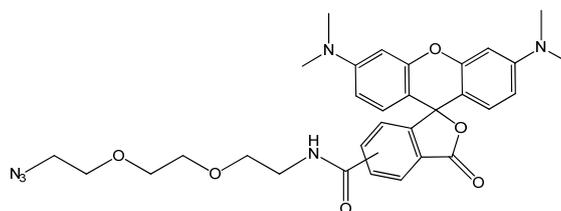
CCM : R_f = 0,8 (CH₂Cl₂/MeOH 9,5/0,5).

RMN ¹H (400 MHz ; CDCl₃) δ = 5,34 (m, 4H), 4,23 (m, 1H), 4,05 (d, 1H, J = 15,3 Hz), 3,86 (d, 1H, J = 15,3 Hz), 3,65-3,40 (m, 23H), 2,72-1,25 (10H + 56 H), 0,87 (t, 6H, J = 7,0 Hz).

RMN ^{13}C (50 MHz ; CDCl_3) δ = 170,3, 130,9, 130,5, 102,2, 91,9, 78,5, 73,7, 72,3, 72,0, 71,5, 71,2, 70,9, 69,0, 42,8, 39,2, 34,9, 33,3, 32,6, 30,7, 30,4, 30,3, 30,2, 29,9, 27,9, 26,9, 26,8, 23,3, 21,3, 14,8.

Masse : m/z = 954,7738 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, masse calculée = 931,7840 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Synthèse du 2-(2-(2-azidoéthoxy)éthoxy)éthanamide carboxytétraméthyl rhodamine ($\text{N}_3\text{PEG}_3\text{CTMR}$)



$\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_6$; PM : 586,6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

A une solution de 5,6-CTMR (30 mg – 0,070 mmol) dans 3 mL de CH_2Cl_2 anhydre est ajoutée de la DIEA (44 mg – 0,348 mmol) et du PyBOP (44 mg – 0,084 mmol). La solution résultante est agitée pendant 10 min à température ambiante pour l'activation de l'acide. Puis du $\text{N}_3\text{PEG}_3\text{NH}_2$ (13 mg – 0,077 mmol) solubilisé dans 3 mL de CH_2Cl_2 anhydre y est ajouté. La solution est agitée à température ambiante pendant 12h protégée de la lumière. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'élution $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 100/0 à 100/20 v/v) pour conduire au produit $\text{N}_3\text{PEG}_3\text{CTMR}$ obtenu sous la forme d'un solide violet (23 mg – Rdt : 56 %).

CCM : R_f = 0,3 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1).

Masse : m/z = 587,2618 $[\text{M}+\text{H}]^+$, masse calculée = 586,2539 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Préparation des liposomes

Les liposomes sont préparés en mélangeant les phospholipides (PC, PG) et le cholestérol (70/30/50 ratio molaire) solubilisé dans du chloroforme avec la

quantité appropriée d'ancre DOGPEG₄Cyclooctyne (de 0 à 15 mol %). Après avoir évaporé le solvant sous pression réduite pendant 45 min, le film lipidique résultant est hydraté par 1 mL de tampon. Le film lipidique est décollé grâce à un passage au vortex (minimum 5 min). Cette solution formée est soniquée à 25 °C pendant 45 min sous argon avec une sonde à ultra-sons de 3 mm (Vibra Cell, Sonics and Material Inc., Danbury, CT, USA) à 300 W. La suspension de SUV (Small Unilamellar Vesicles) est centrifugée pendant 10 min pour enlever les particules de titane originaires de la sonde. Les liposomes blancs sont uniquement composés de PC/PG/Chol (70/30/50 ratio molaire) en absence d'ancre DOGPEG₄Cyclooctyne.

Mesure des tailles des SUV

La distribution des tailles des particules est mesurée par la méthode de diffusion dynamique de la lumière, utilisant un Nano ZS (Malvern Instrumentation, Inc. Orsay, France) avec un angle de détection de 173°. La mesure est effectuée à 25 °C et en intensité. Chaque échantillon pour la mesure est dilué dans le tampon approprié : 20 µL d'une solution de liposomes à 10 mM dans 980 µL de tampon.

Dosage PC

La quantité exacte de PC dans les liposomes est vérifiée par un dosage enzymatique en utilisant un kit de dosage commercial (AssayTM Phospholipid, Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany). 5 ou 10 µL de solution de liposomes sont distribués en triplicat dans une microplaque de 96 puits avant d'ajouter 250 µL de la solution de phospholipide B préparée comme décrit par le fabricant. La plaque est incubée à 37 °C pendant 10 min. Une couleur bleue apparaît en présence de choline, à cause de la formation du complexe de phénol-4-aminoantipyrine. Une solution de chlorure de choline est utilisée pour effectuer la courbe d'étalonnage. L'absorbance de chaque puits est mesurée à $\lambda = 595$ nm

par un lecteur de microplaques (Bio-Rad, model 550, Marnes-La-Coquette, France).

Mesure d'absorbance

Les mesures d'absorbance sont effectuées sur un spectromètre de type UVIKON_{XL} (BIO-TEK instruments) à $\lambda = 551$ nm dans une cuve en quartz. L'absorbance résiduelle des liposomes blancs est soustraite des absorbances enregistrées des solutions de liposomes contenant l'ancre DOGPEG₄Cyclooctyne et la sonde fluorescente.

Couplage de la sonde Azoture-CTMR aux liposomes par "Click Chemistry" sans cuivre

A une suspension de liposomes fonctionnalisés par l'ancre DOGPEG₄Cyclooctyne dans le tampon approprié est ajoutée la sonde Azoture-CTMR solubilisée dans l'eau. (1/2 ancre alcyne/sonde Azoture-CTMR ratio molaire). La solution résultante est agitée sous argon à 25 °C et protégée de la lumière. Après l'étape de couplage, la sonde Azoture-CTMR n'ayant pas réagi est enlevée par chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne Sephadex G-100 de 1 x 20 cm. La colonne est équilibrée (2 x 25 mL) par le même tampon utilisé lors de l'étape de couplage.

2. Synthèse de dérivés fluorescents de type diacylglycérole

2.1. Introduction

La conception et la synthèse de deux dérivés fluorescents de type diacylglycérole (DAG) (fig. IV.6 **A** et **B**) ont été réalisées pour le développement d'une nouvelle approche *in vitro* consistant à l'étude des mécanismes de fission membranaire des vésicules couvertes par le manteau *COPI*.

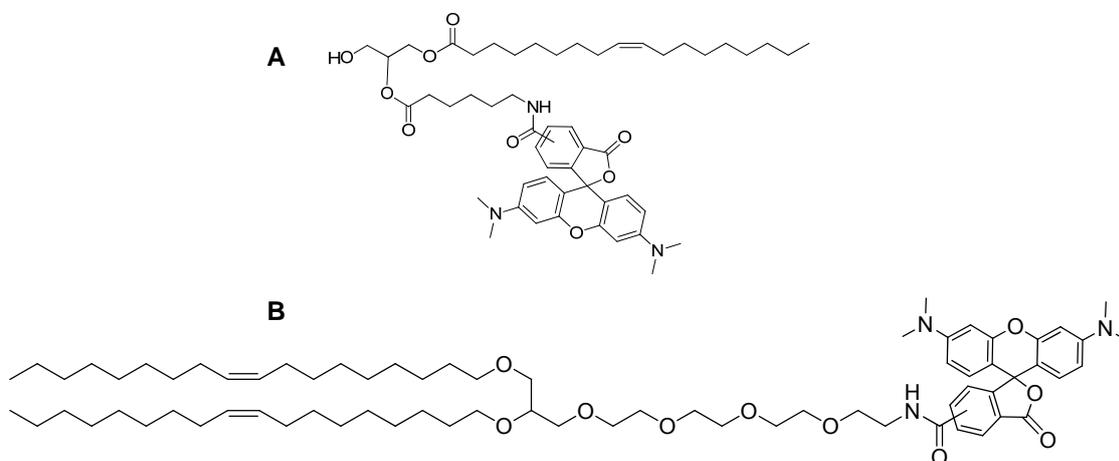


Figure IV.6 : **A** oléate de 2-((6-rhodamineamidohexanoyl)oxy)-3-hydroxypropyl, **B** dioléylglycéro-éthoxy-éthoxy-éthanamide carboxytétraméthylrhodamine

Ces vésicules sont responsables du transport rétrograde de l'appareil de Golgi vers le réticulum endoplasmique (RE) et du transport intra-Golgi. Ces vésicules sont formées à partir de la membrane de l'appareil de Golgi et contiennent des lipides et des protéines.

La fission de ces vésicules à partir des membranes de l'appareil de Golgi est encore mal comprise mais il semble que les lipides et notamment les DAGs jouent un rôle important lors de cette fission. Le manteau *COPI*, permettant le bourgeonnement de ces vésicules, se lie à la membrane de l'appareil de Golgi par activation d'une petite protéine G Arf1 (fig. IV.7 1 et 2). Puis une autre protéine ArfGAP1 inactive Arf1 lors du bourgeonnement dans la zone de

courbure positive en s'insérant dans la membrane via son domaine ALPS (Amphipatic Lipid Packing Sensing). Celui-ci se replie en hélice amphipatique en présence d'une densité élevée en défauts de 'packing' des lipides, induite par exemple par une forte courbure membranaire¹¹⁴ (fig. IV.7 3) pour s'insérer dans la membrane. Après fission membranaire, ArfGAP1 provoque la dépolymérisation du manteau (fig. IV.7 4). Il a été également montré que les DAGs (lipides de courbure spontanée fortement négative) augmentent l'activité d'ArfGAP1 et participent à la fission des vésicules COPI *in vivo*¹¹⁵.

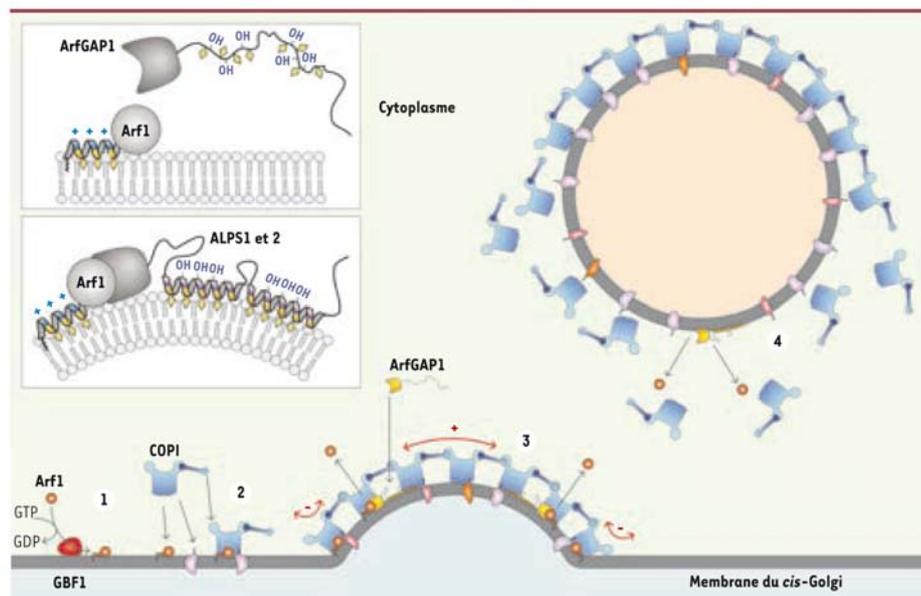


Figure IV.7 : bourgeonnement d'une vésicule couverte du manteau COPI et désassemblage du manteau d'après Bigay et al¹¹⁴.

L'équipe de Dr. J. B. Manneville du CNRS-Institut Curie (UMR 144) à Paris a commencé à étudier la liaison des protéines du manteau COPI (notamment ArfGAP1) à la membrane de vésicules géantes contenant des DAGs et sur des

¹¹⁴ J. Bigay, J. F. Casella, G. Drin, B. Mesmin, B. Antony (2005). ArfGAP1 respond to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. The EMBO Journal, 24, 2244-2253

¹¹⁵ I. Fernández-Ulibarri, M. Vilella, F. Lázaro-Diéguez, E. Sarri, S. E. Martínez, N. Jiménez, E. Claro, I. Mérida, K. N. J. Burger, G. Egea.(2007). Diacylglycerol Is Required for the Formation of COPI Vesicles in the Golgi-to-ER Transport Pathway. Molecular Biology of the Cell, 18, 3250-3263

nanotubes lipidiques tirés à partir de ces vésicules à l'aide de moteurs moléculaires kinésine¹¹⁶. La présence de 1,2-dioléylglycérol (DOG) augmente fortement la liaison d'ArfGAP1. C'est la forme conique des DOGs, le volume de la tête hydrophile étant largement inférieur à celui du volume des chaînes aliphatiques hydrophobes situées dans la partie interne de la membrane, créant des défauts de "packing" c'est-à-dire un espacement entre les têtes hydrophiles et favorisant l'insertion des domaines ALPS d'ArfGAP1 dans les membranes (fig. IV.7, vignette).

2.2. Résultats et discussion

La synthèse de dioléylglycéro-éthoxy-éthoxy-éthanamide carboxytétraméthylrhodamine (DOGPEG₄Rho) a été effectuée en une étape à partir de la 5,6-CTMR et du DOGPEG₄NH₂ synthétisé au laboratoire via un couplage peptidique (fig. IV.8).

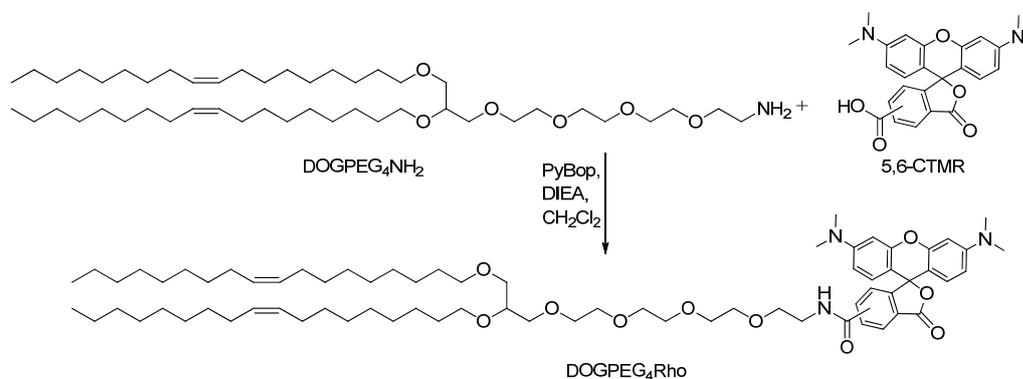


Figure IV.8 : schéma de la synthèse du DAG fluorescent

Dans un premier temps l'acide 5,6-CTMR est activé par du PyBOP en présence de DIEA puis celui-ci réagit sur l'amine du DOGPEG₄NH₂ via une addition nucléophile. Le DAG est obtenu sous la forme d'un solide violet avec un rendement isolé de 50 %.

¹¹⁶ M. Pinot, B. Goud, J. B. Manneville (2010). Physical aspects of COPI vesicle formation. *Molecular Membrane Biology*, 27, 428-442

La synthèse de l'ester 2-((6-rhodamineamidohexanoyl)oxy)-3-hydroxypropyl oléate **6** a été réalisée en 6 étapes à partir du Solketal[®] et de l'acide oléique commerciaux (fig. IV.9).

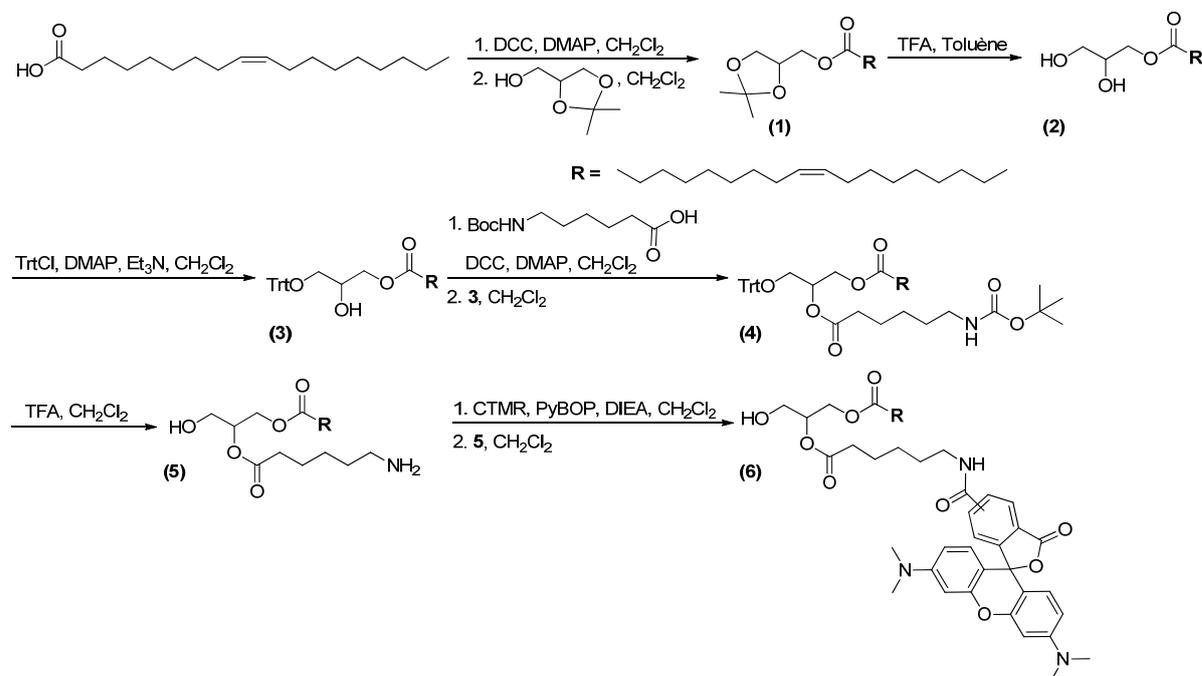


Figure IV.9 : schéma de la synthèse du DAG fluorescent (**6**)

Cette synthèse a commencé par l'estérification du groupement hydroxyle libre par de l'acide oléique pour conduire au produit **1** sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 83%. Cette estérification a été suivie d'une déprotection de l'acétal par acidolyse en milieu acide (TFA) dans du toluène pour libérer les deux fonctions hydroxyles du glycérol conduisant au produit **2**. Cette réaction est quasi quantitative et le produit obtenu n'a pas nécessité de purification pour son utilisation à l'étape suivante.

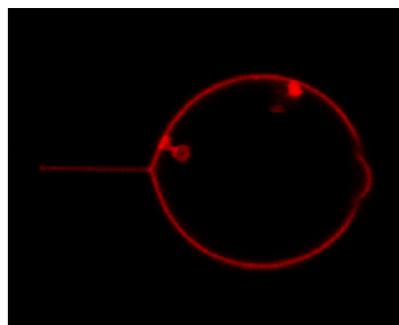
L'alcool primaire libre du glycérol a ensuite été protégé sélectivement par du chlorure de triphénylméthyle pour conduire au produit **3** sous la forme d'une huile incolore avec un bon rendement (89 %). Puis la fonction hydroxyle secondaire restante a été estérifiée par de l'acide 6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)hexanoïque pour former le produit **4**.

Pour finir la molécule **4** a été complètement déprotégée en milieu acide (TFA). Le rendement de cette étape est quasi quantitatif. La dernière étape a été le couplage de la 5,6-CTMR sur l'amine primaire libre de la molécule **5** par une liaison amide. Pour ce faire, le groupement acide carboxylique de la 5,6-CTMR a été préalablement activée par le PyBOP en milieu basique (DIEA) avant de réagir sur l'amine libre via une réaction d'addition nucléophile pour conduire au produit final **6** sous la forme d'un solide violet.

La synthèse de ce DAG fluorescent **6** a nécessité 6 étapes pour un rendement global isolé de 22 %.

Les deux molécules synthétisées ont été conçues pour quantifier et localiser précisément le DOG incorporé dans des GUVs (Giant Unilamellar Vesicles) par fluorescence. La contrainte majeure pour le développement de ces molécules est qu'elle doit conserver au maximum la forme géométrique conique et les propriétés hydrophobes du DOG pour qu'elle se comporte comme telle. C'est pour cela que deux molécules ont été synthétisées : l'une avec le fluorophore au niveau de la tête polaire du DOG (fig. IV.6 **B**) pour ne pas modifier la géométrie de la partie hydrophobe de celui-ci, et l'autre où le fluorophore est intégré à une des chaînes grasses du DOG (fig. IV.6 **A**) pour ne pas gêner les interactions possibles avec la tête polaire du DOG. Seule la molécule **A** a été utilisée et incorporée aux GUVs avec succès comme on peut l'observer sur la figure IV.10.

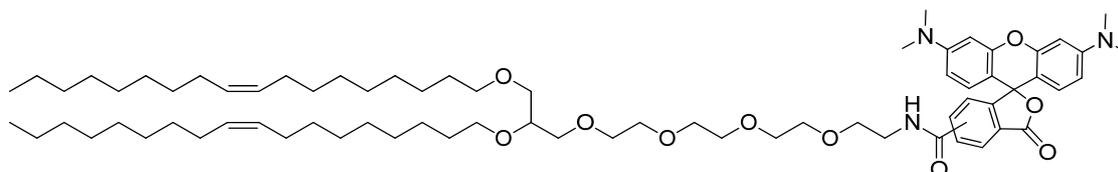
Figure IV.10 : Vésicule géante contenant 5% de DOG fluorescent (composé **A**), résultat apporté par Mathieu Pinot et Katharina Henneberg dans l'équipe du Dr. J. B. Manneville.



2.3. Partie expérimentale

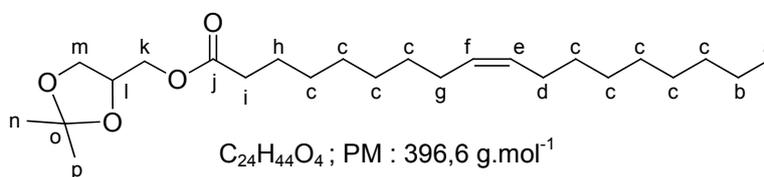
Les indications générales sur les solvants et réactifs ainsi que sur le matériel et méthode utilisés sont les mêmes que précédemment (chap. II.4).

Synthèse du dioléylglycéro-éthoxy-éthoxy-éthanamide carboxytétraméthyl rhodamine (DOGPEG₄Rho)



De la 5,6-CTMR (22 mg- 0,051 mmol) est dissous dans 2 mL de CH_2Cl_2 . De la DIEA (24,4 mg – 0,195 mmol) et le PyBOP (31 mg – 0,058 mmol) sont ajoutés à la solution. Après 10 min d'agitation à température ambiante, **DOGPEGNH₂** (30 mg – 0,039 mmol) préalablement dissous dans 2 mL de CH_2Cl_2 est ajouté au milieu réactionnel. La solution est agitée à température ambiante et sous argon pendant 12 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'éluion $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 100/0 à 100/5 v/v) pour conduire au produit **DOGPEG₄Rho** obtenu sous la forme d'un solide violet (23 mg – Rdt : 50 %).

Synthèse de l'ester (2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yl)méthyl oléate (1)



De l'acide oléique (1,5 g – 5,31 mmol) est dissous dans 10 mL de CH_2Cl_2 anhydre et du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (1,2 g – 5,84 mmol) y est ajouté. Le milieu réactionnel résultant est agité sous argon pendant 10 min à

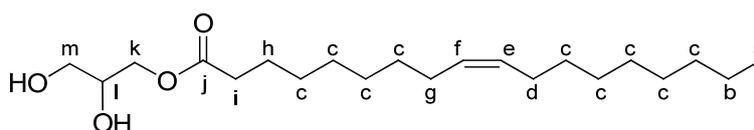
température ambiante. Du Solketal (912 mg – 6,90 mmol) dissous dans 10 mL de CH_2Cl_2 et de la DMAP (64 mg – 0,53 mmol) sont ensuite ajoutés à la solution. La réaction se poursuit sous agitation et à température ambiante pendant 6h. La phase organique est ensuite lavée avec une solution de NaHCO_3 saturée (2 fois 30 ml) et avec de la saumure (1 fois 30 mL) puis la phase aqueuse est extraite avec CH_2Cl_2 (1 fois 50 ml). Les deux phases organiques collectées sont séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'éluion $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 100/0 à 100/10 v/v) pour conduire au produit **1** obtenu sous la forme d'une huile incolore (1,75 g – Rdt : 83 %).

CCM : $R_f = 0,9$ (Cyclohexane/AcOEt 8/2 v/v).

RMN ^1H (300 MHz ; CDCl_3) $\delta = 5,33$ (m, 2H_{e+f}), $4,30$ (m, 1H_m), $4,15$ (m, 1H_m), $4,07$ (m, 2H_k), $3,72$ (m, 1H_i), $2,33$ (t, 2H_i , $J = 7,5$), $2,00$ (m, 4H_{g+d}), $1,62$ (m, 2H_h), $1,42$ (s, 3H_n), $1,36$ (s, 3H_p), $1,32$ - $1,25$ (m, 20H_{b+c}), $0,87$ (t, 3H_a , $J = 6,9$).

RMN ^{13}C (75 MHz ; CDCl_3) $\delta = 174,2$ (C_j), $130,6$ (C_f), $130,4$ (C_e), $110,4$ (C_o), $74,3$ (C_i), $67,0$ (C_m), $65,2$ (C_k), $34,7$ (C_i), $32,6$ (C_c), 30 (m, 5 pics, C_c), $27,8$ (C_g), $27,3$ (C_d), $26,0$ (C_{n+p}), $25,5$ (C_h), $23,3$ (C_b), $14,7$ (C_a).

Synthèse de l'ester 2,3-dihydroxypropyl oléate (2)



1 (500 mg – 1,26 mmol) est dissous dans 10 mL de THF et de l'acide trifluoroacétique (2 mL) et de l'eau (200 μL) y sont ajoutés. Le milieu réactionnel résultant est chauffé à 60°C (ballon ouvert : évacuation de l'acétone formée) et agité pendant 3 h. La solution est ensuite neutralisée avec de l'hydroxyde d'ammonium (solution à 30%) puis la phase organique est lavée avec une solution de NaHCO_3 saturée (2 fois 10 ml) et avec de la saumure (1 fois 15 mL).

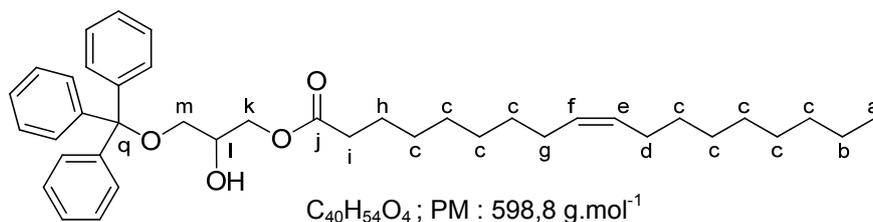
La phase aqueuse est extraite avec CH_2Cl_2 (1 fois 50 ml). Les deux phases organiques collectées sont séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu **2** obtenu est obtenu sous la forme d'une huile incolore et est utilisé sans purification supplémentaire (442 mg – Rdt : 98 %).

CCM : Rf = 0,3 (Cyclohexane/AcOEt 8/2 v/v).

RMN ^1H (300 MHz ; CDCl_3) δ = 5,33 (m, 2H_{e+f}), 4,14 (m, 2H_m), 3,91 (m, 1H_l), 3,68 (dd, 1H_k , $J = 11,4, 3,9$), 3,57 (dd, 1H_k , $J = 11,4, 6,0$), 2,33 (t, 2H_i , $J = 7,5$), 2,00 (m, 4H_{g+d}), 1,61 (m, 2H_h), 1,32-1,25 (m, 20H_{c+b}), 0,87 (t, 3H_a , $J = 6,9$).

RMN ^{13}C (75 MHz ; CDCl_3) δ = 174,9 (C_j), 130,6 (C_f), 130,3 (C_e), 70,8 (C_l), 65,7 (C_k), 64,0 (C_m), 34,8 (C_i), 32,5 (C_c), 30 (m, 5 pics, C_c), 27,8 (C_{g+d}), 25,5 (C_h), 23,3 (C_b), 14,7 (C_a).

Synthèse de l'ester 2-hydroxy-3-(trityloxy)propyl oléate (**3**)

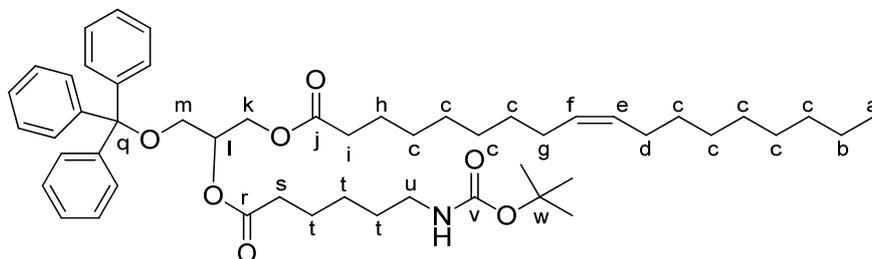


2 (400 mg – 1,12 mmol) est dissous dans 10 mL de CH_2Cl_2 anhydre et de la pyridine (195 mg – 2,46 mmol) et du triphénylchloromethane (625 mg – 2,24 mmol) y sont ajoutés. Le milieu réactionnel résultant est agité pendant 24 h sous argon. Le précipité blanc formé est filtré et la phase organique est lavée avec une solution de NaHCO_3 saturée (2 fois 10 ml) et avec de la saumure (1 fois 15 mL). La phase aqueuse est extraite avec CH_2Cl_2 (1 fois 50 ml). Les deux phases organiques collectées sont séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'élution $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 100/0 à 100/1 v/v) pour conduire au produit **3** obtenu sous la forme d'une huile incolore (597 mg – Rdt : 89 %).

RMN ^1H (300 MHz ; CDCl_3) δ = 7,43 (m, 6 H_{ar}), 7,30 (m, 9 H_{ar}), 5,36 (m, 2 $\text{H}_{\text{e+f}}$), 4,19 (m, 2 H_{k}), 4,00 (m, 1 H_{l}), 3,22 (m, 2 H_{m}), 2,87 (t, 2 H_{i} , J = 7,5), 2,01 (m, 4 $\text{H}_{\text{g+d}}$), 1,59 (m, 2 H_{h}), 1,32-1,25 (m, 20 $\text{H}_{\text{b+c}}$), 0,89 (t, 3 H_{a} , J = 6,9).

RMN ^{13}C (75 MHz ; CDCl_3) δ = 174,6 (C_{j}), 144,3 (C_{ar}), 130,7 (C_{f}), 130,4 (C_{e}), 129,3 (C_{ar}), 128,6 (C_{ar}), 127,9 (C_{ar}), 87,5 (C_{q}), 70,0 (C_{l}), 66,3 (C_{m}), 64,9 (C_{k}), 34,8 (C_{i}), 32,6 (C_{c}), 30 (m, 5 pics, C_{c}), 27,9 ($\text{C}_{\text{g+d}}$), 25,5 (C_{h}), 23,4 (C_{b}), 14,7 (C_{a}).

Synthèse du diester de 2-((6-((tert-butoxycarbonyl)amino)hexanoyl)oxy)-3-(trityloxy) propyl oléate (4)

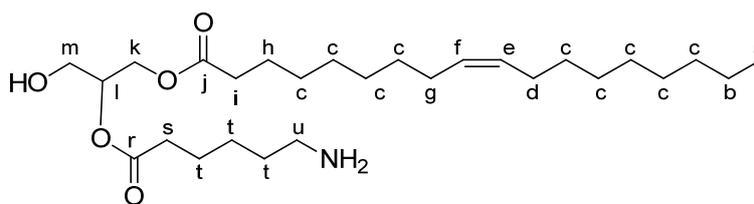


3 (300 mg – 0,50 mmol) est dissous dans 7 mL de CH_2Cl_2 anhydre et du DCC (165 mg – 0,80 mmol) y est ajouté. Le milieu réactionnel résultant est agité sous argon pendant 10 min à température ambiante. De l'acide Boc-6-aminohexanoïque (173 mg – 0,75 mmol) dissous dans 7 mL de CH_2Cl_2 et de la DMAP (12,2 mg – 0,10 mmol) sont ensuite ajoutés à la solution. La réaction se poursuit sous agitation et à température ambiante pendant 12 h. Le DCU formé est filtré. La phase organique est ensuite lavée avec une solution de NaHCO_3 saturée (2 fois 30 ml) et avec de la saumure (1 fois 30 mL) puis la phase aqueuse est extraite avec CH_2Cl_2 (1 fois 50 ml). Les deux phases organiques collectées sont séchées sur MgSO_4 et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 100/1 v/v) pour conduire au produit **4** obtenu sous la forme d'une huile incolore (298 mg – Rdt : 73 %).

RMN ^1H (300 MHz ; CDCl_3) δ = 7,43 (m, 6 H_{ar}), 7,30 (m, 9 H_{ar}), 5,36 (m, 2 $\text{H}_{\text{e+f}}$), 5,26 (m, 1 H_{i}), 4,37 (dd, 1 H_{k} , J = 11,8, 3,7), 4,54 (s, 1 H_{NH}), 4,24 (dd, 1 H_{k} , J = 11,8, 6,6), 3,24 (m, 2 H_{m}), 3,10 (m, 2H), 2,35 (t, 2H, J = 7,5), 2,24 (t, 2H, J = 7,5), 2,02 (m, 4 $\text{H}_{\text{g+d}}$), 1,67 (m, 4H), 1,56 (m, 2H), 1,49 (m, 2H), 1,45 (s, 9 H_{tbu}), 1,32-1,25 (m, 24 $\text{H}_{\text{b+c}}$), 0,89 (t, 3 H_{a} , J = 6,9).

RMN ^{13}C (75 MHz ; CDCl_3) δ = 174,0 (C_{j}), 173,4 (C_{r}), 156,6 (C_{v}), 144,2 (C_{ar}), 130,7 (C_{f}), 130,4 (C_{e}), 129,3 (C_{ar}), 128,5 (C_{ar}), 127,8 (C_{ar}), 87,3 (C_{q}), 79,7 (C_{w}), 71,2 (C_{i}), 63,4 (C_{m}), 62,8 (C_{k}), 41,0 (C_{u}), 34,8 (C_{i}), 34,7 (C_{s}), 32,6 (C_{c}), 30 (m, 5 pics, C_{c}), 29,1 (C_{tbu}), 27,9 ($\text{C}_{\text{g+d}}$), 25,5 (C_{h}), 25,2 (C_{t}), 23,4 (C_{b}), 14,7 (C_{a}).

Synthèse du diester de 2-((6-aminohexanoyl)oxy)-3-hydroxypropyl oléate (5)



$\text{C}_{27}\text{H}_{51}\text{NO}_5$; PM : 469,7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

4 (200 mg – 0,25 mmol) est dissous dans 6 mL d'une solution de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ 50/50 v/v. La solution est agitée à température ambiante pendant 2 h. Du toluène (10 mL) y est ajouté et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'éluion $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$ 100/2/1 à 100/14/1 v/v) pour conduire au produit **5** obtenu sous la forme d'une huile légèrement jaune (112 mg – Rdt : 95 %).

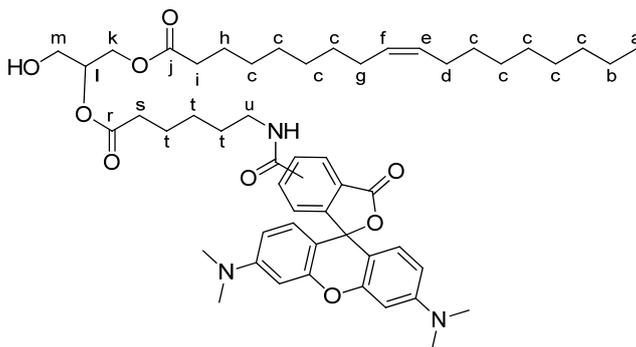
CCM : R_f = 0,5 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1 v/v).

RMN ^1H (400 MHz ; CDCl_3) δ = 5,33 (m, 2 $\text{H}_{\text{e+f}}$), 4,35-4,04 (m, 4H), 3,70 (m, 1 H_{i}), 2,80 (s, 3 $\text{H}_{\text{OH+NH}_2}$), 2,73 (m, 2H), 2,35 (m, 4H), 2,01 (m, 4H), 1,64 (m, 4H), 1,49 (m, 2H), 1,42-1,25 (m, 22 H_{c}), 0,87 (t, 3 H_{a} , J = 6,9).

RMN ^{13}C (100 MHz ; CDCl_3) δ = 174,5 (C_j), 174,3 (C_r), 130,7 (C_f), 130,4 (C_e), 68,5 (C_l), 66,0 (C_m), 65,7 (C_k), 42,0 (C_u), 34,8 (C_i), 34,6 (C_s), 32,6 (C_c), 30 (m, 5 pics, C_c), 27,9 (C_{g+d}), 25,5 (C_h), 25,2 (C_t), 23,4 (C_b), 14,8 (C_a).

Masse : m/z = 470,3861 $[\text{M}+\text{H}]^+$, masse calculée = 470,3845 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Synthèse de l'ester 2-((6-rhodamineamido)hexanoyl)oxy)-3-hydroxypropyl oléate (6)



$\text{C}_{53}\text{H}_{73}\text{N}_3\text{O}_9$; PM : 896,2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

36 mg de 5,6 carboxytétraméthylrhodamine (5,6-CTMR) (0,083 mmol) sont dissous dans 3 mL de CH_2Cl_2 . De la DIEA (40 mg – 0,319 mmol) et le PyBOP (50 mg – 0,096 mmol) sont ajoutés à la solution. Après 10 min d'agitation à température ambiante, **5** (30 mg – 0,064 mmol) préalablement dissous dans 3 mL de CH_2Cl_2 est ajouté au milieu réactionnel. La solution est agitée à température ambiante et sous argon pendant 24 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (gradient d'élution $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 100/0 à 100/12 v/v) pour conduire au produit **6** obtenu sous la forme d'un solide violet (25 mg – Rdt : 44 %).

Masse : m/z = 896,5457 $[\text{M}+\text{H}]^+$, masse calculée = 895,5346 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

HPLC : Tr = 5,2 min (Colonne C_8 1 mm X 3 cm, débit : 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)

***V. Conclusion générale et
perspectives***

Le but de mon travail de thèse était de concevoir et de mettre en place une nouvelle méthodologie pour identifier des zones hydrophobes de protéines membranaires et plus particulièrement pour identifier le peptide de fusion de virus enveloppés. L'identification de ce peptide de fusion permettrait une meilleure compréhension d'une étape précoce de l'infection virale : l'étape d'entrée du virus dans la cellule hôte. La compréhension de ce phénomène est cruciale pour le développement de nouvelles thérapies pour lutter contre l'infection virale.

Pour pouvoir étudier les interactions protéines/lipides, une nouvelle famille de composés multifonctionnels lipidiques ayant la capacité de réaliser du photomarquage d'affinité hydrophobe a été développée.

Une première partie de ce travail de thèse correspond donc au développement et à la synthèse de molécules lipidiques bicaténaires polyfonctionnelles. La synthèse optimisée de différentes sondes lipidiques, différant par la position du groupement photoactivable intégré à une chaîne grasse, par leur squelette et par leur traceur a été réalisée avec succès.

Dans une seconde partie, la fluorescence et la capacité de photomarquage de cette famille de sondes lipidiques ont été vérifiées dans des conditions drastiques. Les sondes lipidiques synthétisées ont montré leur robustesse dans les conditions opératoires testées. Ensuite un protocole de photomarquage a été mis en place et optimisé sur différentes protéines membranaires hydrophobes. Les résultats obtenus sont à la hauteur des objectifs posés puisque cette nouvelle famille de sondes lipidiques a la capacité de marquer du matériel biologique hydrophobe. Ces résultats font l'objet d'un brevet et d'une publication.

L'étape suivante après le photomarquage est l'identification précise des zones marquées comme par exemple dans le cas d'une protéine, connaître la séquence peptidique où la sonde lipidique s'est accrochée. Plusieurs méthodes d'identification de la zone marquée par spectrométrie de masse ont été développées dans une troisième partie. Malheureusement l'identification et la caractérisation précise du marquage des protéines par ces sondes lipidique fluorescente n'a, pour le moment, pas abouti mais différentes améliorations

apportées au protocole d'identification de zones hydrophobe de protéines sont en cours de développement et ont déjà donné des résultats prometteurs à ce jour. Ces différentes améliorations sont développées dans une quatrième partie. Elles consistent en l'augmentation du rendement de photomarquage en modifiant la source d'irradiation et en augmentant le temps d'irradiation, mais aussi en l'utilisation d'une nouvelle sonde lipidique biotinylée.

Il serait donc intéressant, dans un futur projet de combiner ces dernières améliorations aux techniques de purification de protéines et de spectrométrie de masse développées dans la troisième partie pour identification précisément des zones protéiques hydrophobes.

Enfin, des expériences préliminaires de fusion virale entre des pseudo-particules du virus de l'hépatite C ou entre le virus de l'hépatite B et les sondes lipidiques en liposome pour marquer et caractériser le peptide de fusion de ces entités ont été effectuées et sont en cours de développement.

D'autres projets, en collaboration avec l'équipe du Dr. Pierre Falson (IBCP, Lyon), sont en cours de développement. Ils utilisent les sondes lipidiques fluorescentes comme agent de co-cristallisation pour permettre la cristallisation de la BmrA et résoudre sa structure tridimensionnelle aux rayons X.

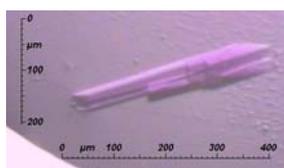


Figure V.1 : image d'un cristal de BmrA cristallisé en présence d'une sonde lipidique fluorescente

Pour finir, les projets secondaires effectués ont permis de développer et de valider des nouvelles stratégies applicables à la compréhension et à l'exploration du monde du vivant. Ces stratégies passent par le développement et la synthèse totale de nouvelles sondes lipidiques multifonctionnelles innovantes.

Les pathogènes comme les virus Lassa, Ebola, de l'Hépatite C ou de l'immunodéficience humaine acquise sont, dans la plupart des cas, mortels et représentent une menace sérieuse pour la santé humaine dans le monde entier.

Ces virus à enveloppe sont difficiles à étudier parce qu'ils doivent être manipulés dans des laboratoires de niveau de sécurité 3 ou 4. Malgré ces difficultés, la compréhension de l'interaction entre les protéines d'enveloppe d'un virus donné et la membrane cellulaire lors de l'étape d'infection de la cellule-cible par le virus est essentielle. La compréhension de cette étape-clés permettra de mieux caractériser ce processus d'infection et permettra d'identifier un procédé d'inhibition de celui-ci à un stade précoce de l'infection. Certaines de ces protéines d'enveloppe, les protéines de fusion virale, sont plus particulièrement impliquées lors de l'étape de fusion virale. Cette étape conduit à la libération du matériel génétique viral dans le cytoplasme de la cellule cible. Deux éléments structurels, communs à toutes les protéines de fusion virale connues, jouent un rôle crucial lors de l'étape de fusion virale : le peptide de fusion virale et le domaine transmembranaire de la protéine de fusion virale. Le peptide de fusion virale est une courte séquence d'acides aminés hydrophobes présents en position N-terminale ou interne à la protéine de fusion virale. La cartographie de ces régions-clés portées par la protéine de fusion virale est donc cruciale pour la compréhension des relations structure/fonction au cours du processus de fusion.

Nous proposons donc une stratégie pour identifier les régions hydrophobes des protéines de fusion virale via un photomarquage covalent d'affinité hydrophobe. Cette stratégie est basée sur l'utilisation de pseudo-particules virales non pathogènes ou de virus comme le virus de l'hépatite B (VHB) comme modèle permettant l'exécution de celle-ci dans un laboratoire de niveau de sécurité 1 ou 2 moins contraignant.

Cette approche repose sur l'utilisation de nouvelles sondes lipidiques contenant un groupement photoactivable et un traceur pour la détection des adduits formés lors de la réaction de marquage.