

Université de Montréal

**Élaboration d'une nouvelle méthode de marquage protéique à l'aide de
molécules fluorogènes**

par

Stéphane Girouard

Département de chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D)
en chimie organique

février 2005

© Stéphane Girouard, 2005



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

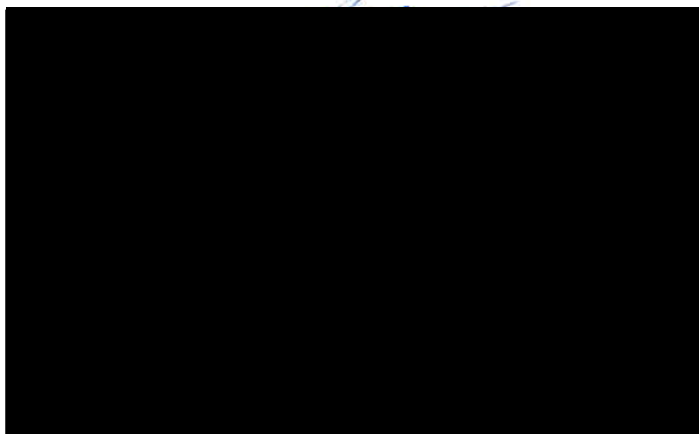
Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Élaboration d'une nouvelle méthode de marquage protéique à l'aide de
molécules fluorogènes**

présentée par :
Stéphane Girouard

a été évaluée par un jury composé des professeurs suivants :



(Département de chimie, Université Laval)

Président-rapporteur

Directeur de recherche

Membre du jury

Examineur externe

Thèse acceptée le : 26 septembre 05

Résumé

Les protéines sont essentielles au maintien de l'homéostasie d'une cellule. Leurs rôles sont extrêmement diversifiés et ce, dans plusieurs processus biologiques. La présente recherche consiste à développer un outil de travail chimie biologique permettant de faire un marquage protéique. Au cours de cet ouvrage, nous avons fabriqué une série de fluorogènes de type bismaléimide à cœur de coumarine ou de naphthalène. Ces maléimides ont la capacité d'être de très puissants atténuateurs de fluorescence. Ils sont également spécifiques à des attaques nucléophiles par des sulfures, ce qui permet alors une émission de fluorescence.

Par la suite, nous avons construit une protéine possédant deux résidus cystéines et reconnue pour sa structure secondaire sous forme d'hélice α (la protéine Fos). Les cystéines ont été introduites par mutagenèse dirigée et positionnées de manière à ce que leur distance soit compatible avec celle qui sépare les maléimides des fluorogènes. Une fois la double liaison cystéine-protéine réalisée, le complexe devient alors fluorescent. Ainsi, une visualisation de l'apposition pourra être réalisée par une étude de fluorescence en cuvette, mais également sur un gel protéique de type SDS-PAGE.

La sélectivité protéique a également été étudiée et s'est avérée être très efficace. Pour ce faire, des études ont été menées sur un lysat cellulaire. Bien qu'il soit peu commun de retrouver des sulfures exposés à la surface des protéines (généralement à l'intérieur de ceux-ci pour former des ponts disulfures) et encore plus rare de retrouver deux sulfures de distance analogue au fluorogène, cette étude était essentielle pour s'assurer de la validité de la technique développée.

En dernier lieu, des études *in vivo* ont été effectuées (chez les cellules eucaryotes) et ont démontrées que les sondes fluorogènes ont vraiment le potentiel de devenir un nouvel outil biochimique.

Summary

Proteins are essential for cells survival. Their roles are extremely diversified and implicated in many biological pathways. The main objective of this research is to develop a biochemical tool for protein labelling. Firstly, we have built some bismaleimide fluorogenic compounds with a coumarine or naphthalene core. Maleimides groups are able to quench fluorescence efficiently. Furthermore, they are specific to thiol attack. After their reaction, fluorescence is restored.

Secondly, we have built an α -helix protein (based on Fos) with two cysteine residues. They were introduced by site-directed mutagenesis at positions chosen to be complementary to the maleimide groups of the fluorogenic compounds. When the double thiol addition reaction is complete, the complex becomes fluorescent and its visualisation is possible by gel electrophoresis.

Protein selectivity was also studied and the results were very encouraging. Studies were done on cellular lysate. Even though it is rare to find cysteine residues exposed at the surface of a protein (generally these amino acids are found inside the structure forming disulfide bounds) and rarer to find two cysteines separated by the exact distance between the maleimide groups of the fluorogenic compounds, these selectivity studies were essential to ensure of the validity of our new technique.

Finally, *in vivo* studies were done in eucaryotic cells and the positive results showed that our fluorogenic compounds have the potential to become a new and powerful biochemical tool.

Keys words: Protein labelling, fluorescent probe, synthesis, molecular biology, cell studies

Mots clés: marquage protéique, sonde fluorescente, synthèse, biologie moléculaire, études cellulaires *in vivo*

Table des matières

RÉSUMÉ	III
SUMMARY	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XVI
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES	XVII
DÉDICACE	XX
REMERCIEMENTS	XXI
CHAPITRE 1; LE MARQUAGE PROTÉIQUE UN OUTIL FORT UTILE... --1	
1.1. GÉNÉRALITÉS: LES CICATRICES DU PASSÉ.....	2
1.2. PRÉSENTATION DES OUTILS DÉJÀ DISPONIBLES POUR UN MARQUAGE PROTÉIQUE 5	
1.3. TRAVAUX ANTÉRIEURS RÉALISÉS AU SEIN DU LABORATOIRE.	13
1.3.1. <i>Choix des structures fluorogènes</i>	13
1.3.2. <i>Réaction avec des thiols.</i>	16
1.3.3. <i>Cinétique de réaction</i>	17
1.4. OBJECTIFS DE RECHERCHE	19
CHAPITRE 2; FLUORESCENCE	23
2. QUELQUES NOTIONS DE FLUORESCENCE.....	24
2.1. DÉFINITION DE LA FLUORESCENCE	24
2.2. DÉPLACEMENT DE STOKES	26
2.3. EFFET D'EXTINCTION DE FLUORESCENCE	27
2.4. ORBITALES MOLÉCULAIRES ET EFFET D'ATTÉNUATION PAR LES MALÉIMIDES --	27

2.5. FACTEURS QUI AUGMENTENT LA FLUORESCENCE D'UN COMPOSÉ	29
---	----

CHAPITRE 3; SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE FLUOROGÈNE À 10 Å

3.1. SYNTHÈSE DU FLUOROPHORE BMC.....	34
3.2. TENTATIVE DE VOIE DE SYNTHÈSE DES BMC-C4R	38
3.2.1. Tentative de synthèse du fluorogène BMC-C4Me	39
3.2.2. Tentative de synthèse du fluorogène BMC-C4OMe	39
3.2.3. Tentative de synthèse du fluorogène BMC-C4N(Et) ₂	40
3.2.4. Analyse des résultats du projet 1 (BMC-C4R)	41
3.3. TENTATIVE DE VOIE DE SYNTHÈSE DU BMC-C8R	42
3.3.1. Voie de synthèse du BMC-C8Ph.....	43
3.3.2. Test de fluorescence du BMC-C8Ph	46
3.4. VOIE DE SYNTHÈSE DES BMC-MR	51
3.4.1. Voie de synthèse du fluorogène BMC-Me.....	51
3.4.2. Voie de synthèse du fluorophogène BMC-OMe	52
3.4.3. Voie de synthèse du fluorophogène BMC-COOMe	53
3.5. ÉTUDE DE FLUORESCENCE DES COMPOSÉS BMC-MR SOIT: 1, 7, 9, 14, 29 ET 36	55
3.6. SYNTHÈSES DE NOUVEAUX FLUOROPHORES PORTANT UN CŒUR DE NAPHTALENE.	57
3.6.1. Voie de synthèse du 1,5-bis maléimidonaphtalène.....	57
3.6.2. Voie de synthèse de l'ester diméthylique de l'acide 2-[5,8-Bis-(2,5-dioxo- 2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-1,3-dioxo-1H,3H benzo[de]isoquinolin-2-yl]-succinique 10	58

CHAPITRE 4; CARACTÉRISATION FLUOROMÉTRIQUE DES FLUOROPHORES 15 ET 41.....

4.1. ÉTUDES DE LA FLUORESCENCE EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE.	62
4.2. ÉTUDES DE LA FLUORESCENCE EN FONCTION DU PH.	64
4.3. CALCUL DU RENDEMENT QUANTIQUÉ	64

CHAPITRE 5; ÉTUDE DE SÉLECTIVITÉ PROTÉIQUE -----	72
5.1. ÉTUDE DE RÉTICULATION PROTÉIQUE NON SPÉCIFIQUE -----	73
5.1.1. <i>Expression et purification de TRXC35A</i> -----	75
5.1.2. <i>Quantification de la protéine TRXC35A</i> -----	77
5.1.3. <i>Test de liaison protéine (TRXC35A) – fluorogène</i> -----	79
5.2. CONCEPTION DES PROTÉINES mCYS-FOS ET diCYS-FOS.-----	81
5.2.1. <i>Biologie moléculaire</i> -----	83
5.2.2. <i>Expression , purification et caractérisation des protéines mCys-Fos et diCys-Fos</i> -----	93
5.2.3. <i>Étude de la fluorescence du complexe fluorophore-protéine (Fos) purifiée.</i> -----	97
5.2.4. <i>Étude du gradient de concentration</i> -----	99
5.2.5. <i>Étude du lysat cellulaire</i> -----	103
CHAPITRE 6; ÉTUDE DU MARQUAGE PROTÉIQUE IN VIVO -----	105
6.1. ÉTUDE DES COMPOSÉS 2 ET 10 SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE DE LA BACTÉRIE XL1-BLEU. -----	106
6.2. ÉTUDES DE CYTOTOXICITÉ DANS LES CELLULES EUCHARYOTES -----	110
6.3. ÉTUDES DE MARQUAGE PROTÉIQUE -----	114
6.4. ÉTUDES DE LOCALISATION CELLULAIRE-----	117
CHAPITRE 7; PROJET FUTUR ET CONCLUSION -----	118
7.1. CONCEPTION D'HÉLICE ALPHA MINIMISÉES POUR REMPLACER LE FOS -----	119
7.2. ÉLABORATION DE NOUVEAUX FLUOROGÈNES -----	121
7.3. ALTERNATIVE PROPOSÉE: AJOUT D'UN ESPACEUR SUR LA STRUCTURE DES FLUOROGÈNES.-----	123
7.3.1. <i>Comportement fluorescent du fluorogène avec espaceur</i> -----	125
7.4. APPLICATION POSSIBLE DE LA TECHNIQUE DU FRET -----	126
7.5. MUTAGENÈSE DIRIGÉE SUR UNE PROTÉINE D'INTÉRÊT SANS GREFFE D' HÉLICE ALPHA -----	130
7.6. CONCLUSION-----	131

CHAPITRE 8; PARTIE EXPÉRIMENTALE	133
8.1. SYNTHÈSE ORGANIQUE	134
3-Acétamido-6-nitro [2H-1-benzopyran-2-one] 16.....	135
3-Acétamido-6-amino [2H-1-benzopyran-2-one] 17.....	136
3,6-Diamino [2H-1-benzopyran-2-one] 12.....	137
3,6-Bis [1H-pyrrole-2,5-dione] 2H-1-benzopyran-2-one 1	138
3,6-Bis[1H-pyrrolidine-2,5-dione-3-thioéthyl]2H-1-benzopyran-2-one 14....	139
2-hydroxy-5-nitroacetophenone 18	140
3-Acétamido-4-méthyl-6-nitro[2H-1-benzopyran-2-one] 19.....	141
5-nitro-méthylsalicylate 20	142
3-Acétamido-4-méthoxy-6-nitro[2H-1-benzopyran-2-one] 21.....	143
N,N-diéthylamido-5-nitrophénol 22.....	144
2-hydroxy-3-phenylbenzaldehyde 23.....	145
2-hydroxy-5-nitro-3-phénylbenzaldéhyde 24.....	146
3-Acétamido-6-nitro-8-phényl [2H-1-benzopyran-2-one] 25.....	147
3-Acetamido-6-amino-8-phenyl [2H-1-benzopyran-2-one] 26.....	148
3,6-diamino-8-phényl [2H-1-benzopyran-2-one] 27.....	149
8-phényl-3,6-Bis [1H-pyrrole-2,4-dione] 2H-1-benzopyran-2-one 6....	150
8-phenyl-3,6-Bis [1H-pyrrolidine-2,5-dione-3-thioéthyl] 2H-1-benzopyran-2-one 28.....	151
3,6-Bis [3-méthyl-1H-pyrrole-2,5-dione.] 2H-1-benzopyran-2-one 7.....	152
3,6-Bis[3-méthyl-1H-pyrrole-4-thioéthyl-2,5-dion]2H-1-benzopyran-2-one 29---	153
Anhydride diacéthyltartarique 30.....	154
Anhydride hydroxymaléique 31.....	155
Anhydride méthoxymaléique 32.....	156
3,6-Bis-[3-méthoxy-1H-pyrrole-2,5-dione]2H-1-benzopyran-2-one 8.....	157
Éthylène tricarboxylate 34.....	158
Anhydride α -carbométhoxyméléique 35.....	159
3,6-Bis-[3-carbométhoxy-1H-pyrrole-2,5-dione]2H-1-benzopyran-2-one 9	

-----	160
3.6-Bis-[3-carbométhoxy-1H-pyrrolodine-4-thioéthyl-2,5-dione]2H-1-benzopyran-2-one 36-----	161
1,5-Bis [1H-pyrrole-2,5-dione]naphthalène 11-----	162
1,5-Bis [1H-pyrrolidine-2,5-dione-3-thioéthyl]naphthalène 37-----	163
5,8-Dinitro-benzo[de]isochromene-1,3-dione 38-----	164
Acide 2-(5,8-Dinitro-1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-succinique dimethyl ester 39-----	165
Acide 2-(5,8-Diamino-1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-succinique dimethyl ester 40-----	166
Acide 2-[5,8-Bis-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-1,3-dioxo-1H,3H benzo[de]isoquinolin-2-yl]-succinique dimethyl ester 10-----	167
Acide 2- [5,8 - Bis-(H- pyrrolidine -2,5- dione -3-thioéthyl) -1,3- dioxo - 1H,3H benzo[de]isoquinolin-2-yl]-succinique dimethyl ester 41-----	169
(1H-pyrrole-2,5-dione)-piperonylamine 42-----	171
(1H - pyrrolidine- 3 - (acide 3 - mercaptopropionique) -2,5 - dione)- piperonylamine 43 -----	172
8.2. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE -----	173
8.2.1. Transformation (choc thermique / électroporation) -----	174
8.2.1.1. Transformation par choc thermique -----	174
8.2.1.2. Transformation par électroporation -----	174
8.2.2. Expression et purification de la protéine (Ni-NTA / Dialyse)-----	175
8.2.3. SDS-PAGE-----	177
8.2.4. Quantification protéique (tests de Bradford et de Lowry)-----	178
8.2.5. Conditions expérimentales pour une étude d'apposition protéique -----	180
8.2.6. Isolation d'un plasmide et préparation d'un gel d'agarose -----	181
8.2.6.1. Isolation d'un plasmide par kit Qiagen mini-prep -----	181
8.2.6.2. Isolation d'un plasmide à l'aide de diverses solutions (méthode plus longue) -----	182
8.2.7. PCR pour séquençage et pour la préparation du mégaprimé -----	183
8.2.7.1. PCR pour séquençage -----	183

8.2.7.2. PCR pour la préparation du mégaprimier -----	183
8.2.8. <i>Sous-clonage de mCysFos-pDS56 à mCysFos-pQE32</i> -----	184
8.2.8.1. Digestion enzymatique-----	184
8.2.8.2. Purification d'ADN par gel d'agarose -----	185
8.2.8.3. Ligation-----	185
8.2.9. <i>Séquençage (préparation du gel d'acrylamide)</i> -----	186
ANNEXE -----	187
MÉDIAGRAPHIE -----	188

Liste des figures

Figure 1.1 Égyptien de l'époque antique, souffrant de poliomyélite (remarquez la jambe droite dégénérée)	2
Figure 1.2 Antonie Van Leeuwenhoek, le père de la microbiologie.....	3
Figure 1.3 Représentation du substrat utilisé dans les tests de ABPP	6
Figure 1.4 Étapes de marquage par la technique ABPP.....	7
Figure 1.5 Représentation du substrat utilisé dans les tests de ICAT.....	8
Figure 1.6 Étapes de marquage par la technique ICAT	9
Figure 1.7 Structure du dibromobimane.....	10
Figure 1.8 Représentation de la protéine GFP.....	11
Figure 1.9 a) Voie de synthèse du FLASH-EDT ₂ , b) Insertion du FLASH-EDT ₂ dans le domaine protéique CCXXCC de la protéine.	13
Figure 1.10 Structure et comportement fluorométrique de la 9-[1H-pyrrole-2,5-dione]-3H-naphto[2,1-b] pyran-3-one.	14
Figure 1.11 Visualisation de la technique de marquage a l'aide des maléimides par affinité de taille	15
Figure 1.12 Molécules antérieures déjà construites (a et c) et représentation tridimensionnelle correspondante (b et d).....	16
Figure 1.13 Visualisation de la fluorescence sous ultraviolet : G11 1 , H11 2 , G12 1 +EtSH et H12 2 +EtSH.	17
Figure 1.14 Schéma réactionnel de la réaction du fluorogène avec les thiols.....	18
Figure 1.15 Vitesse de la réaction d'addition aux thiols en fonction de la concentration de ceux-ci. (0.1 mM de 2 dans DMF, $\lambda_{exc}=332nm$, $\lambda_{em}=419nm$) .	19
Figure 1.16 Molécules cibles pour l'optimisation de fluorescence de 1	20
Figure 1.17 Représentation de la liaison fluorogène-protéine de distance correspondante.....	21
Figure 2.1 Professeur Alexander Jablonski (1898-1980). Tiré de « Principles of Fluorescence Spectroscopy ».....	24
Figure 2.2 Diagramme de Jablonski, tiré de «Principles of Fluorescence Spectroscopy».....	25

Figure 2.3 Sir George Gabriel Stokes (1819-1903). Tiré de « Principles of Fluorescence Spectroscopy ».....	26
Figure 2.4 Diagramme d'orbitales moléculaires des groupements maléimides. a) non substitués à des sulfures. b) disubstitués.....	28
Figure 3.1 Représentation de la compétition de délocalisation dans les structures diamminées 12 et 13	32
Figure 3.2 Représentation de la compétition de délocalisation dans les structures fluorogènes 14 et 15	33
Figure 3.3 Présentation des trois projets élaborés dans le but d'optimiser la fluorescence du composé 1	33
Figure 3.4 Voie de synthèse du 3,6-bis[1H-pyrrole-2,5-dione]2H-1-benzopyran-2-one 1	34
Figure 3.5 Mécanisme de synthèse du 3-acétamido-6-nitro[2H-1-benzopyran-2-one].	36
Figure 3.6 Représentation de la stabilité de la lactone en raison du maintien de l'aromaticité de la molécule.	37
Figure 3.7 Voie de synthèse du BMC-C4Me	39
Figure 3.8 Voie de synthèse du BMC-C4OMe.....	40
Figure 3.9 Voie de synthèse du BMC-C4N(Et) ₂	41
Figure 3.10 Étape clé de la formation de la coumarine.....	42
Figure 3.11 Visualisation de la tension stérique entre les protéines et le groupement R du BMC-C4R.....	42
Figure 3.12 Voie de synthèse du BMC-C8Ph.....	43
Figure 3.13 Mécanisme de la formation du 2-hydroxy-3-phénylbenzaldehyde.....	44
Figure 3.14 Nitration du 2-hydroxy-3-phénylbenzaldehyde.	45
Figure 3.15 Étape de formation de la coumarine.	45
Figure 3.16 a) Spectre d'excitation de 27 et b) spectre d'émission de 12 et de 27	47
Figure 3.17 Spectre d'émission de 6 rouge et de 28 bleu.....	49
Figure 3.18 Voie de synthèse du BMC-mMe.	52
Figure 3.19 Voie de synthèse du BMC-mOMe.	52
Figure 3.20 Voie de synthèse du BMC-mCO ₂ Me	54

Figure 3.21 Effet des groupements R sur la délocalisation du doublet d'électrons de l'azote.....	56
Figure 3.22 Voie de synthèse du 1,5-bismaléimidonaphtalène (BMN) 11	58
Figure 3.23 Voie de synthèse de l'acide 2-[5,8-bis-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-1,3-dioxo-1H,3H benzo[de]isoquinolin-2-yl]-succinique dimethyl ester 10 .	59
Figure 4.1 Effet de la température sur la fluorescence de a) 41 et de b) 15	63
Figure 4.2 Spectre d'excitation du standard quinine sulfate H ₂ SO ₄ 0.1M.....	66
Figure 4.3 Spectre d'excitation de 41	66
Figure 4.4 Détermination du rendement quantique du composé 41 , droite de la concentration en fonction de a) l'absorbance de 41 , b) l'absorbance de la quinine sulfate H ₂ SO ₄ 0.1M.....	68
Figure 4.5 Détermination du rendement quantique du composé 41 , droite de la concentration en fonction de a) la fluorescence de 41 , b) la fluorescence de la quinine sulfate H ₂ SO ₄ 0.1M.....	69
Figure 5.1 Représentation de la protéine thiorédoxine a) type sauvage et b) TRXC35A	73
Figure 5.2 Vecteur pQE-32 (Qiagen).....	74
Figure 5.3 Interaction entre le résidu d'un His-tag et de la matrice Ni-NTA.....	76
Figure 5.4 SDS-PAGE (acrylamide 15%) des étapes de purification de l'expression de TRXC35A. Puits 1) culot, puits 2, 3 et 4) tampon de lavage, puits 5, 6 et 7) tampon d'éluion (notre protéine), puits 8) marqueur.....	77
Figure 5.4b) Représentation mécanistique de la coloration par le test de Bradford... 78	
Figure 5.4c) Structure du bleu de Coomassie.	78
Figure 5.5 Résultat du SDS-PAGE des tests de réticulation. Puits 1) TRXC35A seule, puits 2) TRXC35A + 2 , puits 3) TRXC35A + 2 + EtSH.....	80
Figure 5.6 Représentation schématique de l'homodimère de Fos.	82
Figure 5.7 Séquence d'ADN du gène FosC99S.....	84
Figure 5.8 Acides aminés de la protéine FosC99S a) dans pDS56 et b) dans pQE-32.	85
Figure 5.9 Présentation des enzymes de restriction dans le plasmide recombinant pQE-32-Fos.	86

- Figure 5.10 Résultat du gel d'agarose 1% après digestion du plasmide recombinant pQE-32-Fos. Puits 1 à 6) digestions avec *HincII* et *NdeI*, Puits 7) identique au puits 6 mais non digéré, Puits 8) marqueurs, Puits 10) identique au puits 11 mais non digéré, Puits 11 à 14) digestion avec *HincII* et *NdeI*. 88
- Figure 5.11 Marqueurs (de type Gene Ruler™ DNA Ladder Mix) et nombres de paires de bases associés à chacun d'eux. 89
- Figure 5.12 Étapes générales à suivre pour réaliser une mutagenèse dirigée par la méthode du mégaprimé..... 90
- Figure 5.13 Résultats de la PCR pour la formation de la méga-amorce à différentes températures : puits 1) 50.0°C, puits 2) 52.8°C, puits 3) 56.0°C, puits 4) 60.0°C, puits 5) marqueur (migration du gel avec 2% d'agarose)..... 91
- Figure 5.14 Résultats de la deuxième PCR (agarose 2%). Puits 1) marqueurs, puits 2) gène Fos muté (L56C,C99S). 92
- Figure 5.15 Résultats du SDS-PAGE (acrylamide 15%) des étapes de purification de la protéine diCysFos. Puits 1) culot, puits 2) lysat, puits 3) filtrat, puits 4, 5 et 6) lavage, puits 7) élution, puits 8) marqueurs. 93
- Figure 5.16 Résultats de l'électrophorèse capillaire de la protéine diCysFos. 1) EC du tampon de lyse, 2) EC du tampon MES, 3) EC de la dialyse, 4) EC du tampon MES traité au CNBr, 5) EC de la dialyse traité au CNBr..... 95
- Figure 5.17 Résultats de l'analyse de Fos par dichroïsme circulaire (0.22mM dans du tampon MES 25 mM). 97
- Figure 5.18 Gel SDS-PAGE (acrylamide 15%) des fluorogènes **2** (0.05 mM) et **10** (0.5 mM) avec les protéines diCys-Fos (0.22 mM) et mCys-Fos (0.22 mM) après réaction pour la nuit à 25 °C dans du tampon 9:1 MES 25 mM (pH 6.0)/DMSO. Puits 1) diCysFos + **10**, Puits 2) mCysFos + **10**, Puits 3) diCysFos + **2**, Puits 4) mCysFos + **2**..... 98
- Figure 5.19 Résultats de l'étude du gradient de concentrations des fluorogènes **2** et **10** pour une concentration fixe de protéine (0.22 mM). Composés **10**: image a et c, composés **2**: image b et d. Puits 1) 10^{-3} M, puits 2) 5×10^{-4} M, puits 3) 10^{-4} M, puits 4) 5×10^{-5} M, puits 5) 10^{-5} M, puits 6) 5×10^{-6} M, puits 7) 10^{-6} M. 100

Figure 5.20 Représentation simplifiée du complexe protéine-diCysFos en réaction avec 2 à de fortes et faibles concentrations.	102
Figure 5.21 Études de sélectivité a) sous ultraviolet, b) au bleue de coomassie. Puits 1) lysat cellulaire sans fluorogène, puits 2) lysat cellulaire avec [2]= 10^{-5} M, puits 3) lysat cellulaire avec [10]= 5×10^{-4} M, puits 4) diCys-Fos monomérique purifié.	104
Figure 6.1 Croissance de XL1-bleu dans différents milieux d'expression protéique. bleue foncée: DMSO 3.7 %, bleue pâle: DMSO/IPTG (1mM), verte: IPTG, noire: 2 (5×10^{-4} M dans DMSO)/IPTG, rouge: 10 (5×10^{-4} M dans DMSO)/IPTG.	108
Figure 6.2 Localisation cellulaire de la protéine Raf suite à l'activation de Ras 111	
Figure 6.3 Résultats du test de cytotoxicité de 10 sur les cellules a) Cos-1 et b) cellule HEKC293.	113
Figure 6.4 Résultats du marquage protéique de HEKC293 exprimant la protéine Raf-Fos ou non (plasmide Mock) en présence de 10 pour a) 20min, b) 45min.	115
Figure 6.5 Résultats du marquage protéique de Cos-1 exprimant (ou non) la protéine Raf-Fos ou non (plasmide Mock) en présence de 10 pour a) 10min, b) 20min.	116
Figure 7.1 Représentation de la conception des nouvelles hélices α	120
Figure 7.2 Présentation des fluorophores (avant formation de maléimides) connus pour émettre dans le rouge, le vert ou le bleu et possédant des distances variables entre les deux fonctions maléimides (une fois la réaction complétée)..	122
Figure 7.3 Schématisation de l'incapacité à former les maléimides en raison de la faible nucléophilicité du doublet de l'azote des fluorogènes..	123
Figure 7.4a) Méthode connu en littérature pour faire un couplage de maléimide....	124
Figure 7.4b) Voie de synthèse de la piperonylmaléimide 42 et réaction avec un thiol.	124
Figure 7.5: Spectres de fluorescence de la piperonylmaléimide 42 et du produit thiolé 43	126
Figure 7.6 Principe du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).	127
Figure 7.7 Représentation de la conception des nouvelles hélices α	129

Liste des tableaux

Tableau I. Caractéristiques fluorimétriques des standards les plus communs.....	30
Tableau II. Visualisation de l'effet d'un groupement R sur la cyclisation.....	41
Tableau III. Effets de substitution des groupements du BMC sur les propriétés spectrales pour les fluorogènes et leur adduits correspondants.....	55
Tableau IV. Standards utilisés pour le calcul des rendements quantiques	65
Tableau V. Rendements quantiques et caractéristiques fluorométriques des composés à l'étude.....	71
Tableau VI. Résultats des études de cytotoxicité chez la bactérie.....	106

Liste des abréviations et des sigles

A: absorbance

a.a.: acide aminé

ABPP: Activity-Based Protein Profiling

ADN: acide désoxyribonucléique

APS: ammonium persulfate

ARN: acide ribonucléique

Av. J.-C.: avant Jésus-Christ

β -Carboline: 9H-pyrido(3,4-b)indole

BMC: bis-maléimidocoumarine

BMC-C4R: bis-maléimidocoumarine avec un groupement R à la position 4 de la coumarine

BMC-C8R: bis-maléimidocoumarine avec un groupement R à la position 8 de la coumarine

BMC-mR: bis-maléimidocoumarine avec un groupement R sur les maléimides

BMMB: bis-mercaptométhylbenzophénone

BMN: bis-maléimidonaphtalène

BSA: Bovine Serum Albumin

c: vitesse de la lumière dans le vide ou concentration

Cos-1: cellules de singes vert d'Afrique

DCC: 1,3-dicyclohexylcarbodiimide

ddATP: didéoxyadénosine triphosphate

ddCTP: didéoxycytosine triphosphate

ddGTP: didéoxyguanine triphosphate

ddTTP: didéoxythymidine triphosphate

diCys-Fos: protéine Fos dimutée pour présenter deux résidus cystéine

DMAP: *N,N*-diméthylaminopyridine

DMF: *N,N*-diméthylformamide

DMSO: diméthylsulfoxyde

dNTP: déoxynucléotide triphosphate
D.O.: densité optique
DPA: 9,10-diphénylanthracène
E: énergie
 ϵ : coefficient d'absorptivité
EC: électrophorèse capillaire
E. coli: *Escherichia coli*
EDT: éthylène dithiol
FLAsH-EDT₂: Fluorescein Arsenical Helix Finder, bis EDT
FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer
FTIR: Fourier Transform Infrared
 Φ : rendement quantique
GDP: guanosine 5'-diphosphate, disodium salt
GFP: Green Fluorescent Protein
GSH: glutathion
GTP: guanosine 5'-triphosphate, trisodium salt
h: constante de Planck
HBSS: Hank's Balanced Salt Solution
HEK-293: Human Embryonic Kidney
ICAT: Isotope-Coded Affinity Tags
IgG: γ -immunoglobuline bovine
IR: infrarouge
IPTG: isopropyl thiogalactoside
J: constante de couplage
k: constante de vitesse
 K_F : constante de désactivation radiative
 K_{nr} : constante des processus non radiatifs
l: longueur de délocalisation d'un électron au cœur d'une molécule
 λ : longueur d'onde
lac-i: inductibilité de lac
lac-O: opérateur constitutif O de lac

LB: Luria Broth

LC: Liquid Chromatography

mCys-Fos: protéine Fos monocystéinée

MES: acide -morpholineéthanesulfonique

MOPS: acide 4-morpholinepropanesulfonique

MS: Mass Spectroscopy

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrasodium bromide

NDP: nucléotide diphosphate

Ni-NTA: acide nickel-nitrilotriacétique

PCR: Polymerase Chain Reaction

Pf: point de fusion

POPOP: 1,4-bis (5-phenyloxazol-2-yl) benzene

psi: « pound per square inch » (livre par pouce caré)

RBD: Ras Binding Domain

RMN: résonance magnétique nucléaire

rpm: révolution par minute

S₁: état singulet (en fluorescence)

SDS-PAGE: « sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis »
(électrophorèse sur gel de polyacrylamide)

SIDA: syndrome immunitaire de déficience acquise

S_N2: substitution nucléophile de deuxième ordre

TBA: tri-*n*-butylamine

T₁: état triplet (en fluorescence)

TEMED: *N,N,N',N'*-tétraméthylènediamine

TP: température de la pièce

TRX: thiorédoxine

TRXC35A: thiorédoxine avec la cystéine 35 mutée en alanine

u.a.: unité arbitraire

U.V.: ultraviolet

La vie est un cercle qui tourne, où le mal engendre le mal.

Il arrive parfois, dans de très rares cas, que cette chaîne soit brisée par des êtres d'exception que j'appelle des héros.

Je dédie cette thèse à mes parents qui, chacun à leur façon, ont su surmonter de grandes épreuves de vie avec courage et honneur et qui ont su, par le fait même, me rendre fier d'être leur fils.

Remerciements

Lorsque Danielle Lapierre a commencé ses études au sein du laboratoire de Jeffrey, elle est vite devenue une amie. Après une difficile année de travail assidu constitué de sourires, de plaisanteries et de tours du chapeau lors de matchs de soccer (évidemment préorganisés avec l'équipe adverse), elle a finalement décidé de me remarquer. Ainsi, je suis fier de partager ma vie avec elle. Merci beaucoup Danielle pour ton support tout au long de mes études doctorales, je suis très heureux d'être à tes côtés et j'ai hâte de t'appeler ma femme!

Je désire remercier en deuxième lieu ma famille immédiate (mes parents Jacqueline et Fernand ainsi que ma sœur Céline) sans qui je ne serais rien. S'il est vrai que mon cœur est bon, c'est grâce aux valeurs qu'ils ont su m'inculquer. Merci pour tout!

Merci à mon directeur de recherche et ami Jeffrey Keillor qui a toujours su me montrer que la science est la chose la plus importante au monde... tout de suite après ce qui l'est plus encore: la famille, le respect de son prochain et de soi-même. Cela peu sembler banal, mais dans ce monde tyrannisé qu'est la science, c'est une vertu inestimable.

Un merci particulier à Danielle Lapierre et Steve Gillet pour avoir pris le temps de lire cette thèse, il s'agit d'un travail colossal que j'apprécie grandement.

Merci aux nombreuses personnes qui ont travaillé avec moi au cours de toutes ces années: (maitrise) Marie-Hélène Houle, (stagiaires) Mélissa Gagnon, Alain Grandbois et Tze Chieh Shiao, ce fut très stimulant de pouvoir vous suivre et vous conseiller. Merci également au Pr S. Michnick et Galia Ghaddar (en biochimie) qui ont travaillé en collaboration sur le projet avec nous et sans qui je n'aurais pas pu présenter de résultats en cellules eucaryotes.

Merci aussi à ceux qui ont fait du laboratoire un endroit agréable, que ce soit les étudiants des temps passés et présents. Je désire prendre le temps de tous les nommer puisqu'ils méritent d'être soulignés: Caroline Rivard, Christian Gravel, Christian Lherbet, Christophe Pardin, Claudio Marrano, Danielle Lapierre, Dany Halim, Judith Labelle, Marie-Hélène Houle, Mylène Morin, Paul Gagnon, Pierre de Macédo, Roberto Chica, Roselyne Castonguay et Steve Gillet. Vous me manquez tous beaucoup!

Merci également à Joelle Pelletier et à tous les membres de son groupe pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire afin de faire une immersion en biologie moléculaire. Vos conseils, vos encouragements (entre autres sur la qualité de mes burgers lors de BBQ chez moi) et votre bonne humeur m'ont permis de constamment m'améliorer.

Merci au Pr Andréa Schmitzer et au Pr William Lubell ainsi qu'aux membres de leurs groupes pour leurs précieuses aides quant à l'utilisation d'appareils ou à leurs conseils lors de réunions en chimie bio-organique. Votre implication fut d'un grand secours.

Merci à tous ceux qui ont pris le temps de me faire rire. Avoir eu la chance de vous avoir est un cadeau très précieux et travailler avec vous tous fut un honneur!

*« ...Tout le monde savait que c'était impossible.
Il est venu un imbécile qui ne le savait pas et qui l'a fait. »*

Marcel Pagnol

CHAPITRE 1

**Le marquage protéique,
un outil fort utile...**

1.1. Généralités: les cicatrices du passé

Un voyage à travers l'histoire nous permet de remonter jusqu'à environ 2000 ans avant Jésus-Christ afin de répertorier la première maladie infectieuse rapportée par les écrits, la poliomyélite¹. Un égyptien avec une jambe atrophiée, conséquence de cette maladie^{2,3,4}, est illustré à la figure 1.1. À cette époque, la notion de virus était tout à fait absente et ce jeune homme aurait sans aucun doute affirmé que son état physique était la volonté de son dieu. Cette notion de divinité face à l'incompréhension est demeurée présente pendant plusieurs siècles afin de ne pas blasphémer les écrits divins^{5,6}.

Les premières théories sur l'apparition de la vie datent d'environ 1000 ans avant Jésus-Christ et furent émises par des philosophes grecs. Selon Anaximandre de Milet⁷ (610 à 546 av. J.-C.), la vie apparut suite à l'évaporation de l'eau du soleil. Pour sa part, Empédocle^{8,9} (490 à 435 av. J.-C.) pensait que la vie était due au rassemblement de plusieurs organes pour former un seul être. Le philosophe Démocrite^{10,11,12} (460 à 370 av. J.-C.) affirma, quant à lui, que la vie était issue de vers sortant de la boue pour ainsi former des êtres humains.

Ces concepts «originaux» et très diversifiés firent place, par la suite, à une incompréhension générale. Au IV^e siècle avant Jésus-Christ, soit à l'ère de l'abiogenèse¹³ (du grec *abios* qui signifie « sans vie »), la population, incluant les scientifiques, croyait que la vie pouvait naître d'objets inanimés; la génération spontanée^{14,15}. Cette notion perdura



Figure 1.1. Égyptien de l'époque antique, souffrant de poliomyélite (remarquez la jambe droite dégénérée)

pendant plusieurs siècles. En effet, plus de mille ans après l'apparition de cette théorie, le médecin et chimiste Flamand Jean-Baptiste Van Helmont^{16,17,18} (1577-1644) affirma qu'une chemise sale, du blé et vingt et un jours d'attente font apparaître une souris! À cette époque, il était difficile de réfuter cette affirmation... les faits parlaient d'eux-mêmes.

Face à cet état d'incompréhension, la population n'était pas prête à être confrontée aux maladies. En 442, un bateau romain revenant d'Égypte amarre avec à son bord, un petit bacille portant le nom de *Pasteurella pestis*^{19,20,21} (ou bacille de Yersin). Ce microbe (responsable de la peste^{22,23,24}) causa la chute de Rome en affaiblissant la Gaule et toute la partie méditerranéenne de l'Occident. Une invasion par les barbares germaniques porta un coup fatal à l'Empire. Devant ce fléau, la population se trouva impuissante, n'ayant pour seul bouclier que de vaines prières.

Ce même microbe frappa une fois de plus en 1347. L'Europe fut à nouveau la cible. En quatre ans, 25 millions de personnes perdirent la vie et 75 % de la population fut décimé dans les 80 années qui suivirent^{19,20,21}.

Ce n'est cependant qu'entre 1478-1553 que le médecin Girolamo Fracastoro avança que des êtres vivants invisibles devaient provoquer les maladies^{25,26}. Il fallut tout de même attendre jusqu'en 1632-1723 pour qu'un micro-organisme puisse être observé. Antonie Van Leeuwenhoek était un drapier et chemisier²⁷ qui passait ses temps libres à construire des microscopes simples (voir figure 1.2). À partir de



Figure 1.2 Antonie Van Leeuwenhoek, le père de la microbiologie

1673, Leeuwenhoek envoya des lettres détaillées sur ses découvertes à la Royal Society de Londres. D'après ses descriptions, il avait clairement vu à la fois des bactéries et des protozoaires²⁸.

Malgré cette découverte, il fallut le travail acharné de Francesco Redi^{29,30,31} (1626-1692), Lazzaro Spallanzani^{32,33,34} (1729-1799), Théodore Schwann^{35,36,37} (1810-1882) et Louis Pasteur^{38,39,40} (1822-1895) pour que l'on enraye enfin le concept de génération spontanée et que l'on comprenne le principe des micro-organismes et de la stérilisation (à cette époque, toutes ces notions étaient étroitement reliées⁴¹).

Dès lors, les maladies bactériennes furent beaucoup plus faciles à contrer puisque les scientifiques de l'époque savaient quoi chercher ! Au cours de ce même XVII^e siècle, apparut le concept de la cellule, unité morphologique de base de la vie⁴². Cette découverte fut très importante puisqu'elle est à la base de toutes nos sciences modernes. En effet, la médecine soigne les cellules, le diététiste les alimente et le chimiste bio-organicien tente de percer leurs mystères.

Le principe de savoir où et quoi chercher demeure la clé de plusieurs mystères dans les domaines scientifiques. De nos jours, nos connaissances ont énormément progressé pour détruire les maladies microbiennes, mais il reste encore beaucoup à faire pour combattre les maladies virales, telles que le SIDA^{43,44,45}. Nous savons déjà qu'un virus est une coquille de protéines qui transporte une petite séquence d'ARN ou d'ADN⁴⁶. Celle-ci pénètre une cellule saine et l'infecte en trafiquant son système de production protéique et de réplication de nucléotides⁴⁷. Par contre, nous ne connaissons que très peu le type d'interactions que les protéines virales peuvent avoir avec la cellule, ni comment elles interagissent les unes avec les autres afin de s'agencer sous une forme organisée. De manière générale, nos connaissances dans le domaine protéique *in vivo* (tant pour les protéines virales que pour les protéines cellulaires) sont relativement mal connues. Cela s'explique par le fait que le maintien de la stabilité du milieu interne d'une cellule est géré par une étonnante quantité de

transformations. À chaque seconde, la cellule doit construire des milliers de protéines, mais doit également en détruire de grandes quantités⁴⁸. Chacune de ces protéines joue un rôle essentiel au maintien de l'homéostasie et une simple défaillance peut avoir de sérieuses répercussions sur l'organisme vivant telles que le cancer⁴⁹, les maladies dégénératives^{50,51,52} ... voire la mort^{53,54}. Ainsi si l'on désire rétablir un équilibre cellulaire, il faut comprendre le rôle des protéines impliquées et la localisation de celles-ci. La meilleure manière d'y parvenir est de procéder à un marquage protéique. Pour ce faire, il existe quelques outils biochimiques qui peuvent être classés en trois générations, une notion qui sera expliquée en détails dans la section suivante.

1.2. Présentation des outils déjà disponibles pour un marquage protéique

La première génération de marquage est une révélation non spécifique. On dit d'une technique qu'elle est non spécifique lorsqu'elle est incapable de faire une différence entre deux protéines distinctes. Ainsi, dans un protéome (ensemble de protéines pouvant provenir d'un lysat cellulaire ou autre), si une technique ne peut faire de différenciation protéique, elle sera considérée de première génération. Cela dit, il s'agit tout de même d'un outil précieux pour plusieurs études ! Un des outils ayant vu le plus d'essor ces dernières années est appelé « Activity-Based Protein Profiling » (ou ABPP)⁵⁵. Ce dernier permet de marquer des groupements fonctionnels par le biais de la fluorescence. En effet, le substrat possède trois régions distinctes (voir figure 1.3): une portion rhodamine (qui confère le caractère fluorescent)⁵⁶, un espaceur, et une région ester de sulfonate (qui constitue le groupement partant lors d'une attaque nucléophile). La technique ABPP prend son titre de première génération par le manque de sélectivité du groupement fonctionnel nucléophile. En effet, les cystéines, les sérines ou tout autre nucléophile peuvent procéder à une substitution nucléophile de deuxième ordre (S_N2) tel que schématisée ci-après. Il s'agit donc d'une « activité » nucléophile.

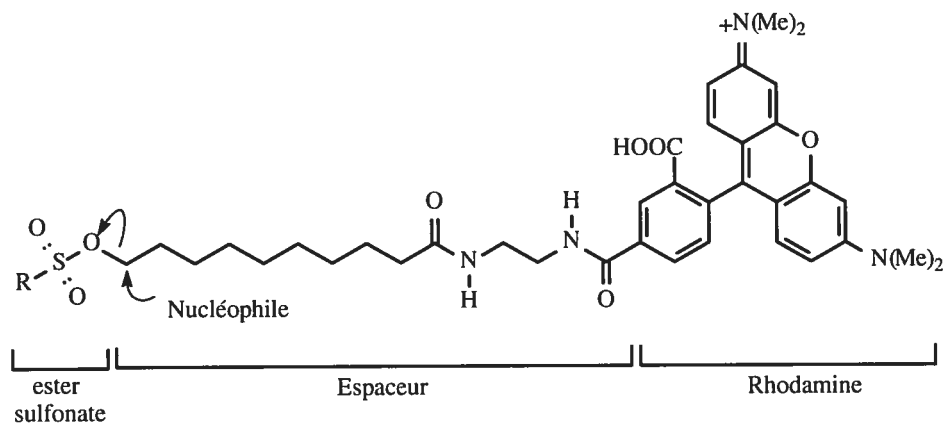


Figure 1.3 Représentation du substrat utilisé dans les tests de ABPP⁵⁵

Le fonctionnement de cette technique est illustré à la figure 1.4. Après la liaison de la protéine sur le substrat, une dénaturation du complexe est réalisée afin de briser les structures secondaires des protéines. Une digestion tryptique est ensuite faite afin de couper entre les liens chargés positivement en *N*-terminal (Arg, Lys)⁴⁸. Cette étape est essentielle puisque le fait de travailler avec des fragments protéiques (plutôt que la protéine en entier) facilitera l'interprétation des données. Par la suite, une purification par colonne d'affinité est réalisée. Cette colonne est en fait une série d'anticorps à la rhodamine qui permet aux fragments protéiques marqués de rester « accrochés » à la colonne. Ce même fragment peut ensuite être décroché puis analysé par LC-MS/MS. Cette technique permet alors de déduire le fragment obtenu et donc d'extrapoler les informations sur la protéine entière (à l'aide de banques de données). Cette méthode permet donc de réaliser un marquage protéique à partir d'un mélange de plusieurs protéines. Par contre, elle offre le désavantage de sa faible sélectivité (peut marquer des a.a. sans intérêt), elle ne peut être visualisée que sur un mélange limité de protéines (impossible sur un lysat cellulaire) et est imprécise quant à la quantification protéique.

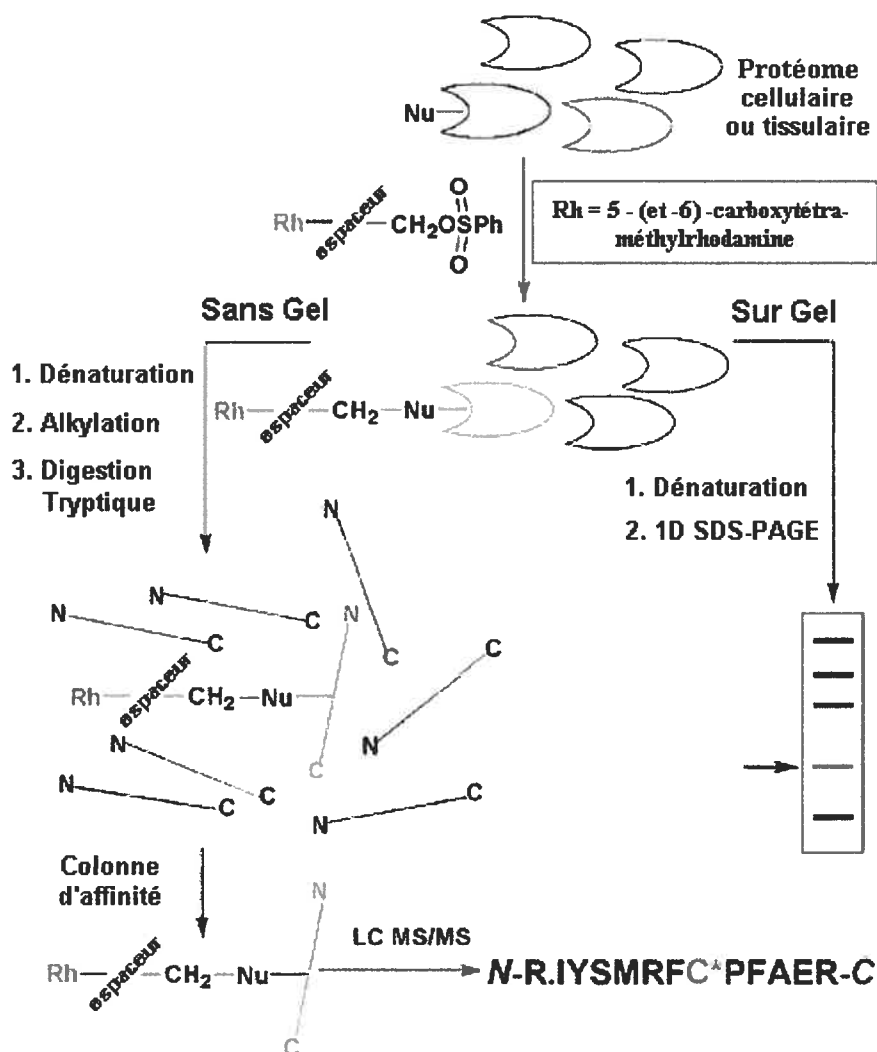


Figure 1.4 Étapes de marquage par la technique ABPP⁵⁵

La seconde génération, contrairement à la première, permet une plus grande sélectivité. Il s'agit donc de techniques conçues pour que seulement un type de groupements fonctionnels réagisse sur le substrat (capable de sélectivité *in vitro*). Il existe plusieurs techniques appartenant à cette catégorie telles que « Isotope-Coded Affinity Tags » (ou ICAT)⁵⁷ ou encore simplement le marquage par la molécule dibromobimane⁵⁸ (voir la structure p.10, figure 1.7).

Contrairement au ABPP, ICAT ne fait pas de marquage par fluorescence. Son

concept est tout de même très similaire puisque l'analyse implique une étude par LC-MS. Le substrat du ICAT est une molécule complexe comportant trois régions soit une portion biotine, un espaceur et une région électrophile spécifique au soufre (nous verrons plus bas que la spécificité n'est pas très bonne !) (voir figure 1.5).

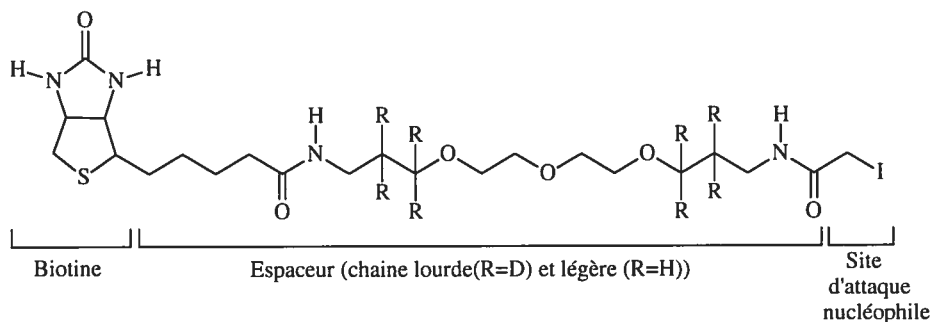
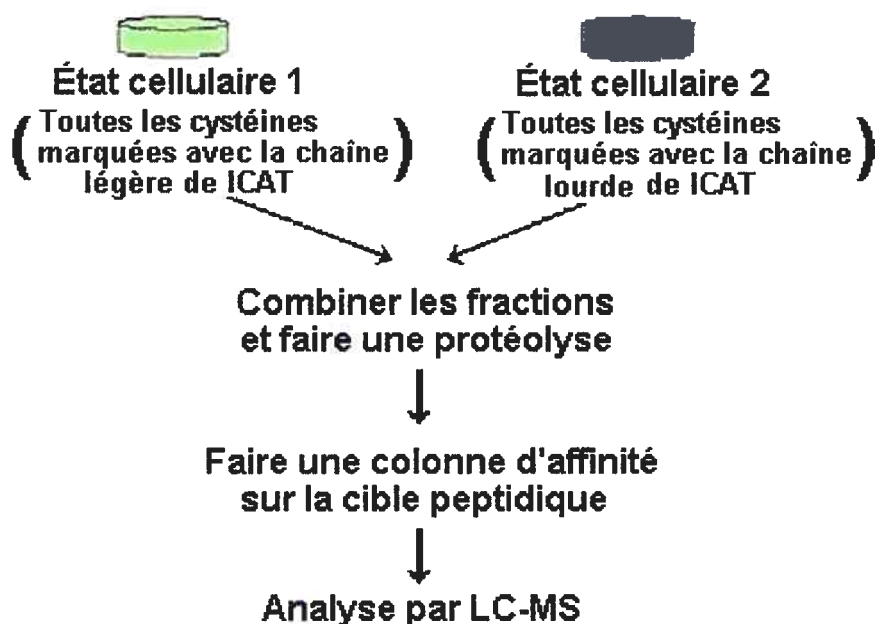
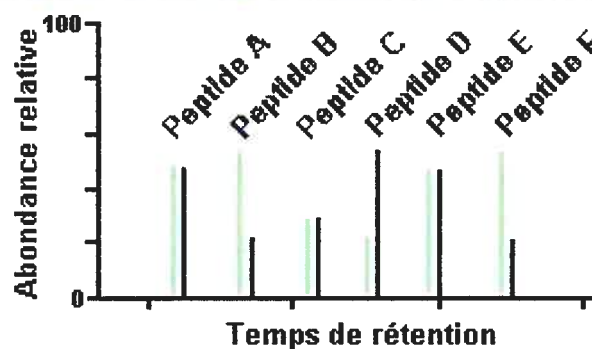


Figure 1.5 Représentation du substrat utilisé dans les tests de ICAT.

La particularité du substrat est qu'il existe sous deux formes ($R=H$ ou encore $R=D$). Ainsi, il sera possible de traiter et de comparer deux échantillons semblables simultanément à l'aide de ces deux différents substrats (voir figure 1.6). En effet, si l'on désire étudier deux cellules identiques dans des états différents de productions protéiques, il sera possible de savoir combien de fois plus de protéines sont produites dans un état plutôt qu'un autre. Pour ce faire, les deux échantillons sont traités indépendamment avec chacun des substrats, puis regroupés avant d'être fractionnés à l'aide de la trypsine (identique au ABPP). Les fragments sont ensuite élués sur une colonne d'affinité spécifique à la biotine. Après avoir décroché les fragments, il est possible de faire une analyse LC-MS. Un rapport peut donc être établi pour la production protéique de chacun des états. Le grand désavantage de cette technique est que pour bien visualiser la différence de production protéique, ce dernier doit être dans un rapport minimal d'environ dix fois. De plus, si le site de clivage de la trypsine est trop près d'une cystéine, l'enzyme ne pourra pas cliver efficacement la protéine. En outre, les études expérimentales ont démontré que la cystéine, bien que plus rapide et efficace, n'est pas exclusive pour réaliser une substitution nucléophile.



Quantification peptidique par mesure du ratio d'intensité des pics



Identification protéique par informations séquentielles (MS/MS)

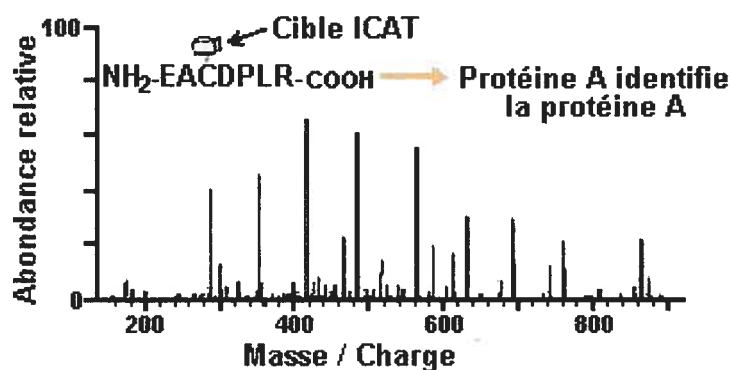


Figure 1.6 Étapes de marquage par la technique ICAT⁵⁷

Les dibromobimanes⁵⁸ peuvent également être utilisés pour faire un marquage protéique^{59,60} (voir figure 1.7). Il s'agit d'une structure fluorescente capable de se lier à des thiols. La réaction, de sélectivité modérée pour les mêmes raisons que ICAT, permet toutefois de marquer et de quantifier une protéine par soustraction d'un blanc. Les réactions non spécifiques offrent, par contre, un bruit de fond non négligeable, ce qui rend le dibromobimane inadéquat pour faire des études cellulaires.

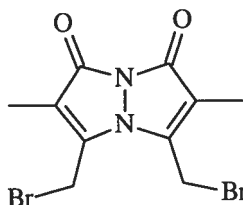


Figure 1.7 Structure du dibromobimane

Une des techniques les plus sélectives retrouvée dans la deuxième génération est le marquage par fluorescence via les maléimides^{61,62}. Cette technique sera décrite en détail dans les prochains chapitres puisqu'elle est à la base de l'élaboration de notre méthode.

La troisième génération fait un bon de géant et permet de faire des études de marquage protéique *in vivo*. Pour ce faire, deux techniques sont utilisées soit un marquage à l'aide de la GFP (Green Fluorescent Protein)^{63,64} ou encore l'utilisation d'un réactif chimique par la technique FLASH-EDT₂ (Fluorescein Arsenical Helix Finder, bis-EDT)⁶⁵.

La GFP est une protéine de 238 a.a. qui peut être greffée à l'extrémité d'une protéine d'intérêt par biologie moléculaire de façon à former une chimère fluorescente *in situ*^{66,67,68}. La GFP est exprimée à une extrémité de la protéine d'intérêt et suite à son repliement, une fluorescence est visualisable. Il existe différentes GFP dont certaines peuvent avoir de très bons rendements quantiques (de l'ordre de 0.8)^{56,69}. Cette technique permet de révéler et de suivre l'évolution d'une

protéine dans une cellule, ce qui constitue un outil très puissant et largement répandu en biochimie. Le désavantage de cette technique est que la GFP est relativement volumineuse^{63,71} (11 brins β , 27 kDa (voir figure 1.8)) et que son repliement est lent, ce qui peut, dans certains cas, perturber l'environnement de la protéine et modifier sa fonction (structure tridimensionnelle), sa localisation subcellulaire ainsi que sa stabilité^{63,71} (demi-vie). Ainsi, la présence de faux négatifs est observable^{63,70}.

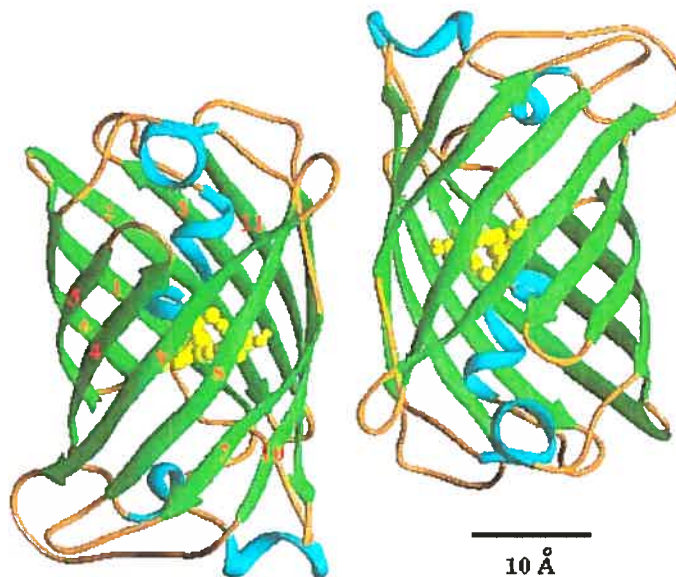


Figure 1.8 Représentation de la protéine GFP

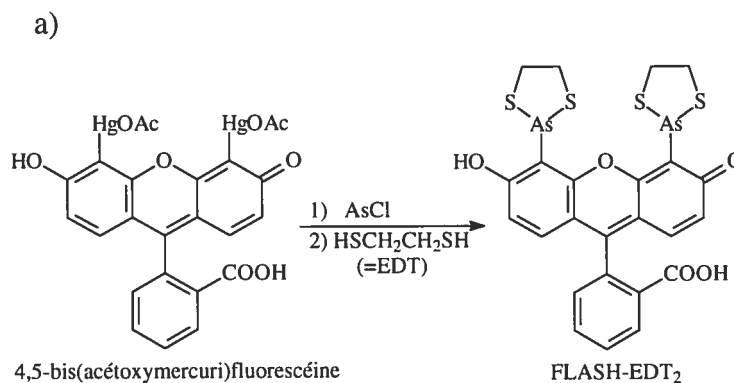
Afin de résoudre ce problème, le Dr. Roger Tsien⁶⁵ a tenté de mettre au point un système simplifié. En effet, il a remplacé la GFP par un petit peptide qui est marqué par un composé fluorogène. Par le fait même, il a marqué une protéine sans altérer la structure tridimensionnelle des complexes et minimisé l'obtention de faux négatifs.

Leur approche exploite une liaison covalente entre un organoarséniate et deux paires de thiols (provenant de cystéines dans une protéine). Par contre, ce type de liaison est responsable de la plupart des causes de toxicité des composés à base d'arsenic^{63,71}. Il est cependant réversible par un petit dithiol vicinal comme le 2,3-

dimercaptopropanol ou comme le 1,2-éthanedithiol (EDT), lequel forme un complexe avec l'organoarsenic^{63,71} et le rend ainsi non toxique.

Ici, un grand nombre de cystéines sont impliquées dans la liaison au composé fluorogène afin d'éviter les affinités fortuites. En effet, le système implique quatre cystéines contenues dans une boucle d'un peptide test CCXXCC (le peptide utilisée est acétyl-WEAAAREACCRECCARA-amide⁷², un peptide muté basé sur les études d'un autre polypeptide, l'acétyl-W(EAAAR)_n A-amide^{73,74}).

Le composé fluorogène choisi, appelé FLASH-EDT₂, a été préparé par transmétallation^{75,76} à partir d'une fluorescéine contenant deux acétates de mercure suivie de l'addition de EDT (pour faciliter la purification) tel que présenté à la figure 1.9. La molécule FLASH-EDT₂ n'est pas fluorescente, mais elle le devient après déplacement de EDT par les quatre cystéines de la protéine mutée. Ce phénomène s'explique par la petite taille du EDT qui permet la rotation du lien aryl-arsenique. L'état excité est atténué par une désactivation vibrationnelle ou par une photo induction de transfert d'électrons⁵⁶. Le complexe peptidique ne subit pas d'atténuation de fluorescence puisqu'il y a formation d'un complexe rigide. De plus, même si la réaction est réversible (entre le peptide et les EDT), la forme FLASH-peptide est très largement favorisée en condition diluée.



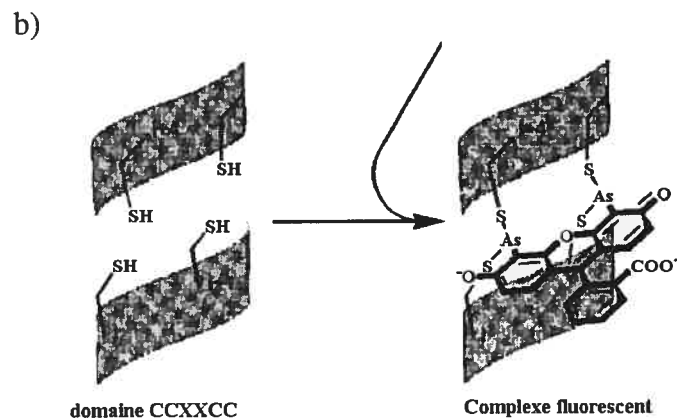


Figure 1.9: a) Voie de synthèse du FLASH-EDT₂, b) Insertion du FLASH-EDT₂ dans le domaine protéique CCXXCC de la protéine.

Le concept de cette étude constitue un grand pas en avant pour l'étude fluorimétrique des protéines et servira de fil conducteur à nos recherches. En effet, l'élaboration de notre méthode de marquage protéique s'est grandement inspirée des travaux du Pr Tsien. Cependant, la différence majeure réside dans la simplification d'un système de marquage protéique ne demandant pas de détoxification après la greffe du composé fluorescent. Naturellement, un fluorogène non toxique serait beaucoup plus approprié pour réaliser des tests cellulaires. Par conséquent, il fallait repenser le concept en entier et refaire tous les tests contrôles nécessaires.

1.3. Travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire.

1.3.1. Choix des structures fluorogènes

Afin de construire une sonde fluorescente *in vivo*, il est essentiel de vérifier la fluorescence intrinsèque du milieu. Ainsi, un fluorogène ayant une longueur d'onde d'excitation de 280 nm serait tout à fait inefficace puisqu'il serait dans les mêmes longueurs d'onde d'absorption que le tryptophane^{48,77} (un acide aminé largement répandu dans les protéines). Par conséquent, la longueur d'onde d'excitation

minimale du fluorogène doit être de plus de 300 nm afin de faire une bonne discrimination avec la fluorescence des protéines. Les protéines ne sont pas les seules biomolécules à fluorescer. Il faut ainsi éviter tout recouvrement avec la fluorescence intrinsèque des composés cellulaires. De plus, les protéines sont des structures qui exigent des conditions aqueuses pour éviter qu'elles ne précipitent ou qu'elles se dénaturent. Les études ont démontré que la présence de 5 à 10 % de solvant organique est la limite acceptable pour maintenir la stabilité des protéines⁴⁸ (il en va de même pour la survie d'une cellule). Les fluorogènes doivent donc être suffisamment polaires pour être solubles dans ces conditions.

Le rendement quantique doit également être suffisamment grand puisque les protéines sont toujours très diluées. En effet, elles précipitent à des concentrations supérieures à $10^{-4}M$ ⁴⁸, ce qui implique de travailler avec de faibles concentrations de fluorophores, d'où l'importance d'avoir un bon rendement quantique. Enfin, la réaction entre les protéines et le fluorogène doit pouvoir être faite dans des conditions douces, semblables à celles retrouvées dans les milieux biologiques.

Ayant ces informations à l'esprit, nous nous sommes inspirés de quelques articles portant sur la fluorimétrie^{78,79}. On y rapportait des fluorogènes de type naphtopyranone inter-reliés à des groupements maléimides (voir figure 1.10). Ces structures ont la particularité d'être relativement peu fluorescentes. Par contre, lorsque le maléimide réagit avec un thiol (de manière sélective), la fluorescence devient alors beaucoup plus importante. Ce phénomène sera expliqué à la Section 2.4.

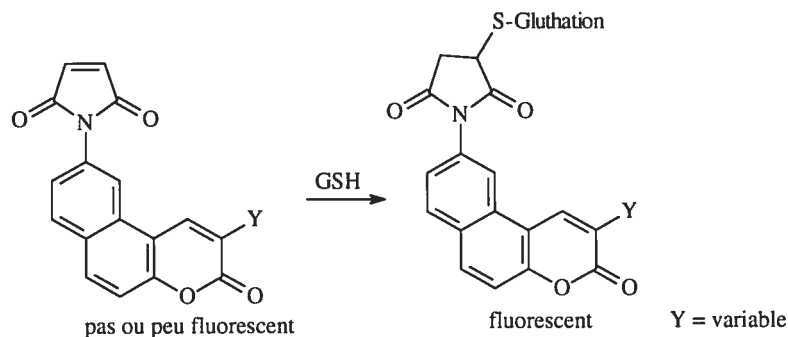


Figure 1.10 Structure et comportement fluorimétrique de la 9-[1H-pyrrole-2,5-dione]-3H-naphto[2,1-b] pyran-3-one.

L'analyse des résultats du groupe de recherche du Pr Langmuir nous a permis de constater qu'il serait possible de faire un marquage protéique très sélectif en utilisant un fluorogène de type bis-maléimide et une protéine d'intérêt portant deux cystéines. Si la distance entre les deux maléimides est compatible avec la distance entre les deux cystéines de la protéine, il devra y avoir émission de fluorescence (voir figure 1.11).

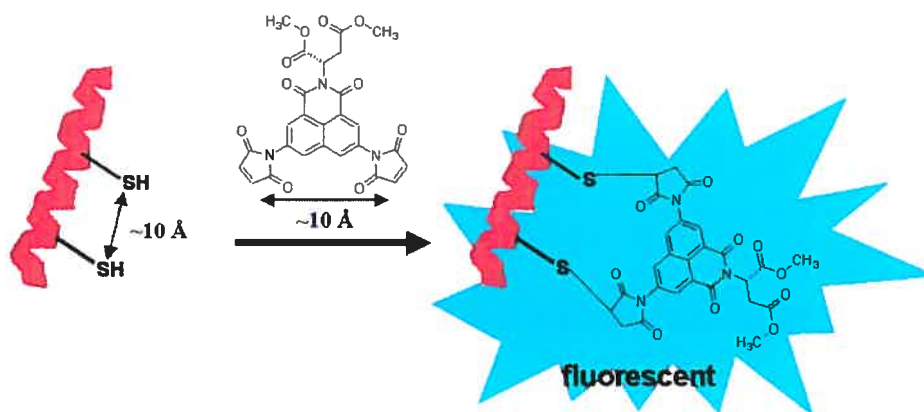
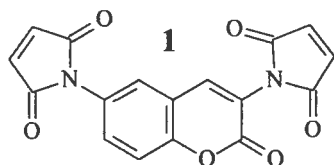


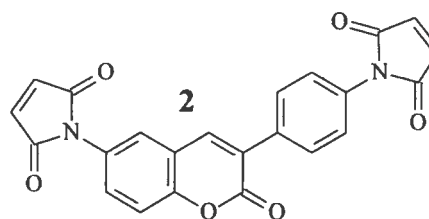
Figure 1.11 Visualisation de la technique de marquage à l'aide des maléimides par affinité de taille .

Deux fluorogènes ont ainsi été construits⁸⁰ (voir figure 1.12). À l'aide du logiciel HyperChem, il a été mesuré que la distance qui sépare les maléimides sont de 10,8 Å pour **1** et de 15,4 Å pour **2**. La solubilité de ces composés dans un solvant H₂O/DMSO 9 : 1 est bonne (donc compatible avec les protéines).

a)



c)



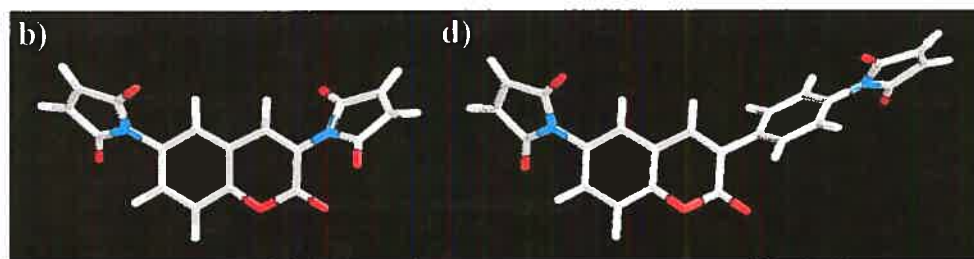


Figure 1.12 Molécules antérieures déjà construites (**1** et **2**) et représentation tridimensionnelle des structures minimisées par modélisation moléculaire (Champ de force MM+ avec les conditions de convergence suivantes: Algorithm, Steepest Descent, gradient RMS de 0.1 Kcal/Åmol, sous vide) (b et d).

1.3.2. Réaction avec des thiols.

Bien qu'aucune étude n'a été réalisée avec **1** et **2** sur des protéines, la fluorescence a été caractérisée à l'aide de thiols simples et d'un dithiol ; le bis-mercaptopméthyl-benzophénone (BMMB⁸⁰) dans le DMSO et à la température de la pièce⁸⁰. Les molécules **1** et **2** synthétisées ont été placées en présence de différents thiols et une augmentation significative de fluorescence a pu être observée. Les conditions de réaction sont très douces puisqu'elles n'impliquent que le thiol lui-même. De plus, les longueurs d'onde d'excitation sont de 351 nm pour **1** et de 383 nm pour **2**. Ces pics d'excitation ne superposent pas celui du tryptophane, ce qui est adéquat pour les tests protéiques... voire cellulaires. De plus, une excitation des produits thiolés à des longueurs d'onde de l'ordre de 350-400 nm est un avantage majeur puisque la fluorescence peut être perçue à l'aide d'une lampe ultraviolette (voir figure 1.13). Les protéines quant à elles ne fluorescent pas lorsqu'irradié en ultraviolet puisqu'aucun acide aminé n'est excité dans ces longueurs d'ondes.

Par la suite, nous avons étudié le comportement du ou des intermédiaires réactionnels afin de vérifier leur fluorescence. Il va de soi qu'un produit monothiolé fluorescent serait beaucoup moins efficace pour faire un marquage protéique sélectif. Afin de répondre à cette interrogation, des études d'électrophorèse capillaire ont été

réalisées et nous avons pu observer que le produit monothiolé n'est pas fluorescent. Les étapes pour parvenir à cette conclusion ne sont pas décrites puisqu'il s'agit d'une expérience relativement longue et complexe mais les détails de cette dernière se retrouvent dans mon mémoire de maîtrise⁸⁰.

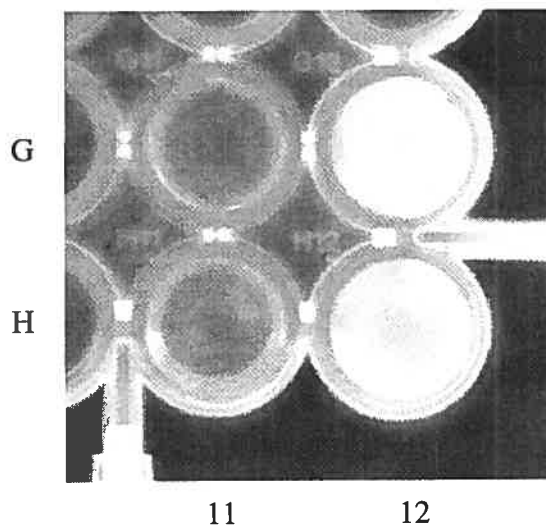


Figure 1.13 Visualisation de la fluorescence sous irradiation ultraviolette: G11 1, H11 2, G12 1+EtSH et H12 2+EtSH.

1.3.3. Cinétique de réaction

Les études d'électrophorèse capillaire mentionnées à la section précédente ont également témoigné d'une très faible abondance de produit monothiolé⁸⁰. Il y aurait donc un phénomène d'activation qui rendrait la deuxième étape beaucoup plus rapide que la première. Afin de vérifier cette observation, nous avons tracé un graphique de vitesse de réaction en fonction du nombre d'équivalents de thiol (cette étude a été réalisée par Marie Hélène Houle⁸¹). Théoriquement, la vitesse globale d'une réaction qui implique une première étape lente, suivie d'une seconde beaucoup plus rapide serait directement proportionnelle à la concentration du fluorogène et à celle du thiol pour former le complexe monothiolé (voir figure 1.14) (la suite de la réaction n'est pas limitante puisqu'elle est très rapide) tel que démontré à l'équation 1^{48,82}.

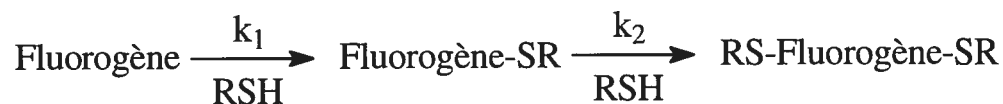


Figure 1.14 Schéma réactionnel de la réaction du fluorogène avec les thiols.

$$v = k_1 [\text{RSH}] [\text{fluorogène}] \quad (1)$$

Par opposition, si la deuxième étape était lente, la vitesse aurait été de deuxième ordre^{48,81}. Elle serait donc dépendante de la concentration du fluorogène et des deux équivalents de thiol tel qu'illustré à l'équation 2.

$$d[\text{P}]/dt = k_2 [\text{RSH}] [\text{fluorogène}] [\text{RSH}] = k_2 [\text{RSH}]^2 [\text{fluorogène}] \quad (2)$$

Nous avons ainsi réalisé deux tracés possibles à partir des données expérimentales obtenues (voir figure 1.15). La première, en ligne pleine, représente le résultat de l'équation 1 et la seconde, en pointillé, représente l'équation 2. Les résultats expérimentaux ayant une allure beaucoup plus linéaire qu'exponentielle, il est possible de déduire que la première étape de réaction est effectivement plus lente que la seconde.

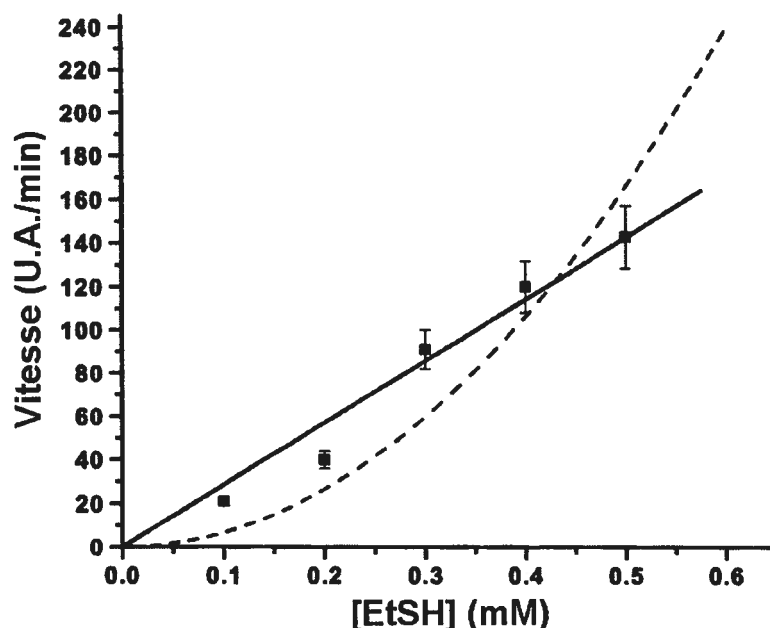


Figure 1.15 Vitesse de la réaction d'addition aux thiols en fonction de la concentration de ceux-ci. (0.1 mM de **2** dans DMF, $\lambda_{exc}=332$ nm, $\lambda_{em}=419$ nm))

1.4. Objectifs de recherche

Les résultats préliminaires ont démontré que l'efficacité de fluorescence de l'adduit thiolé du composé **2** est suffisamment grande pour être visible dans des concentrations diluées de l'ordre de 10^{-5} M à 10^{-6} M et dans un solvant H₂O/DMSO 9:1. Ces conditions de concentrations et de solvants sont adéquates pour faire des études protéiques telles que décrites précédemment. Le fluorogène pourra donc être utilisé directement, sans avoir à apporter de modifications sur sa structure. Par contre, la fluorescence de l'adduit thiolé **1** est beaucoup moins bonne. Ainsi, un des premiers objectifs de recherche consiste à augmenter l'efficacité de fluorescence de l'adduit thiolé du composé **1**. Nous tenterons donc d'augmenter l'efficacité de fluorescence en exploitant une approche qui vise à greffer un groupement électroattracteur ou électrodonneur sur le cœur de coumarine. De plus, nous étudierons l'impact du changement du cœur fluorescent sur le rendement quantique de la molécule. La synthèse sera présentée au chapitre 3 et la figure 1.16 montre les molécules cibles.

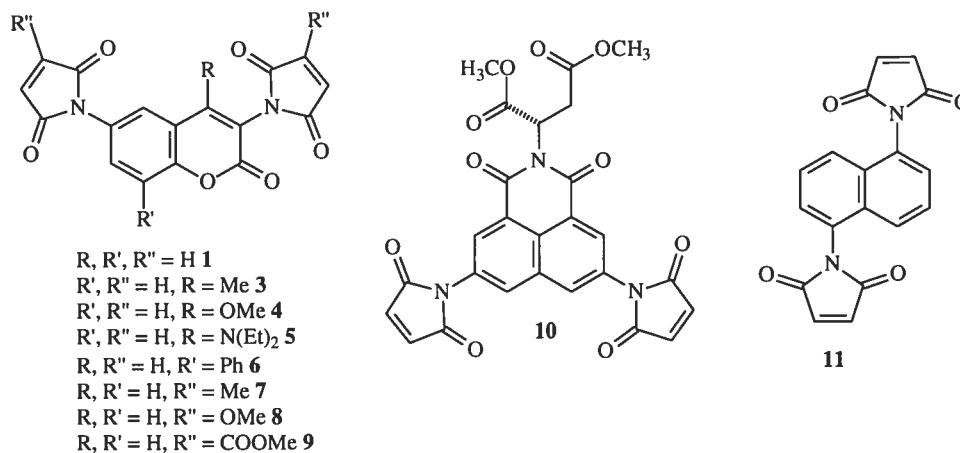


Figure 1.16 Molécules cibles pour l'optimisation de fluorescence de l'adduit thiolé de

1.

En gardant à l'esprit que nous désirons élaborer un nouvel outil biochimique, nous étudierons l'influence du pH et de la température sur la réaction, dans le but de vérifier si elles sont compatibles avec les conditions protéiques. De plus, un calcul du rendement quantique devra être fait sur chaque structure afin de mieux comparer leur efficacité de fluorescence les unes avec les autres. Les résultats obtenus figurent au chapitre 4.

Par la suite, il sera important de construire et purifier une protéine avec deux cystéines de distances préétablies. Cette même distance doit être constante et facilement mesurable. Pour ce faire, nous avons choisi de travailler avec l'hélice α de la protéine Fos. Les deux cystéines peuvent alors être séparées d'un tour, de deux tours... pour donner respectivement des distances de 5 Å, 10 Å... Nous avons arbitrairement choisi de les placer à une distance de 10 Å tel que présenté à la figure 1.17. Ainsi, nous devrons étudier l'efficacité de la liaison entre le fluorogène de 10 Å et la protéine purifiée. Nous étudierons également le comportement d'un fluorogène plus grand (15 Å) sur la protéine Fos (10 Å). De plus, afin d'avoir le maximum de rigueur, plusieurs tests contrôles devront être effectués. En effet, nous avons convenu que la protéine monocystéinée devra également être exprimée afin de vérifier s'il n'y a pas de fluorescence inadéquate (créée par la liaison d'un maléimide avec la protéine

et du deuxième maléimide avec une molécule de solvant ou même d'une deuxième protéine). Lorsque toutes ces étapes seront complétées, il sera possible d'étudier la liaison du fluorogène sur un lysat cellulaire afin d'être en mesure de vérifier la sélectivité de la liaison. Nous saurons alors si le type de marquage mérite d'être classé de deuxième génération (capable de sélectivité *in vitro*).

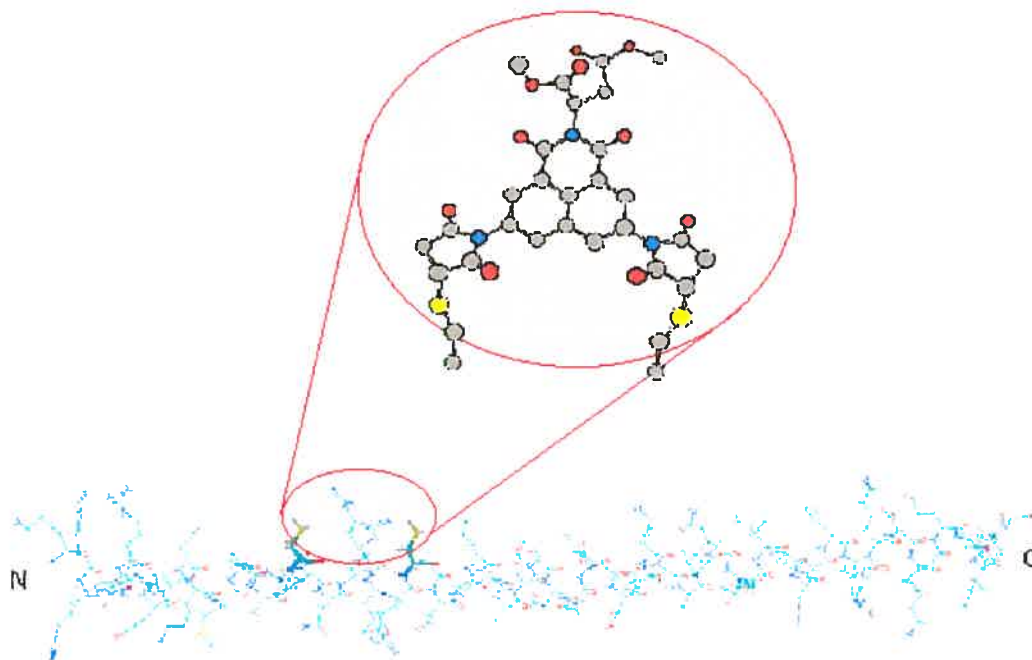


Figure 1.17 Représentation de la liaison fluorogène-protéine de distance correspondante.

Ensuite, une étude de cytotoxicité sera faite afin de savoir si le fluorogène est toxique pour une cellule. Dans de pareils cas, il serait impossible de faire une étude *in vivo*. Par contre, si la molécule n'est pas toxique, les études cellulaires pourront être réalisées. Il serait même très intéressant et pertinent de vérifier si une localisation cellulaire est possible.

Une discussion sur des améliorations possibles sera abordée dans la Section des projets futurs (chapitre 7). Par la suite, les composés chimiques et les protéines seront caractérisés dans la Section expérimentale (chapitre 8).

En résumé, les études antérieures, (au niveau de la maîtrise) ont permis d'élaborer des structures fluorogènes. Les présentes recherches tenteront de pousser le potentiel de ces structures jusqu'au stade de marqueur protéique de troisième génération (capable de sélectivité *in vivo*).

CHAPITRE 2

Fluorescence

2. Quelques notions de fluorescence

Nous avons discuté en introduction du fait que le composé **1** possède une faible fluorescence, ce qui rendrait des études protéiques difficiles. Ainsi, il sera important de faire des modifications structurales de **1** pour la rendre plus fluorescente. Pour y parvenir, il faut être en mesure de bien comprendre les facteurs qui influencent la fluorescence.

2.1. Définition de la fluorescence

Toute forme d'émission de lumière provenant d'une excitation d'un état électronique moléculaire porte le nom de luminescence. Celle-ci se divise en deux grandes catégories selon la nature de l'état excité : la fluorescence et la phosphorescence.

La fluorescence est possible lors de la relaxation d'un électron excité dans un état singulet. Les électrons non pairés sont alors de spins opposés. Par conséquent, la molécule pourra se relaxer sans inverser de spin et ce, de manière très rapide. En effet, le temps de vie typique d'une telle excitation est de l'ordre d'une dizaine de nanosecondes⁵⁶.

D'autre part, la phosphorescence est une émission de lumière provenant d'un état excité sous forme triplet. Les spins des électrons non-pairés sont alors les mêmes. La transition vers l'état



Figure 2.1. Professeur Alexander Jablonski (1898-1980). Tiré de « Principles of Fluorescence Spectroscopy »⁵⁶

fondamental est alors interdite puisqu'elle implique une inversion de spin et la vitesse d'émission est lente. La phosphorescence implique une relaxation de l'ordre des millisecondes, voire même des secondes⁵⁶.

Les processus qui se produisent suite à l'absorption d'un photon par une molécule sont illustrés par un diagramme de Jablonski (voir figure 2.2), en l'honneur du père de la spectroscopie de fluorescence, le professeur Alexander Jablonski^{83,84}.

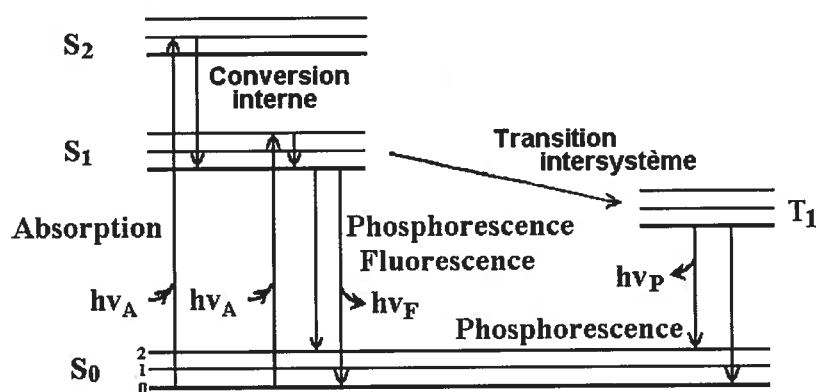


Figure 2.2. Diagramme de Jablonski, tiré de «Principles of Fluorescence Spectroscopy».⁵⁶

Ce diagramme montre l'état fondamental (S₀), ainsi que le premier et le second niveau excité singulet (S₁ et S₂ respectivement). Pour chacun de ces états électroniques, le fluorophore peut exister sous plusieurs niveaux vibrationnels notés par 0, 1, 2, etc.

Suite à l'absorption de lumière, plusieurs processus peuvent avoir lieu. Un fluorophore est très souvent excité à des niveaux énergétiques supérieurs à S₁ ou S₂. Il s'ensuit une relaxation au niveau vibrationnel fondamental de S₁, processus appelé la conversion interne. La fluorescence est normalement associée à la relaxation radiative de l'état énergétique S₁ à celui de S₀.

Une molécule à l'état singulet (S₁) peut également inverser un spin pour

adopter un état triplet (T_1) par un phénomène appelé : transition intersystème. Cette étape est interdite et donc souvent moins efficace que la fluorescence. Par contre, les molécules portant des atomes lourds facilitent les transitions intersystèmes⁵⁶. La phosphorescence est une relaxation de l'état T_1 à l'état fondamental.

2.2. Déplacement de Stokes

En 1852, Sir G.G. Stokes^{85,86,87} (voir figure 2.3) mena une expérience sur les quinine. Il se rendit compte que la lumière du soleil passée à travers un filtre spécifique offrait une couleur bleue (400 nm). Par contre, lorsque ce même rayon lumineux bleu traversait une solution de quinine, celui-ci est absorbé, puis réémis sous la forme d'un rayon lumineux jaune (450 nm). La preuve était alors faite qu'une molécule peut absorber à une certaine longueur d'onde, puis réémettre à une toute autre valeur. De ce fait, l'énergie perdue entre l'excitation et l'émission est universellement observée pour toutes les molécules fluorescentes en solution. Ce changement de longueur d'onde porte le nom de déplacement de Stokes. Une cause du déplacement de Stokes est la relaxation rapide au plus bas niveau vibrationnel de S_1 (revoir figure 2.2). De plus, le fluorophore retombe généralement sur le plus haut niveau énergétique de S_0 . Le résultat est une perte d'énergie d'excitation par la thermalisation d'un excès d'énergie vibrationnelle. Le déplacement de Stokes peut être dû à l'effet de solvant, à l'état excité de la réaction, à la formation de complexe et/ou au transfert d'énergie.



Figure 2.3. Sir George Gabriel Stokes (1819-1903). Tiré de « Principles of Fluorescence Spectroscopy »⁵⁶

2.3. Effet d'extinction de fluorescence

L'intensité de la fluorescence peut être altérée par une grande variété de processus. Une telle perte de l'intensité est appelée l'effet « quench. » Elle peut se produire par plusieurs procédés. Il peut, entre autres, s'agir d'un « quench » par collisions. Ceci se produit lorsque le fluorophore à l'état excité est désactivé en présence d'une autre molécule en solution. Le fluorophore peut également se lier à une autre molécule pour former un complexe non fluorescent. Quel que soit le procédé utilisé (par collision, liaison ou autre⁸⁸), le résultat net est toujours la diminution ou la perte de l'intensité de fluorescence basale. Les conditions pour qu'une molécule fluoresce bien sont :

- L'absence de désactivateur de fluorescence.
(ex : atomes lourds, fonction carbonyle...)
- La formation d'un système de rigidité minimale, car la torsion d'une molécule désactive la fluorescence.
- La présence d'un important réseau de conjugaisons et/ou d'aromaticités.

2.4. Orbitales moléculaires et effet d'atténuation par les maléimides

L'élaboration des fluorophores dans ce projet a été réalisée en fonction des distances entre les deux groupements réactionnels (maléimides), mais également en fonction de leurs propriétés particulières. Les maléimides sont des groupements qui réagissent de manière très spécifique avec les bases molles comme le soufre⁸⁹. Ainsi, la présence de méthanol ou de phosphate (présent dans les tampons) n'affectera pas sa double liaison. De plus, sachant que toutes les orbitales σ sont remplies et de plus

basse énergie que les orbitales π , et en gardant à l'esprit que les aromatiques sont très stables, donc de faible niveau énergétique, il est possible de schématiser les orbitales frontières où les électrons sont susceptibles de traverser la barrière des orbitales liantes. L'orbitale $\pi_{C=O}$ d'un carbonyle non-conjugué est généralement de plus haute énergie que les orbitales non-liantes (n) des doublets d'électrons libres de l'oxygène (voir figure 2.4b). Conséquemment, l'état excité de plus basse énergie de ce fluorophore est du type $\pi \rightarrow \pi^*$ c'est-à-dire qu'un électron est promu de l'orbitale $\pi_{C=O}$ à l'orbitale $\pi^*_{C=O}$. Pour ce genre d'état excité, la compétition entre la fluorescence et la transition intersystème favorise généralement le processus de fluorescence^{56,90}.

À l'opposé, l'orbitale $\pi_{C=O}$ d'un carbonyle conjugué est généralement de plus basse énergie que les orbitales non-liantes (n) (voir figure 2.4a). L'état excité de plus basse énergie est alors de type $n \rightarrow \pi^*$, c'est-à-dire qu'un électron est promu d'une orbitale n à l'orbitale $\pi^*_{C=O}$. Cette excitation ($n \rightarrow \pi^*$) et la relaxation ($\pi^* \rightarrow n$) qui se produisent suite à la fluorescence sont interdites, car il n'y a pas de recouvrement entre les orbitales n et π^* . Ainsi, le processus de fluorescence, ici interdit, ne compétitionne pas efficacement avec le processus de transition intersystème. Les composés carbonylés conjugués n'émettent donc pas ou peu de fluorescence^{91,92}.

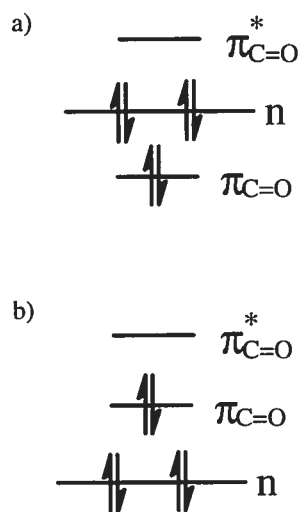


Figure 2.4. Diagramme d'orbitales moléculaires des groupements maléimides. a) non substituées par des soufres. b) disubstituées.

2.5. Facteurs qui augmentent la fluorescence d'un composé

Les études fluorimétriques ont démontré qu'un déplacement de la longueur d'onde d'excitation vers le rouge, entre deux molécules très similaires (mêmes groupements fonctionnels), est révélateur d'une augmentation de la fluorescence alors qu'un déplacement vers le bleu est un signe de l'effet contraire⁵⁶. Ce phénomène s'explique par les équations 3, 4 et 5.

$$E = 1 / l^3 \quad (3) \quad \begin{array}{l} E = \text{énergie} \\ l = \text{longueur de délocalisation d'un électron au cœur} \\ \text{d'une molécule} \end{array}$$

$$E = hc/\lambda \quad (4) \quad h = \text{constante de Planck}$$

$$\text{Donc } l^3 = \lambda/hc \quad (5) \quad \begin{array}{l} c = \text{vitesse de la lumière dans le vide} \\ \lambda = \text{longueur d'onde} \end{array}$$

Il est alors possible de comprendre que ce n'est pas le déplacement vers le rouge qui crée directement une augmentation de fluorescence, mais indique par défaut que la trajectoire électronique de délocalisation augmente. Cela n'est cependant pas suffisant pour comprendre pourquoi « l » influence le rendement quantique (Φ) d'un composé. Le rendement quantique de fluorescence est en fait un rapport entre le nombre de photons émis sous forme de fluorescence et le nombre total de photons excités (voir équation 6). Il sert essentiellement à connaître l'efficacité de fluorescence d'une structure donnée.

$$\Phi = \frac{K_F}{K_F + K_{nr}} \quad (6)$$

Les observations expérimentales ont démontré que plus « l » est grand, plus le coefficient d'extinction molaire (ϵ) est grand⁵⁶. Ce dernier fait la relation entre la concentration et l'absorption pour une longueur d'onde donnée dans l'équation de Beer-Lambert (sera détaillé plus loin). De plus, il existe une équation mathématique qui démontre que ϵ est directement proportionnelle à K_F (constante de désactivation radiative). Ainsi, une augmentation de ϵ augmente K_F , mais pas K_{nr} (constante des processus non radiatifs), car la structure est la même, les rotations sont les mêmes, les

collisions également. Sachant que le rendement quantique se mesure par l'équation 6, il est possible de conclure qu'un déplacement vers le rouge est révélateur d'une plus grande fluorescence.

La méthode la plus facile pour mesurer un rendement quantique est d'utiliser un standard (voir tableau I)⁹³. En effet, les longueurs d'onde optimales et le rendement quantique pour un fluorophore connu et dans un solvant donné y sont répertoriés. Ainsi, en fonction de la longueur d'onde de notre fluorophore d'intérêt, il sera possible de choisir le bon standard et de procéder à des comparaisons. La marche à suivre ne sera pas décrite ici puisque les rendements quantiques de plusieurs fluorogènes ont été réalisés dans le cadre de nos recherches et un exemple complet sera détaillé au chapitre 4.

Tableau I. Caractéristique fluorimétrique des standards les plus communs.

Composés	Solvant	λ_{exc} (nm)	T (°C)	Φ
Sulfate de Quinine	0.1 M H ₂ SO ₄	350	22	0.577
		366	--	0.53 0±0.23
β -Carboline	1 N H ₂ SO ₄	350	25	0.60
Fluoresceine	0.1 M NaOH	496	22	0.95±0.03
9,10-DPA	Cyclohexane	---	--	0.95
	Cyclohexone	366	--	1.00±0.05
POPOP	Cyclohexane	---	--	0.97
2-Aminopyridine	0.1 N H ₂ SO ₄	285	--	0.60±0.05
Tryptophane	Eau	280	--	0.13±0.01
Tyrosine	Eau	275	23	0.14±0.01
Phénylalanine	Eau	260	23	0.024
Phénol	Eau	275	23	0.14±0.01
Rhodamine 6G	Éthanol	488	--	0.94
Rhodamine 101	Éthanol	450-465	25	1.0
Crésyl Violet	Méthanol	540-640	22	0.54

CHAPITRE 3
Synthèse et caractérisation
de fluorogènes à 10 Å

De façon générale, il a été établi que la forme minimale pour avoir de la fluorescence dans un composé chimique est un groupement électrodonneur pouvant délocaliser ses électrons au sein d'un système conjugué^{56,80}. Ainsi, le fluorophore **12**, par exemple, est une diamine fluorescente puisque chaque amine compétitionne pour résonner dans le même cœur de coumarine (voir figure 3.1). Le composé **13**, quant à lui, a une fluorescence plus grande que dans la cas du composé **12**⁸⁰. Cela peut s'expliquer par la présence d'une amine (celle sur le phényle) qui peut se délocaliser dans trois cycles et ainsi augmenter la valeurs de «*I*» et donc l'intensité de la fluorescence (selon les relations mathématiques 3 et 5 données au chapitre 2).

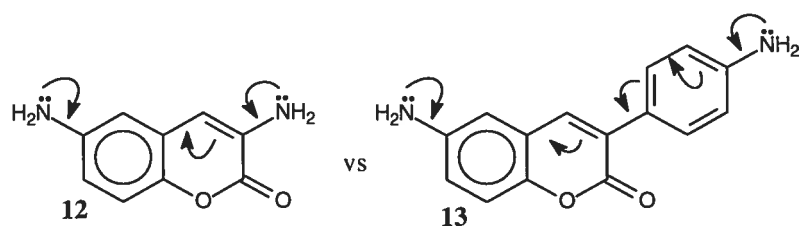


Figure 3.1 Représentation de la compétition de délocalisation dans les structures diaminées **12** et **13**.

Pour leur part, les structures fluorophores **14** et **15** (voir figure 3.2) suivent exactement les mêmes règles décrites précédemment quant à la fluorescence. La seule différence est qu'une compétition existe entre la coumarine (ou phényl coumarine) et le carbonyle des succinimides. Le doublet de l'azote possède ainsi deux trajectoires de délocalisation. Une résonance vers les succinimides n'apporte qu'une très faible fluorescence (car «*I*» est très petit) alors que la délocalisation vers la coumarine apporte une fluorescence nettement plus grande. Par contre, la fluorescence de **14** demeure plus faible que **12** puisque cet effet de délocalisation vers les carbonyles du succinimide est toujours présente.

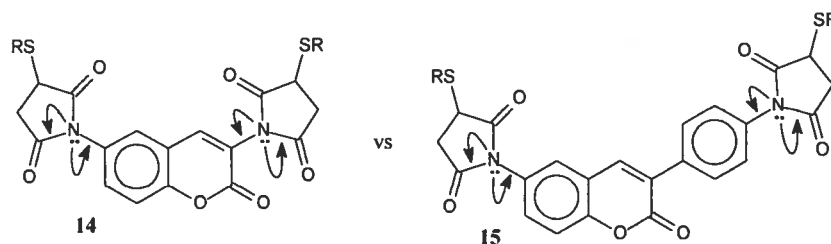


Figure 3.2 Représentation de la compétition de délocalisation dans les structures fluorogènes **14** et **15**.

Afin d'augmenter la fluorescence de ce type de structure, il faudrait être en mesure d'obliger les doublets à se délocaliser davantage vers les coumarines, au dépend des succinimides. Pour ce faire, deux hypothèses sont envisagées. La première consiste à pousser le doublet d'électrons de l'azote à l'aide d'un électrodonneur sur le maléimide et la seconde consiste à tirer les électrons à partir d'un groupement électroattracteur sur la coumarine.

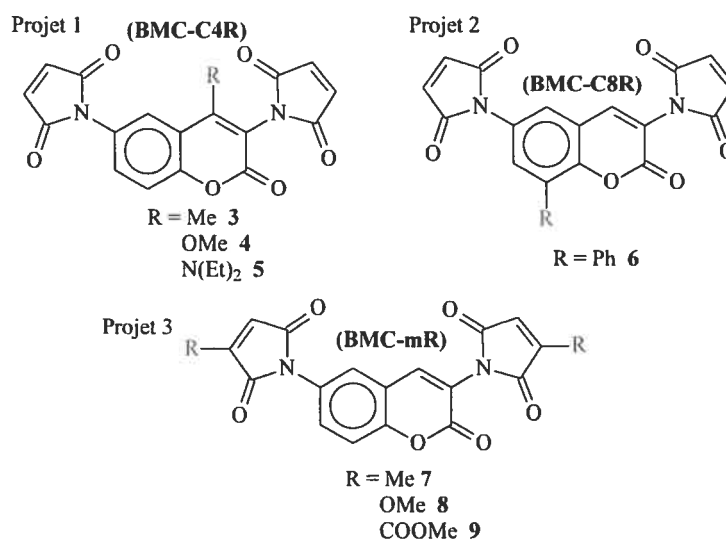


Figure 3.3 Présentation des trois projets élaborés dans le but d'optimiser la fluorescence de l'adduit thiolé du composé **1**

Ainsi, dans le but d'optimiser la fluorescence du produit thiolé du composé **1**, nous avons mis au point trois sous-projets (voir figure 3.3). Le premier consiste à mettre un groupement à la position 4 de la coumarine (une série de composés

bismaléimidocoumarines que nous appellerons les BMC-C4R). Le second est l'ajout de groupements R à la position 8 de la coumarine (les BMC-C8R) et le troisième est une insertion de groupements R sur les maléimides (les BMC-mR). Nous avons donc construit des dérivés de bismaléimidocoumarine, portant soit des groupements électrodonneurs soit des groupements électroattracteurs, en vue de bien visualiser les effets de chacun.

3.1. Synthèse du fluorophore BMC 1

Même si la synthèse du BMC 1 a déjà été rapportée⁸⁰, il est important de la revoir puisque plusieurs des dérivés qui seront construits s'inspirent grandement de cette voie de synthèse. De plus, cette synthèse a dû être répétée afin d'en obtenir une grande quantité pour réaliser des études comparatives de fluorescence avec les nouveaux dérivés synthétisés.

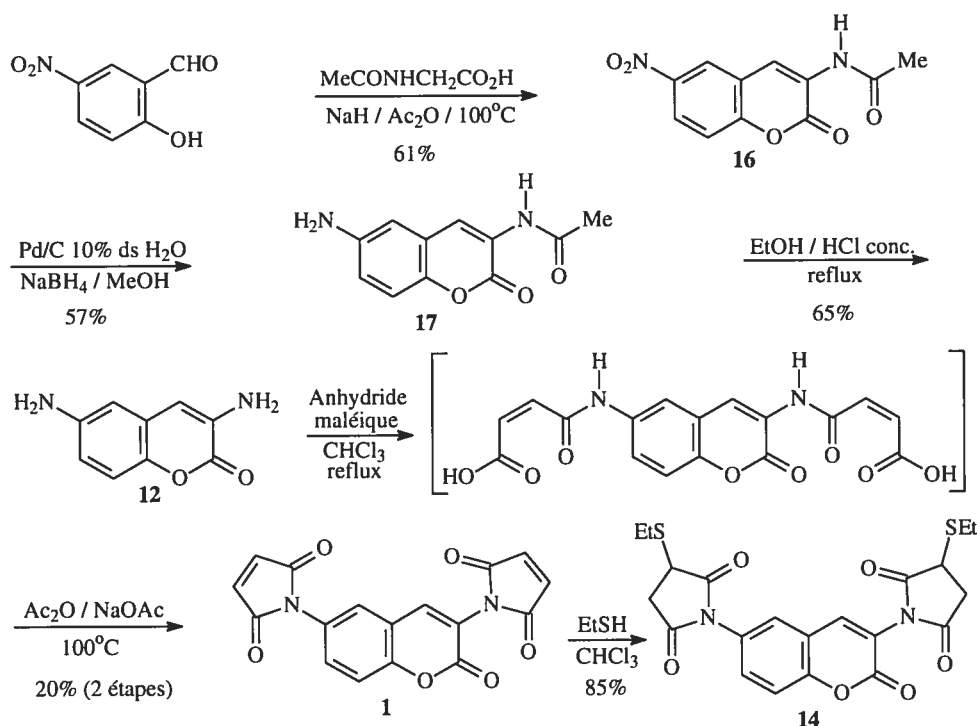


Figure 3.4. Voie de synthèse du 3,6-bis[1H-pyrrole-2,5-dione]2H-1-benzopyran-2-one **1**.

Une revue de la littérature a permis de constater que la synthèse de la 3,6-bismaléimidocoumarine **1** était partiellement connue, soit jusqu'à la synthèse du 3,6-diamino[2H-1-benzopyran-2-one]^{94,95} **12**. Par conséquent, pour élaborer le fluorophore **1**, nous nous sommes inspirés des travaux publiés, puis de l'adaptation d'une autre publication⁷⁹ en ce qui concerne les dernières étapes de synthèse (voir figure 3.4).

La première étape consiste à faire une hétérocyclisation à partir du 2-hydroxy-5-nitrobenzaldéhyde et de la *N*-acétylglycine en présence d'une base (l'hydrure de sodium). Pour qu'une telle réaction puisse avoir lieu, le phénolate du 2-hydroxy-5-nitrobenzaldéhyde doit attaquer la fonction acide de la *N*-acétylglycine. Puisque cette dernière est beaucoup plus acide qu'un phénol ($pK_a = 4,8$ pour l'acide versus 7,2 pour un *p*-nitrophénol), l'équilibre est déplacé vers la gauche ce qui rend la réaction lente et difficile (voir le mécanisme à la figure 3.5). De plus, la nucléophilie du phénolate est diminuée par la présence de la fonction nitro en para (un groupement électroattracteur). Suite à la réaction du carboxylate avec l'anhydride acétique, il est possible de former l'anhydride mixte activé qui peut être attaqué par le phénolate. De plus, une déshydratation est très facile à obtenir puisque la nouvelle double liaison est conjuguée avec tout le système (aromatique et amide), ce qui augmente sa stabilité et diminue, par le fait même, son niveau énergétique. Cette étape est donc facile à réaliser suite à l'élimination du deuxième proton en α de l'amide. La molécule **16** est ainsi obtenue.

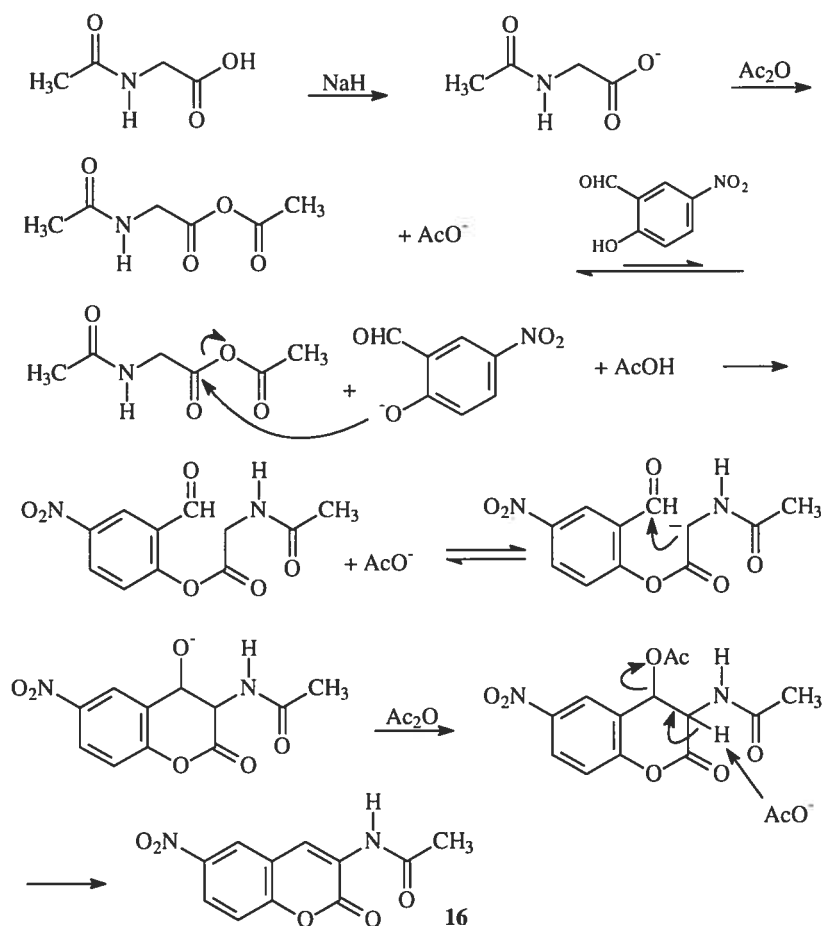


Figure 3.5 Mécanisme de synthèse du 3-acétamido-6-nitro[2H-1-benzopyran-2-one].

La seconde étape de synthèse est la réduction d'une fonction nitro en une fonction amine. Il s'agit ici d'une réaction typique d'hydrogénation où le palladium joue le rôle de support à hydrogène (provenant du borohydrure de sodium et du méthanol). L'approche la plus commune pour réaliser ce type de réduction est l'utilisation d'un ballon d'hydrogène⁸⁹. Or, cette étape de synthèse étant déjà connue, les conditions de la publication ont été respectées en tout point. Fait à noter, un volume important de méthanol doit être utilisé puisque la solubilité du produit de départ et du produit final est faible. Bien que la réaction puisse se réaliser dans le DMF, il est préférable d'utiliser le méthanol puisque le DMF ne permet pas d'éliminer toute trace de Pd/C après filtration sur célite. Or, il est connu que les composés soufrés ont une grande affinité pour les métaux⁹⁶. Le palladium risquerait

donc de fausser les tests subséquents en consommant les thiols plus rapidement que ne le ferait les maléimides. Afin d'optimiser la réaction, la coumarine (en suspension dans le méthanol) doit être ajoutée goutte à goutte offrant ainsi un rendement de 57 %. Si cette condition n'est pas respectée, les rendements n'excéderont pas les 20 %.

La troisième étape est la déprotection du groupement *N*-acétyle de la molécule **17** à l'aide d'acide chlorhydrique concentré et d'éthanol dans un rapport (2 : 1). Il faut souligner ici que la fonction lactone n'est pas clivée puisque l'hydrolyse de cette fonction aurait pour effet d'augmenter le niveau énergétique de la molécule en brisant l'aromaticité, ce qui est, bien entendu, défavorable (voir figure 3.6). Ainsi, l'électrophilie du carbonyle exocyclique est plus grande que celle du carbonyle encyclique, en raison de la résonance. L'éthanol attaque donc uniquement le carbonyle de la fonction amide pour former la fonction amine libre de la molécule **12** et de l'acétate d'éthyle. Le rendement de cette réaction est ainsi évalué à 65 %.

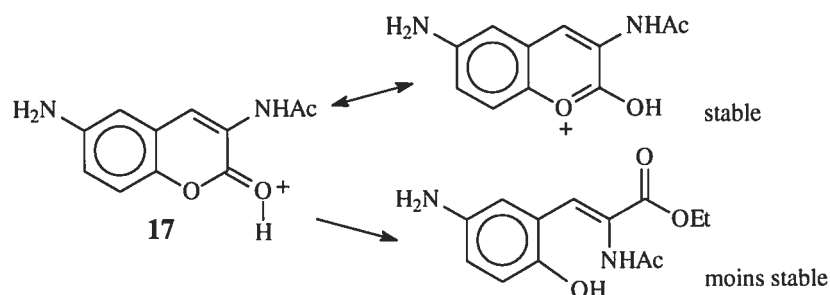


Figure 3.6. Représentation de la stabilité de la lactone conférée par l'aromaticité de la molécule.

La quatrième étape consiste en l'attaque du doublet de chacune des fonctions amines sur un carbonyle de l'anhydride maléique. Suite à cette attaque, l'hétérocycle peut s'ouvrir pour laisser place à deux nouveaux groupements fonctionnels: une fonction amide et une fonction acide. De plus, il faut spécifier que la double liaison de l'anhydride maléique possède une configuration *cis*, ce qui est essentiel pour l'étape suivante. Puisqu'aucune isomérisation ne peut avoir lieu⁸⁰, cette configuration est conservée au cours du mécanisme. Toutes ces étapes de réaction doivent se

réaliser également sur la deuxième fonction amine pour que la réaction soit complète.

Puisque les seules bases du milieu sont les fonctions amines et que celles-ci ont des doublets délocalisés dans un cycle aromatique, la réaction n'est possible qu'en chauffant à reflux pour une période d'environ 36 heures. En effet, si la réaction est laissée pour une durée moindre, le rendement de la réaction chute dramatiquement. Par exemple, douze heures de reflux offrent un rendement global de 5 % (Cette molécule n'est pas isolée pour des raisons de commodité de synthèse).

La dernière étape est la cyclisation pour ainsi former des maléimides. Celle-ci est possible après l'attaque du doublet de l'amide sur le carbonyle de la fonction anhydride. L'acétate de sodium est utilisé pour arracher l'hydrogène porté par l'azote. Par la suite, une molécule d'acétate est régénérée (pour cette raison celle-ci est présente en quantité catalytique) après l'expulsion par la fonction alcool. Cette étape finale est délicate puisqu'un chauffage inapproprié peut dégrader la molécule (à plus de 110°C) ou simplement n'induire aucune réaction (à moins de 90°C). Le rendement est donc optimum à 100°C (bien que la réaction n'offre qu'un rendement de 20 % pour les deux étapes).

Cette synthèse a donc été effectuée avec un rendement global de 5 %.

3.2. Tentatives des voies de synthèse des BMC-C4R

La section qui suit ne démontrera malheureusement pas l'obtention de BMC-C4R puisqu'une étape de synthèse commune à tous les groupements R essayés empêche la formation de la coumarine. Cette étape sera décrite en détails, du point de vue mécanistique, à la section 3.2.4. Cette partie est toutefois présente puisqu'elle permettra de mettre en évidence les raisons qui empêchent la synthèse totale des BMC-C4R d'avoir lieu.

3.2.1. Tentative de synthèse du fluorogène BMC-C4Me

La première étape de synthèse consiste en une nitration du 2-hydroxyacétophénone à la position 5 spécifiquement (voir figure 3.7). Cette étape de synthèse est connue en littérature^{97,98} et doit être absolument réalisée dans l'acide acétique (et non dans l'acide sulfurique) afin de ne pas ajouter une deuxième fonction nitro à la position 3.

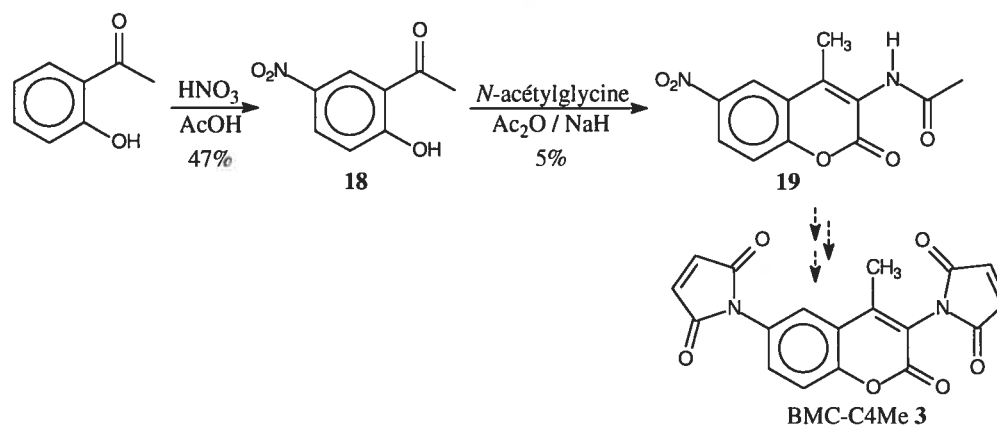


Figure 3.7 Voie de synthèse du BMC-C4Me

La seconde étape consiste à former la coumarine exactement de la même manière que pour le composé **16** illustré à la section 3.1. La différence ici est la diminution importante du rendement qui est passé de 61 % (lorsque R=H) à 5 % (lorsque R=Me). Le faible rendement obtenu dès la seconde étape de réaction nous a poussé à analyser les causes afin de mieux comprendre le phénomène (section 3.2.4). De plus, la synthèse n'offrant qu'un très faible rendement de réaction, ce sous projet a avorté plus rapidement qu'escompté.

3.2.2. Tentative de synthèse du fluorogène BMC-C4OMe

La synthèse de cette molécule ressemble beaucoup à celle décrite plus haut. La différence réside dans la première étape: la nitration. Les études ont démontré que la nitration d'un 2-hydroxy-benzaldéhyde ou d'un hydroxy en α d'une cétone mène

exclusivement à la nitration en position 5^{97,98}. Par contre, la présence d'un ester (comme dans ce cas, voir figure 3.8) mène à la formation de deux produits ; le 5-nitro et le 3-nitro dans un rapport de 2 :1. Ceci n'est pas un problème en soi puisque les deux molécules sont facilement séparables en ayant recours à une purification sur gel de silice.

En ce qui concerne la deuxième étape de synthèse, la formation de la coumarine s'est avérée très difficile, n'offrant que des traces du produit attendu. Cette fois encore, la molécule finale visée n'a pu être obtenue en raison des difficultés rencontrées lors des étapes intermédiaires de synthèse.

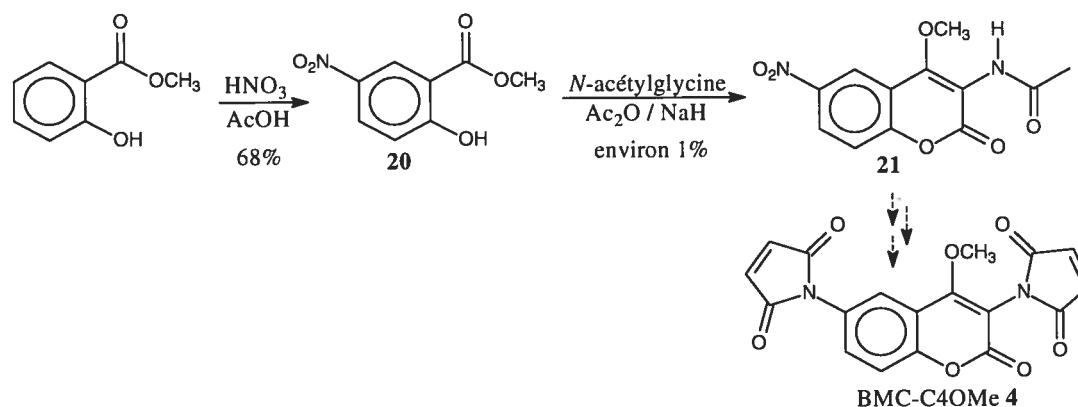


Figure 3.8 Voie de synthèse du BMC-C4OMe

3.2.3. Tentative de synthèse du fluorogène BMC-C4N(Et)₂

La synthèse de ce composé utilise l'intermédiaire **20** obtenu à la section 3.2.2. Il s'agit ensuite de faire une amidation⁹⁹ afin d'obtenir la diéthylamide tel que démontré ci-bas (voir figure 3.9).

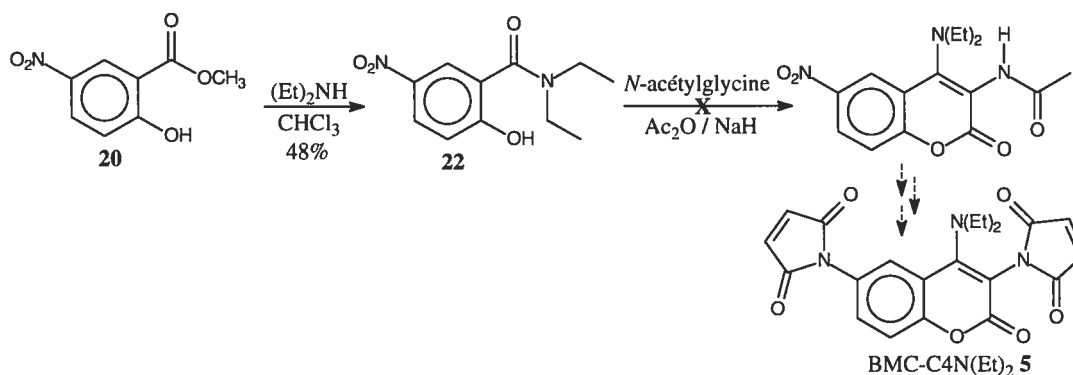


Figure 3.9 Voie de synthèse du BMC-C4N(Et)₂.

Dans le cas de cette synthèse, la seconde étape a été complètement impossible à réaliser. Les explications sont fournies à la Section 3.2.4.

3.2.4. Analyse des résultats du projet 1 (BMC-C4R)

Afin de mettre en évidence les résultats mitigés du projet des BMC-C4R, il est possible de se référer au tableau II. Celui-ci fait référence à l'étape de cyclisation (formation de la coumarine) ou l'on peut constater que le rendement de la réaction est étroitement lié au caractère électrophile du carbonyle portant le groupe R.

Tableau II. Visualisation de l'effet d'un groupement R sur la cyclisation.

Caractère électrophile du carbonyle ↑	Nature de R	Température (°C)	Rendement (%)
	H	0, 25 ou 100	60
	CH ₃	0, 25 ou 100	5
	OCH ₃	0, 25 ou 100	trace
	N(CH ₂ CH ₃) ₂	0, 25 ou 100	0

Ainsi, tel que montré à la figure 3.10, plus R est électrodonneur par résonance, plus le δ^+ du lien C=O est faible et plus la réaction est difficile. L'attaque pour former l'hétérocycle est défavorisée, voir même impossible, ce qui empêche la cyclisation d'avoir lieu.

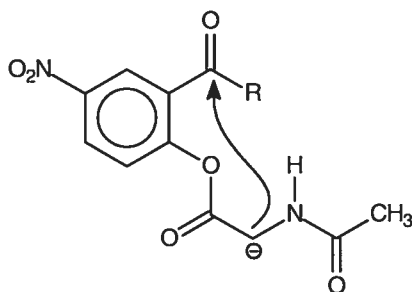


Figure 3.10 Étape clé de la formation de la coumarine.

Fait à noter, les réactions ont été réalisées à 0 °C, à la température de la pièce et à 100 °C pour chacune de ces réactions et le rendement n'a que très peu varié.

Il est vrai que le projet aurait pu être réalisé par d'autres approches de synthèse. Par contre, nous avons choisi de mettre plus d'emphase sur les autres projets puisque celui-ci était le moins prometteur. En effet, lors des tests protéiques, il aurait été possible que la protéine se lie difficilement à la structure fluorogène. En effet, le groupement R aurait pu créer de l'encombrement stérique et donner, par le fait même, un faux négatif (voir figure 3.11). Cette section a tout de même été présentée afin de mettre en évidence les difficultés de synthèse tel que démontré plus haut.

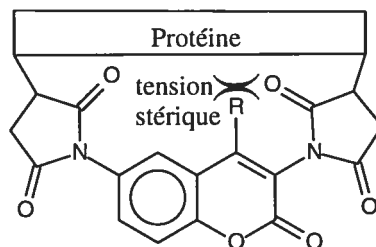


Figure 3.11 Visualisation de la tension stérique potentielle entre les protéines et le groupement R du BMC-C4R.

3.3. Tentatives de voies de synthèse du BMC-C8R

Tel que décrit plus haut, une série de groupements R à la position 4 de la coumarine présente le désavantage d'une possible tension stérique entre ces mêmes groupements R et les protéines apposées en interaction avec la structure fluorogène. Il est à noter que des substituants à la position 5 présentent exactement les mêmes

risques d'encombrement. Ainsi, il reste la possibilité d'effectuer des substitutions à la position 7 et/ou 8. Par souci de commodité de synthèse, notre choix s'est porté sur la position 8 (la position 1 étant ortho directrice lors de la synthèse).

3.3.1. Voie de synthèse du BMC-C8Ph

L'ajout d'un groupement électroattracteur (Ph) à la position 8 a pour rôle d'attirer (par effet inductif) les doublets de l'azote à l'intérieur de la coumarine, au dépend des maléimides (ou succinimides). Bien que le composé final ne soit pas connu en littérature, il s'inspire de la synthèse du BMC (Voir figure 3.12). De plus, la première étape est connue de la littérature¹⁰⁰.

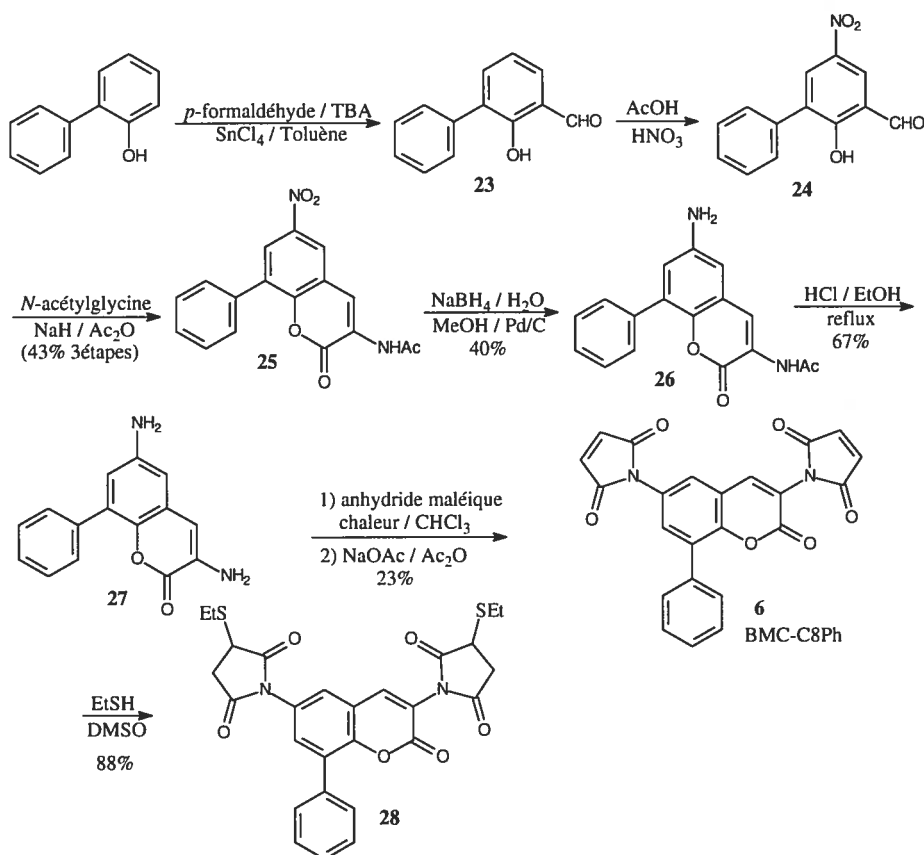


Figure 3.12 : Voie de synthèse du BMC-C8Ph.

L'addition d'une fonction aldéhyde à partir d'un phénol et de *p*-formaldéhyde se réalise toujours en position ortho puisque le SnCl_4 fait une liaison avec l'alcool et permet donc un rapprochement du formaldéhyde sur le cycle aromatique (voir le mécanisme à la figure 3.13). Le rôle du TBA (tri-*n*-butylamine) est essentiellement de piéger l'acide formé lors de la réaction.

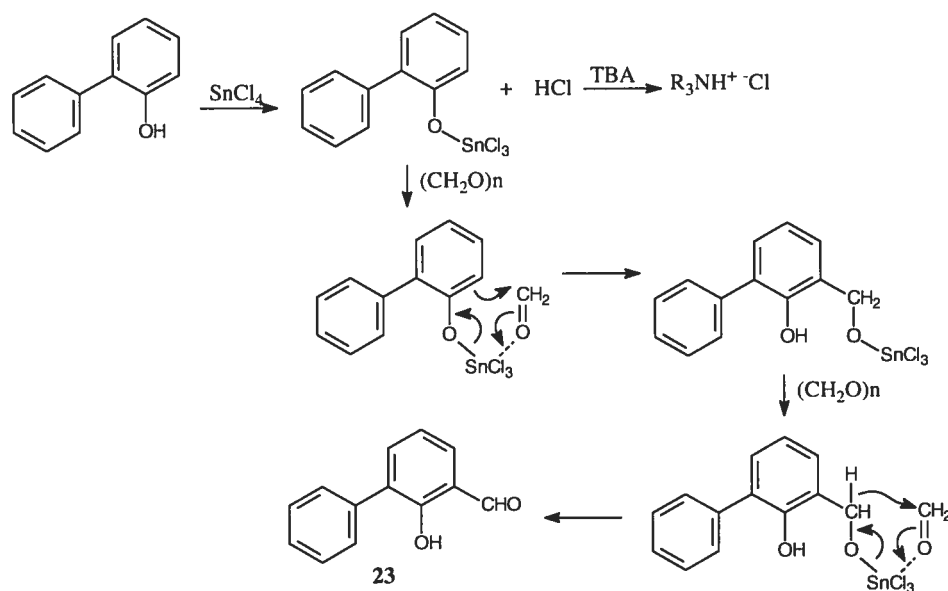


Figure 3.13 : Mécanisme de la formation du 2-hydroxy-3-phénylbenzaldehyde.

Lorsque le rapprochement du *p*-formaldéhyde et du phénol est adéquat, une réaction de type Meerwein-Pondorf-Oppenauer-Verley est alors possible et mène à l'aldéhyde correspondant. Le tout se réalise à reflux et fonctionne relativement bien (environ 70 % de rendement). Le produit n'a pas été purifié. Il est vrai que le brut est très propre, mais possède un mélange du produit de départ (le 30% restant) et celui attendu **23**.

La seconde étape de synthèse est la nitration. Afin de connaître les sous-produits secondaires possibles à obtenir, la nitration a d'abord été effectuée sur le phénylphénol. Il a été observé qu'un groupement nitro a été ajouté en positions 3 et 5, mais que jamais un groupement nitro n'a pu être additionné sur le phényle (groupement R).

Puisque le 2-hydroxy-3-phénylbenzaldéhyde a déjà la position 3 occupée, il va de soi que le groupement nitro ne peut s'additionner qu'à un seul endroit, à la position 5. Suite à l'ajout d'eau et à la filtration, le brut de la réaction est très propre et contient deux produits ; le 2-hydroxy-5-nitro-3-phénylbenzaldéhyde ainsi que le 2-hydroxy-3,5-dinitrophénylbenzène comme produit secondaire dans un ratio de 9:1 respectivement (voir figure 3.14).

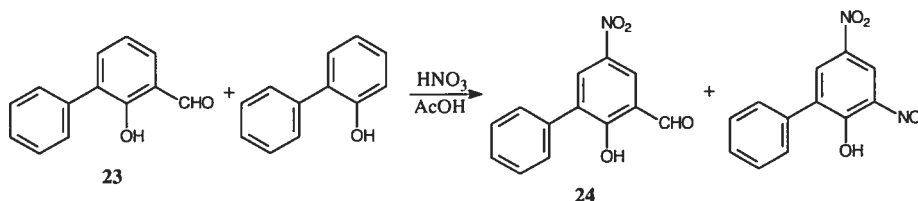


Figure 3.14 Nitration du 2-hydroxy-3-phénylbenzaldéhyde.

Ici, le brut ne sera toujours pas purifié puisque l'étape suivante est la formation de la coumarine. Une des propriétés de ces structures est leur très faible solubilité dans les solvants en général (exception faite du DMSO et du DMF)⁸⁰. En effet, il est possible de constater une différence marquée de solubilité. Dans le cas du dinitro, le produit (très polaire) n'est pas une coumarine et demeure donc soluble. La précipitation et la filtration permettent ainsi d'obtenir le produit pur **25** avec un rendement global pour les trois étapes de 43 %.

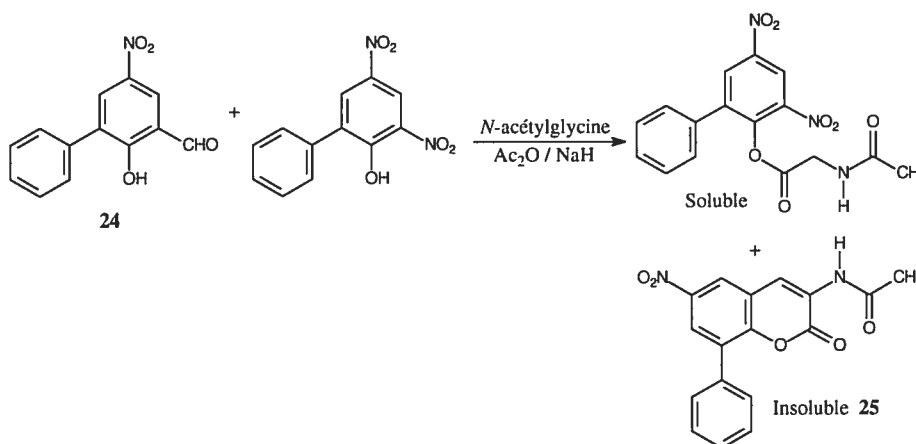


Figure 3.15 Étape de formation de la coumarine **25**.

L'étape suivante est la réduction de la fonction nitro en une fonction amine. Il s'agit ici d'une réaction typique d'hydrogénation. Cette étape de synthèse est déjà connue puisqu'elle a été faite dans la synthèse de la molécule **1**. Bien que la réaction puisse se réaliser dans le diméthylformamide, il est préférable d'utiliser le méthanol pour les mêmes raisons que décrites précédemment (trace de Pd/C même après filtration) (Section 3.1). Afin d'optimiser la réaction, la coumarine (en suspension dans le méthanol) doit être ajoutée goutte à goutte offrant ainsi un rendement de 40 %. Si cette condition n'est pas respectée, les rendements n'excéderont pas les 20 %.

Par la suite, une déprotection du groupement *N*-acétyle est effectuée à l'aide d'acide chloridrique concentré et d'éthanol dans un rapport (2:1). Ainsi, l'éthanol attaque le carbonyle de la fonction amide pour former la fonction amine libre. Le rendement de cette réaction est ainsi évalué à 67 %.

La quatrième étape consiste en la formation des maléimides, par un mécanisme identique à ce qui a été décrit précédemment (Section 3.1); elle se réalise avec un rendement de 23 % dans ce cas-ci.

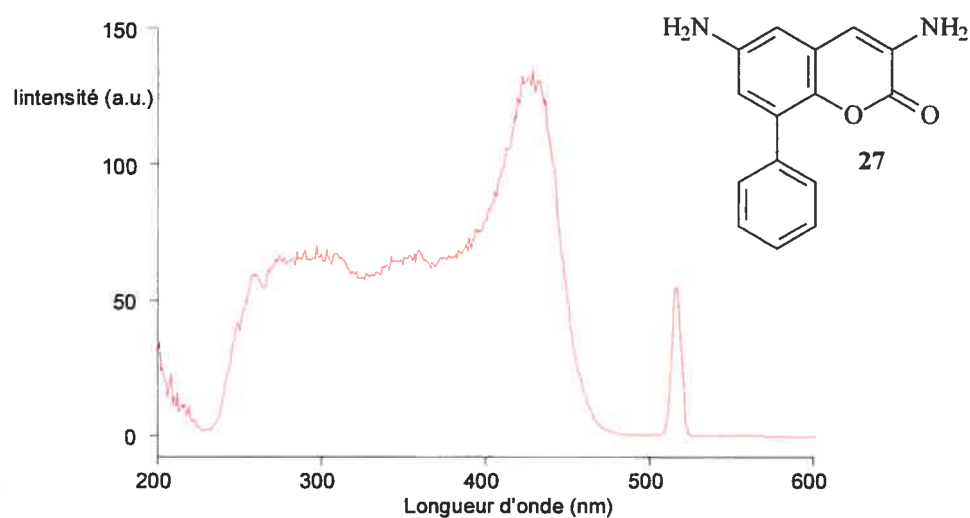
Finalement, le rendement global de la synthèse du BMC-C8Ph s'élève à 3 %.

3.3.2. Tests de fluorescence du BMC-C8Ph

La première étude de fluorescence comparative intéressante à réaliser est celle entre les diamines **12** et **27**. Chaque spectre (voir figure 3.16) a été pris dans le DMSO et à la température de la pièce. Les composés sont étudiés à une concentration de 10^{-3} M. Le spectre d'excitation de **12** n'a pas été présenté puisqu'il est identique à celui de **27** (voir la figure 3.16a). La seule différence est que la longueur d'onde d'excitation de **12** est de 410 nm alors que celle de **27** est de 427 nm. De plus, les longueurs d'onde d'émission de **12** et de **27** sont identiques soit 400-500 nm (figure 3.16 b).

Une telle similitude est possible, car aucun des groupes amino ne peut se délocaliser dans le groupement phényle (méta) et l'effet électroattracteur du groupement aromatique semble avoir très peu d'impact. Effectivement, la résonance du doublet de l'azote de **27** ne semble pas être plus facile que pour **12**. Par conséquent, la valeur « l » dans l'équation de la particule dans la boîte ne varie pas. Ainsi, l'énergie ne varie pas et la longueur d'onde non plus.

a)



b)

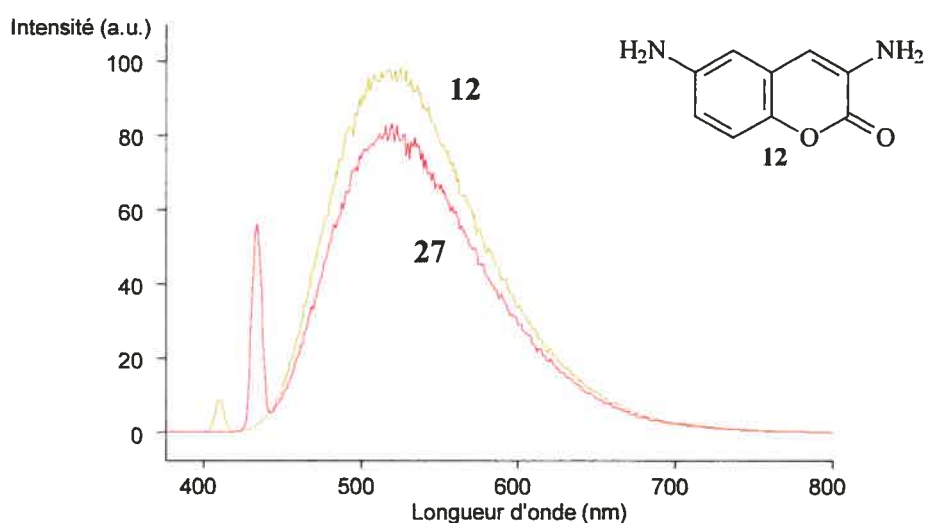


Figure 3.16 a) Spectre d'excitation de **27** et b) spectre d'émission de **12** et de **27**.

Une autre observation intéressante est que l'intensité de fluorescence diminue légèrement lors de l'ajout du groupement phényle (contrairement à ce qui était attendu). Il est probable que la diminution de fluorescence observée pour le composé **27** soit due aux doubles liaisons du phényle. En effet, celles-ci ont la capacité d'être de bons atténuateurs de fluorescence lorsqu'elles ne sont pas impliquées dans la délocalisation des électrons π ⁵⁶.

Il est évidemment facile de conclure que l'élaboration du BMC-C7Ph donnerait une intensité de fluorescence bien plus grande, car les doublets pourraient alors se délocaliser dans le phényle, augmenter la valeur de " λ " et ainsi augmenter la fluorescence. Par contre, il faut se rappeler que la rotation libre du phényl bloque énormément la capacité de délocalisation⁵⁶, ce qui n'augure pas bien pour une optimisation fluorométrique.

La deuxième étude fluorométrique comparative est la variation de fluorescence entre le composé **6** et **28** par simple ajout de thiols (voir figure 3.17). Nous désirons, par cette expérience, vérifier si l'augmentation de fluorescence (lors de l'ajout de thiol) est supérieure ou équivalente à la molécule **14** (donc à la structure qui ne possède pas le groupement phényle). Ces spectres ont été faits à une concentration de 10^{-3} M du composé étudié dans le DMSO et à la température de la pièce. Ainsi, le spectre révèle une longueur d'onde d'excitation de 372 nm et une longueur d'onde d'émission entre 400-550 nm. À titre de comparaison, la longueur d'onde d'excitation de **14** est de 367 nm.

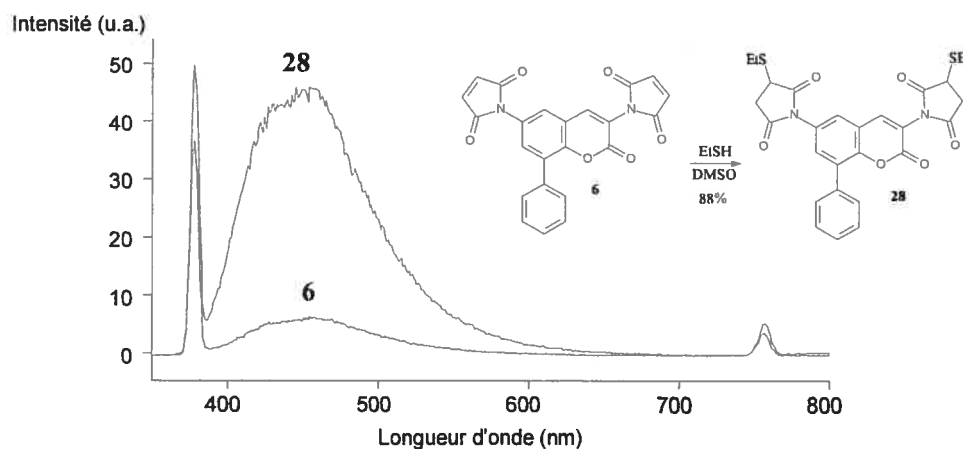


Figure 3.17 Spectre d'émission de **6** rouge et de **28** bleu.

La première observation est un léger déplacement de la longueur d'onde d'excitation vers le rouge pour le composé **28** par rapport à **14**. Ceci nous démontre que le doublet de l'azote de **28** a bien une plus grande capacité à se délocaliser vers la coumarine (au dépend du succinimide) que **14**.

De plus, il est possible de constater une augmentation de fluorescence lors de l'ajout de thiol, ce qui est important pour nos études. De plus, il serait faux d'affirmer qu'une fois la liaison aux thiols complétées, la molécule deviens fluorescente puisque l'absorption des deux produits n'est pas la même et leur λ excitation sont également distinctes. Il serait donc plus juste d'affirmer que la fluorescence apparente est plus grande.

Les résultats sont toutefois décevants puisque l'augmentation de fluorescence n'est pas aussi bonne que nous l'aurions souhaité. En fait, elle est même moins bonne que pour le composé **14**. En effet, lorsque des thiols sont ajoutés à la molécule **1**, une augmentation de fluorescence est observable de l'ordre de 7.2 fois (le ratio est calculé par le rapport de l'intégration de fluorescence). Par contre, l'ajout de thiols sur **6** démontre une augmentation de fluorescence de 6.8 fois (revoir la figure 3.17). De plus, le déplacement vers le rouge démontre clairement qu'un autre phénomène est en cause. Une fois de plus, nous devons conclure que la présence des doubles liaisons

(qui ne sont pas en résonance) sont des atténuateurs de fluorescence⁵⁶. Ainsi, même si le doublet a une plus grande capacité (bien que très faible) à se délocaliser dans la phénylcoumarine, il subit une atténuation de fluorescence. L'excitation est déplacée vers le rouge, mais avec un rendement quantique plus faible.

3.4. Voies de synthèse des BMC-mR

Les projets des Sections 3.2 et 3.3 avaient pour objectif de modifier la fluorescence des structures fluorogènes en changeant la capacité de délocalisation des doublets des azotes via des groupements électroattracteurs ou électrodonneurs sur le squelette de la coumarine. Cette section progresse toujours dans cette voie mais, cette fois, en apportant des modifications sur les maléimides. Bien qu'aucune expérience du même genre n'eut été trouvée en littérature, nous avons tout de même réalisé cette étude puisque les données de fluorescence ont toujours démontré qu'un enrichissement du cycle aromatique en électrons entraîne une augmentation de l'intensité de fluorescence⁵⁶. Par opposition à ce qui a été vu jusqu'à maintenant, un groupement électrodonneur devrait théoriquement augmenter la fluorescence puisqu'il devrait enrichir en électrons le succinimide et donc pousser les électrons du doublet de l'azote vers le cycle aromatique (et inversement avec un groupement électroattracteur). Une discussion plus détaillée sera élaborée dans les sous-sections suivantes.

3.4.1. Voie de synthèse du fluorogène BMC-Me

Les grandes lignes de cette synthèse sont très semblables à celles du BMC puisque seul le maléimide (vendu commercialement) est différent. En effet, le réactif **12** est placé en présence d'anhydride citraconique dans les mêmes conditions que décrites précédemment (voir la Section 3.1). Le rendement de cette réaction est très semblable à ce qui a été vu pour la formation des maléimides, soit de l'ordre de 20 % (voir figure 3.18).

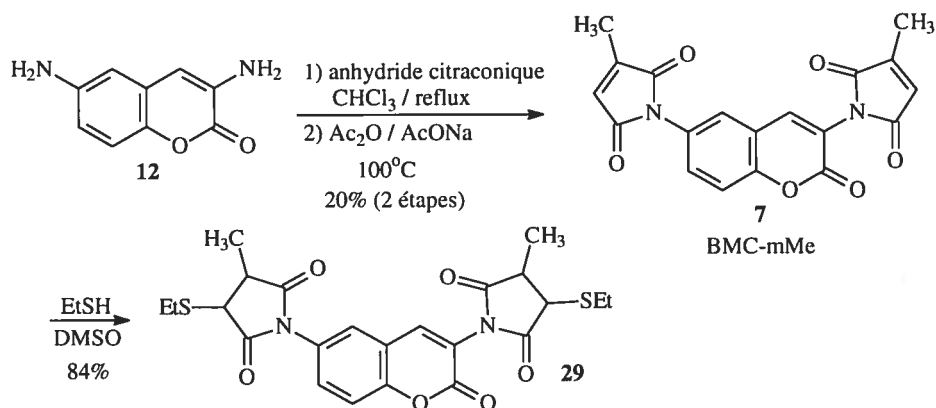


Figure 3.18 Voie de synthèse du BMC-mMe.

3.4.2. Voie de synthèse du fluorogène BMC-OMe

Cette structure est réalisée à partir du même précurseur **12**, mais cette fois, le maléimide devra être construit. Cependant, la synthèse envisagée est déjà connue en littérature¹⁰¹ (voir figure 3.19).

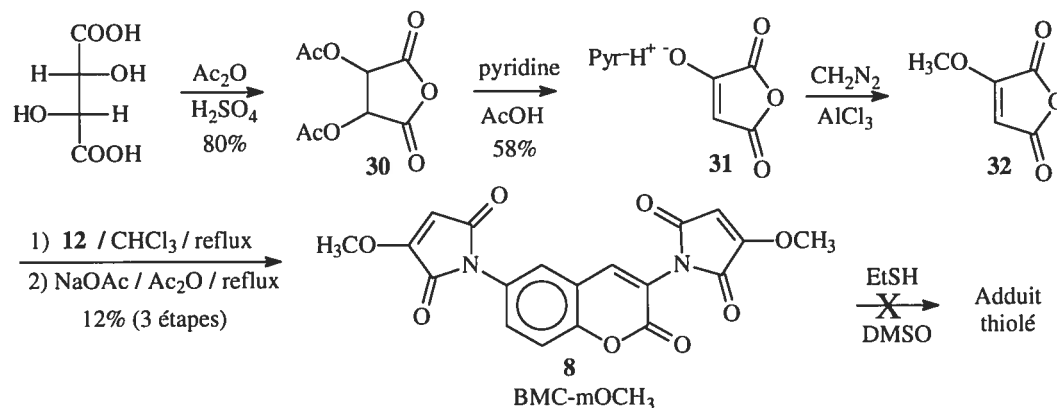


Figure 3.19 : Voie de synthèse du BMC-mOMe.

La présence d'un acide fort, lors de la première étape, épimérise le produit **30** mais cela est sans gravité puisqu'un acétate sera éliminé lors de l'étape suivante pour former une liaison double. Cette deuxième réaction se réalise à l'aide d'une base faible telle que la pyridine. Une étherification peut ensuite avoir lieu en présence de

diazométhane. L'anhydride **32** est alors obtenu et le produit final est synthétisé par le même mécanisme d'attaque du diamine **12** tel que décrit à la section 3.4.1.

Il sera démontré plus tard que la dernière étape de réaction ne fonctionne pas puisque le groupement méthoxy enrichi trop le maléimide et le rend, par conséquent, moins propice à une attaque électrophile.

3.4.3. Voie de synthèse du fluorogène BMC-COOMe

Si l'on désire être en mesure de tirer des conclusions valables avec ce sous-projet, il faut être en mesure de contrôler la fluorescence tant à la hausse qu'à la baisse. Ainsi, le BMC-COOMe est conçu spécifiquement afin de diminuer la fluorescence du composé. Il est vrai que les oxygènes et les doubles liaisons sont en soi déjà des atténuateurs de fluorescence⁵⁶, mais il sera possible d'établir un ratio entre le produit thiolé et non thiolé pour ne connaître que l'impact de l'ester sur le doublet de l'azote.

La synthèse du maléimide modifié **35** (l'anhydride α -carbométhoxy-maléique) est connue en littérature¹⁰² et la voie de synthèse du fluorogène est décrite à la figure 3.20. Par analogie avec les autres voies de synthèse, il est possible de constater que le même intermédiaire diaminé **12** est impliqué. En ce qui concerne la formation de l'anhydride, la synthèse débute avec le diméthyl-L-tartrate placé en présence d'acide périodique. Ce dernier oxyde le diol en aldéhydes par le mécanisme usuel⁸⁹. Le produit ainsi formé **33** est immédiatement placé en présence de diméthylmalonate afin d'obtenir le triméthyléthène-1,1,2-tricarboxylate **34** correspondant. Le composé **34** est remis en solution, sans l'isoler, puisqu'il polymérise très facilement pour former le polyméthylglyoxalate $-(CH(CO_2CH_3)O)_n-$. Même avec toutes les précautions utilisées, le polymère se forme inmanquablement. Toutefois, ceci n'est pas alarmant, car la réaction suivante est chauffée à 130°C spécifiquement pour briser le polymère et former, à nouveau, l'éthylène

tricarboxylate. Cette réaction n'est pas très efficace (46 %). Il faut cependant prendre note que les rendements chutent dramatiquement si l'on utilise un dérivé éthylique ou propionique⁴² au lieu de méthylique.

L'étape suivante consiste à former l'anhydride en chauffant à 160°C en présence de P₂O₅ pour cinq heures. Fait à noter, la chaleur à elle seule a la capacité de former l'anhydride **35** attendue, mais le P₂O₅ aide la réaction en piégeant les sous-produits libérés¹⁰². Les résultats des BMC-mR seront présentés à la section 3.6.

Le rendement global de la synthèse de **36** est évalué à 6 %.

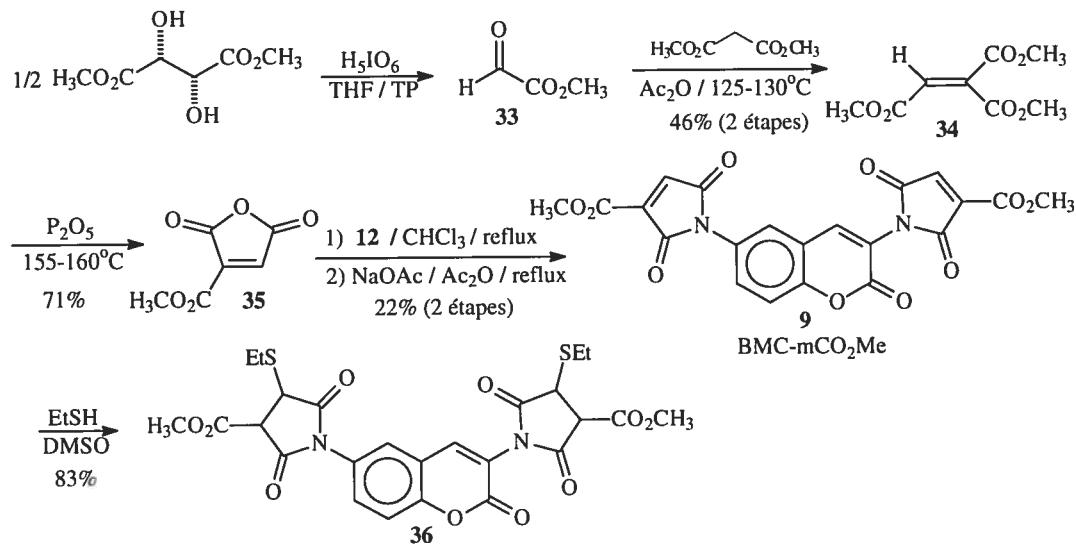


Figure 3.20 Voie de synthèse du BMC-mCO₂Me

La stéréochimie des adduits thiolés n'a pas été étudiée. Une analyse RMN ne démontre toutefois que la présence d'un seul produit (ou plusieurs produits avec des pics superposés). La stabilité des isomères devrait être tellement similaire que la fluorescence des isomères devrait être quasi identique.

3.5. Étude de fluorescence des composés BMC-mR, soit: 1, 7, 9, 14, 29 et 36

Tous les fluorogènes décrits à la section 3.4 ont été placés en présence d'éthanethiol et les produits finaux **14**, **29** et **36** ont été isolés et purifiés. Par la suite, un rapport de fluorescence a été établi afin de visualiser l'impact fluorimétrique des groupements fonctionnels (attracteur ou donneur) ainsi que la modification du squelette coumarine pour un cœur de naphthalène. Les résultats obtenus sont présentés au tableau III.

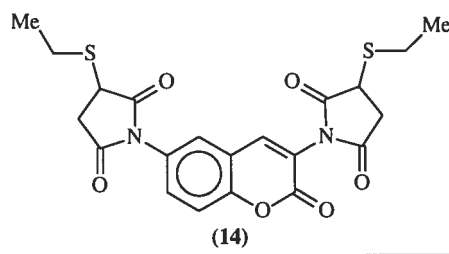


Tableau III. Effets de substitution des groupements du BMC sur les propriétés spectrales pour les fluorogènes et leur adduits correspondants.

Fluorogène	adduit	R	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (fwhm)* (nm)	Déplacement de Stokes	Ratio des I_F
1		H	360	450 (100)	90	7.2
	14	H	351		99	
9		CO ₂ Me	332	447 (100)	115	6.2
	36	CO ₂ Me	336		121	
7		CH ₃	373	455 (100)	82	8.9
	29	CH ₃	373		82	

* fwhm = « full width at half maximum »

La première constatation possible à faire est qu'aucune valeur n'est représentée pour BMC-OMe. Il s'avère que le groupement méthoxy enrichit tellement le malimide en électrons que l'électrophilie devient alors trop faible pour subir une réaction d'addition nucléophile de la part des thiols. Bien que cette donnée soit décevante, il y a plusieurs informations possibles à tirer de ce tableau.

La seconde constatation est la longueur d'onde d'émission de chacun des composés à cœur de coumarine. Elles sont très similaires, voire identiques. Il est également possible de voir que plus le groupement R est électrodonneur, plus la longueur d'onde d'excitation se déplace vers le rouge. La combinaison des deux éléments décrits ci-dessus implique une diminution du déplacement de Stokes avec des groupements de plus en plus électrodonneurs. En prenant ces données une à une, on peut voir que les résultats sont concordants puisque l'hypothèse de départ était que la présence d'un électrodonneur aurait pour effet d'enrichir en électrons le succinimide (et inversement pour les électroattracteurs). La figure 3.21 montre que l'impact d'un tel phénomène serait de favoriser le déplacement des doublets de l'azote vers la coumarine, au dépend du succinimide. De plus, la délocalisation étant beaucoup plus grande dans la coumarine, l'intensité globale de fluorescence devrait être supérieure.

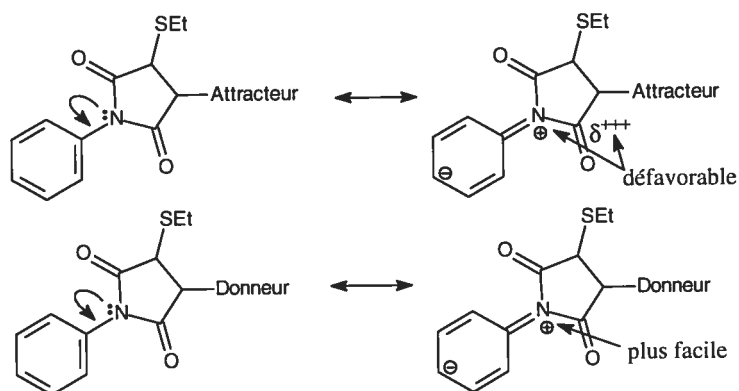


Figure 3.21 Effet des groupements R sur la délocalisation du doublet d'électrons de l'azote.

De ce fait, le tableau montre un rapport de fluorescence qui augmente avec le caractère électrodonneur, mais également un déplacement de la longueur d'onde vers le rouge, symbolique d'une délocalisation plus grande ($\lambda \uparrow$ lorsque $I \uparrow$). De plus, il faut noter que la délocalisation vers la coumarine entraîne une perte considérable de

liberté de mouvement puisque le succinimide devient plan avec la coumarine. Cette rigidification se voit très facilement dans le déplacement de Stokes puisque ce paramètre est inversement proportionnel à la rigidité de la molécule⁵⁶.

Par contre, l'augmentation de fluorescence dans les coumarines n'a pas été aussi importante que nous l'espérons. Il est donc essentiel de travailler avec des fluorogènes à cœur de naphthalène afin d'obtenir le plus grand ratio possible. En effet, nous verrons à la section suivante que ces composés étant parfaitement plan (contrairement aux coumarines), ils offrent une délocalisation plus efficace et un meilleur rendement quantique.

3.6. Synthèses de nouveaux fluorophores portant un cœur de naphthalène.

3.6.1. Voie de synthèse du 1,5-bismaléimidonaphthalène (BMN)

Un des problèmes majeurs du BMC est le manque de planarité. En effet, la portion hétérocyclique empêche les orbitales p de bien se recouvrir, ce qui atténue l'efficacité de la délocalisation⁵⁶. Par le fait même, la trajectoire de délocalisation « l » est moins grande et l'efficacité de fluorescence diminue. Nous avons donc développé en parallèle un fluorophore très semblable au BMC, mais avec un recouvrement orbitalaire optimal. Pour ce faire, nous avons construit le 1,5-bismaléimidonaphthalène tel que montré à la figure 3.21. La synthèse de cette molécule s'avère très courte puisqu'elle implique le 1,5-diaminonaphthalène et l'anhydride maléique, deux produits vendus commercialement.

On remarque que contrairement aux synthèses avec la coumarine, la formation des maléimides sur l'aminonaphthalène est beaucoup plus efficace. En effet, elle offre un rendement de 71 %.

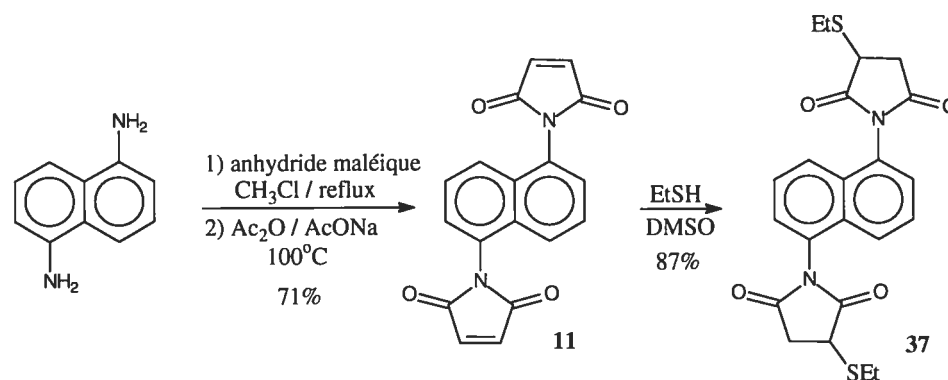


Figure 3.22 Voie de synthèse du 1,5-bismaléimidonaphtalène (BMN) 11.

3.6.2. Voie de synthèse de l'ester diméthylique de l'acide 2-[5,8-Bis-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-1,3-dioxo-H,3H benzo[de]isoquinolin -2-yl]-succinique 10

Nous avons été contraints de construire un nouveau fluorophore à cœur de naphthalène pour des raisons de compatibilités protéiques. En effet, BMN n'est absolument pas soluble dans l'eau ou dans un solvant 9:1 $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (résultats à venir). Cette donnée est très importante en gardant à l'esprit que des tests protéiques devront être réalisés afin de faire un marquage et que ceux-ci ne se font que dans l'eau. Ainsi, notre choix s'est arrêté sur la molécule 10, présentée à la figure 3.22 (Elle a été réalisée avec l'aide de Alain Grandbois, stagiaire lors de la session été 2003).

La première étape de synthèse consiste en une nitration du cœur aromatique et est déjà connue dans la littérature¹⁰³. Il est important de noter que les groupements nitro sont localisés spécifiquement en position β plutôt qu'en position α même si cette dernière position est plus réactive (en absence de substituant). En effet, la présence d'un groupe électroattracteur sur la molécule favorise la substitution en position β ¹⁰³. Par contre, le contrôle de la température est très important pour s'assurer d'une bonne orientation des groupements nitro. La présence de certains sous-produits substitués en α lors de la purification laisse croire que l'augmentation

de la température au-dessus de 10°C permet de franchir la barrière énergétique permettant la substitution en α .

L'étape suivante consiste à coupler le produit obtenu avec le diester de l'acide aspartique. L'étape du couplage est en fait une double addition-élimination classique. La troisième étape de la synthèse a, quant à elle, pour but de réduire les groupements nitro en groupements amine pour permettre le couplage avec l'anhydride maléique menant au produit final **10**. Il est à noter qu'il est préférable de ne pas inverser l'étape de couplage et l'étape de réduction, car le produit aminé ainsi obtenu s'avère être peu stable.

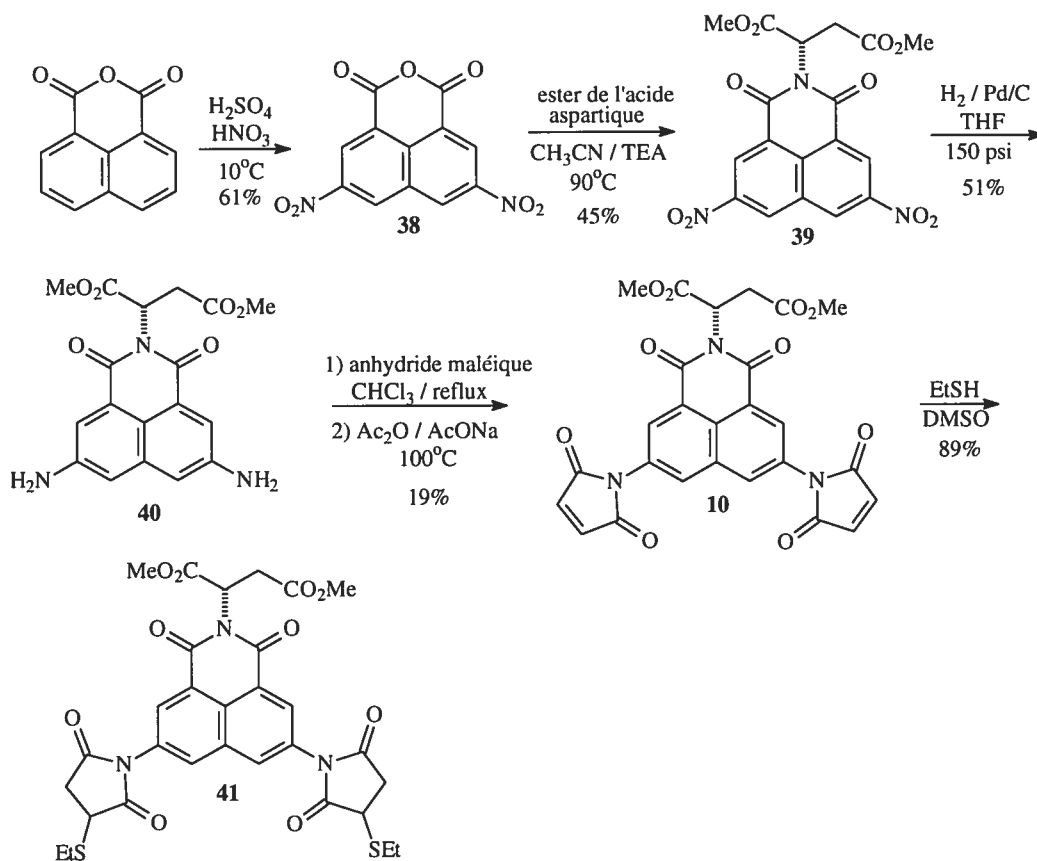


Figure 3.23 Voie de synthèse de l'acide 2-[5,8-bis-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-1,3-dioxo-1H,3H benzo[de]isoquinolin-2-yl]-succinique dimethyl ester **10**.

Le fluorogène **10**, est tout à fait soluble dans les solvants protéiques 9:1 H₂O/DMSO. De plus, le ratio de fluorescence entre ce fluorogène et son adduit demeure très bon (voir les analyses de fluorescence au chapitre 4).

Ainsi, en analysant tous ces résultats expérimentaux, le fluorogène de 15 Å (qui est lui-même soluble dans un mélange 9 :1 H₂O/DMSO) demeure le **2** (avec un cœur de phénylcoumarine), mais le nouveau fluorogène de 10 Å qui est le plus adéquat pour des études protéiques et optimal en terme de rendement quantique est désormais le **10** (avec un cœur de naphthalène).

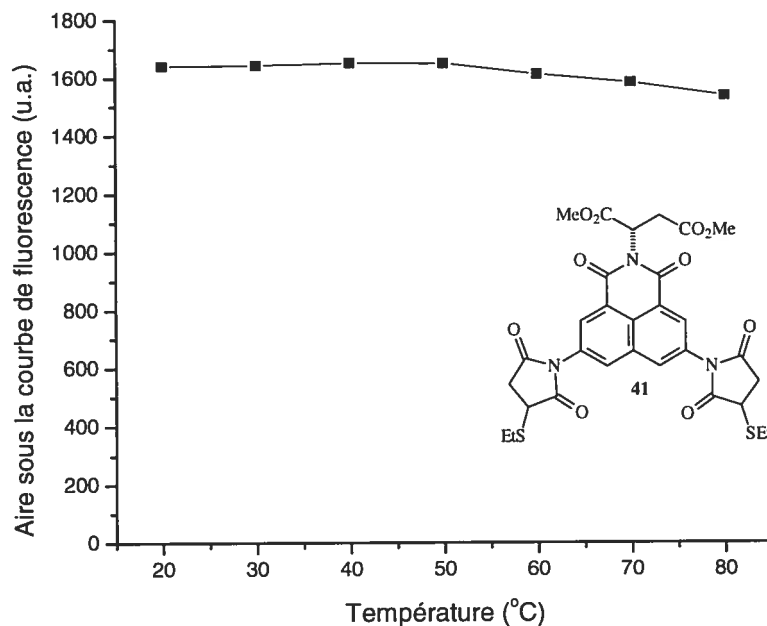
CHAPITRE 4
Caractérisation fluorométrique des
fluorophores 6 et 41

Comme il a été mentionné aux chapitres 1 et 3, plusieurs études de fluorescence ont déjà été réalisées et discutées sur la différence de fluorescence entre un fluorogène et son adduit thiolé correspondant. Au cours de ce chapitre, nous allons faire une étude sur l'effet de la fluorescence en fonction de la température et du pH. Ces données sont particulièrement importantes puisqu'elles pourront nous guider quant aux conditions idéales de réaction. Nous pourrions ainsi les comparer avec les conditions idéales protéiques afin de voir si celles-ci sont compatibles pour réaliser des tests *in vitro* et/ou *in vivo*. Finalement, il sera important de quantifier l'efficacité de fluorescence des molécules optimisées par un calcul du rendement quantique.

4.1. Études de la fluorescence en fonction de la température.

Une expérience très simple a été réalisée en prenant de simples spectres d'un échantillon de **41** à une concentration de 10^{-3} M dans le DMSO à différentes températures. La fluorescence a été quantifiée en mesurant l'aire sous la courbe des scans ainsi obtenus. Par la suite, un graphique a été tracé (voir figure 4.1).

a)



b)

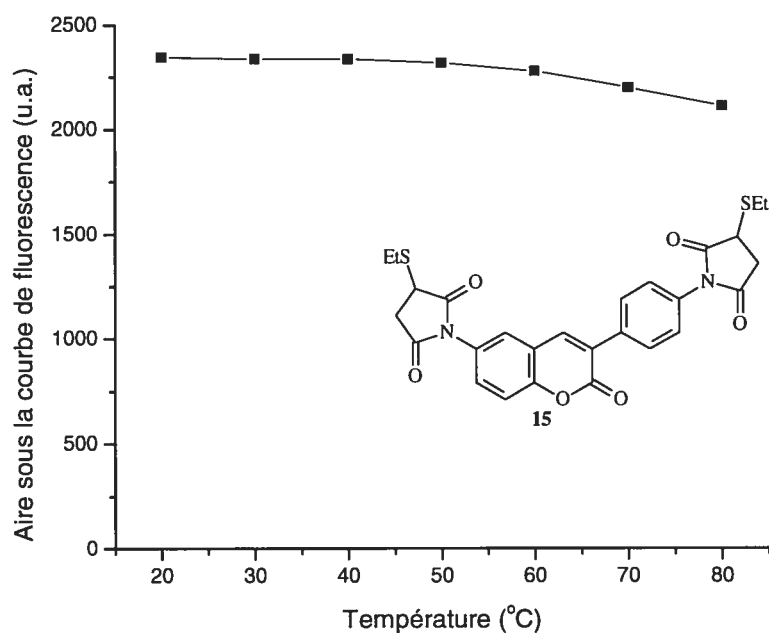


Figure 4.1 Effet de la température sur la fluorescence de a) **41** et de b) **15**.

La même expérience a été faite pour **15**, molécule construite lors de ma maîtrise⁸⁰ mais sans les études de température, et le même profil est observable soit une perte de fluorescence négligeable pour les températures de 25 à 40°C et une diminution de moins de 10 % pour les températures de 40 à 80°C. Même si le solvant utilisé ici est le DMSO et que les études protéiques seront réalisées dans un mélange H₂O/DMSO, le comportement ne devrait pas changer avec la température, ce qui nous laisse croire que les tests protéiques pourront être réalisés à 25°C ou à 37°C puisqu'aucune décomposition (perte de fluorescence) ne semble être observée.

4.2. Études de la fluorescence en fonction du pH.

Afin de réaliser cette expérience, le produit **41** (10^{-3} M) a été placé dans du tampon MOPS 0,1 M dont le pH final est de 6.2, 7.2, et 8.2 respectivement. Par la suite, un spectre de fluorescence a été pris pour chacun des échantillons. Une intégration de l'aire sous la courbe de fluorescence a ainsi pu être réalisée sur chacun des spectres. La comparaison nous indique qu'il n'existe qu'une différence négligeable dans l'intensité de fluorescence entre les pH de 6.2 et 7.2. En ce qui concerne la différence de pH de 7.2 et 8.2, une diminution de près de 20 % est signalée. Il est cependant difficile d'attribuer cette différence à un effet spécifique de pH puisqu'il peut s'agir simplement d'un effet anionique⁵⁶ ou même d'une décomposition partielle des maléimides (observation faite par électrophorèse capillaire lors de travaux antérieurs⁸⁰). Toutefois, cette expérience nous permet de conclure que les tests pourront être aisément réalisés dans un pH physiologique (≈ 7), que la fluorescence devrait être optimale et qu'elle ne devrait pas fluctuer significativement.

Fait à noter, les expériences ont également été réalisées sur le composé **15** et les résultats sont similaires en tout point.

4.3. Calculs des rendements quantiques

Tel que décrit au chapitre 2, le calcul du rendement quantique permet de connaître l'efficacité de fluorescence. Il va de soi qu'il s'agit d'une information importante. Ainsi, nous avons caractérisé non seulement les composés **2** et **10**, mais également les composés **1** et **11**. De plus, le rendement quantique de leur adduit a été calculé afin de pouvoir les comparer. Finalement, l'efficacité de fluorescence peut varier pour un même composé dans des solvants différents. Par conséquent, nous avons réalisé nos calculs dans deux solvants (DMSO et H₂O/DMSO 9:1).

La première étape est de choisir un standard fluorescent adéquat correspondant à la longueur d'onde d'excitation optimale de notre composé d'intérêt dans le solvant à l'étude. Ce standard peut être un standard usuel (revoir tableau I du Chapitre 2), mais peut également être tout composé connu et déjà caractérisé. Le tableau IV suivant illustre les composés à l'étude, leur longueur d'onde d'excitation ainsi que les standards utilisés pour le calcul des rendements quantiques.

Tableau IV. Standards utilisés pour le calcul des rendements quantiques.

DMSO			H ₂ O / DMSO (9:1)		
Fluorogène / adduit	λ_{exc} (nm)	Standard	Fluorogène / adduit	λ_{exc} (nm)	Standard
1	351	Sulfate de Quinine dans H ₂ SO ₄ 0.1 M ¹	1	381	7-diéthylamino-4-méthyl coumarine dans le méthanol ³
/ 14			/ 14		
2	384		2	376	
/ 15			/ 15		
11	328		---	Aucun standard ⁴	
/ 37		/ 37			
10	509	Rhodamine 110 dans l'éthanol ²	10	346	Sulfate de quinine dans H ₂ SO ₄ 0.1 M
/ 41			/ 41		

1. Sulfate de quinine a un rendement quantique de 0.577⁵⁶ (excitation à 351 nm)
2. Rhodamine 110 a un rendement quantique de 0.85¹⁰⁴ (excitation à 511 nm)
3. 7-Diéthylamino-4-méthyl coumarine a un rendement quantique de 0.38¹⁰⁵ (excitation à 375 nm)
4. Les composés **11** et **37** ne sont pas solubles dans ce solvant

Tel que démontré au tableau IV, les standards ne sont pas les mêmes d'un solvant à l'autre puisque les longueurs d'onde d'excitation changent. Avant de démontrer les grandes lignes des étapes à suivre pour effectuer le calcul du rendement quantique, il faut souligner que le rendement quantique des bis-maléimidonaphtalènes avec et sans adduit **11** et **37** sera surévalué. Ceci s'explique par le fait que le standard (sulfate de quinine) n'a pas une longueur d'onde optimale à une valeur de 328 nm (voir figure 4.2). Ainsi, sa fluorescence sera sous-évaluée et la comparaison avec celle des composés **11** et **37** ne sera donc pas tout à fait exacte quoi que tout de même suffisante pour faire une bonne estimation.

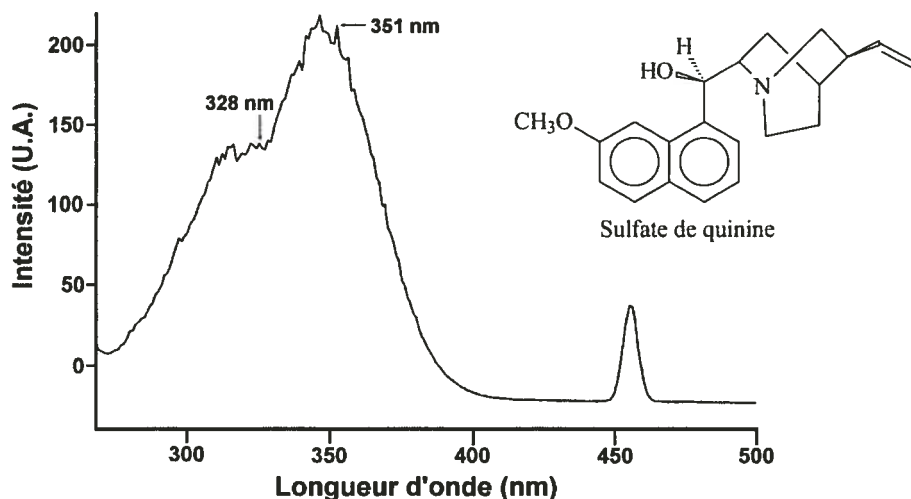


Figure 4.2 Spectre d'excitation du standard sulfate de quinine H_2SO_4 0.1M

De plus, le calcul du rendement quantique pour les molécules **10** et **41** sera légèrement sous-évalué. En effet, il est possible de faire une excitation à 544 nm ou à 509 nm pour voir une émission de fluorescence. La longueur d'onde de 544 nm devrait être en principe celle utilisée puisqu'elle offre une fluorescence plus intense. Par contre, le déplacement de Stokes n'est pas suffisant à cette longueur d'onde. En effet, à cette longueur d'onde, le pic d'excitation superpose celui d'émission. Une intégration sous la courbe devient alors impossible. Ainsi, une excitation à 509 nm sera utilisée pour la caractérisation puisque la discrimination des pic est plus prononcée (voir la figure 4.3).

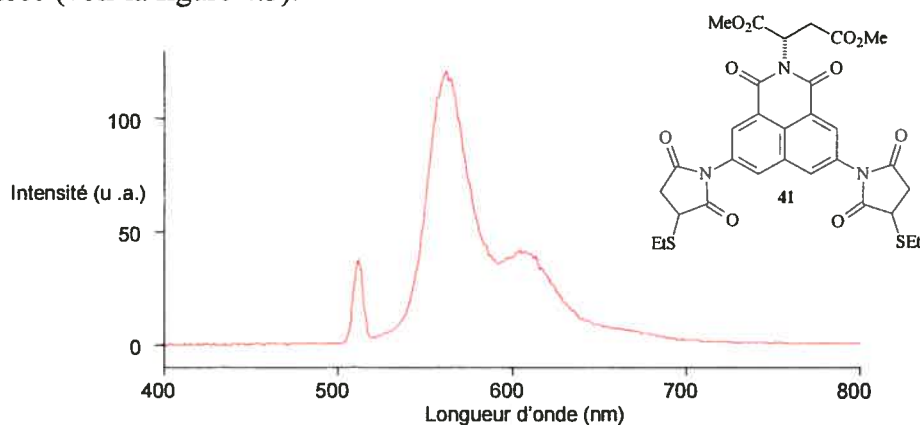
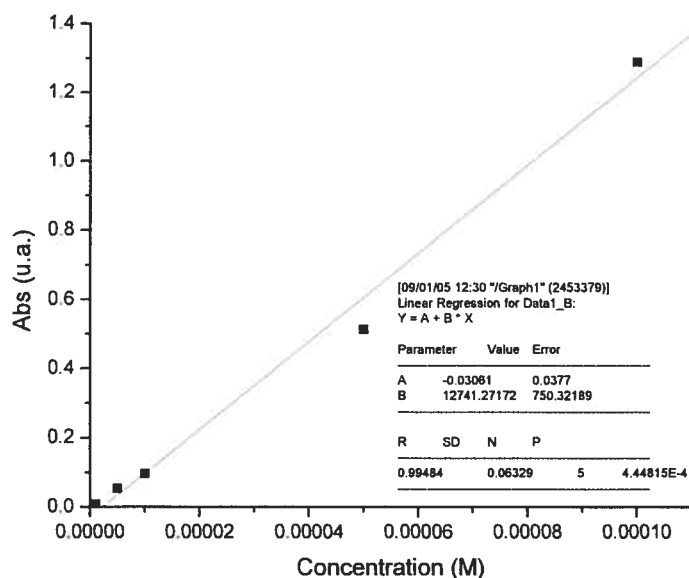


Figure 4.3 Spectre d'excitation de **41**

Les étapes à suivre pour calculer Φ seront développées uniquement sur la structure **41** dans le H₂O/DMSO 9:1 puisque la démarche est relativement longue et que la présentation de tous les rendements quantiques serait redondante.

La première étape consiste à faire une série de dilutions du composé à l'étude **41** dans le solvant adéquat (H₂O/DMSO 9 :1). Les mêmes étapes sont faites pour le standard (ici la quinine sulfate). En utilisant la longueur d'onde d'excitation maximale de la molécule d'intérêt (509 nm), une lecture d'absorbance est prise pour chacune des concentrations. Un graphique de l'absorbance en fonction de la concentration est alors tracé (voir figure 4.4 a et b). Ensuite, chacune des concentrations sera analysée par fluorimétrie (prise de scans). Plusieurs spectres d'émission seront ainsi tracés et un calcul de l'aire sous la courbe sera réalisé sur chacun d'eux pour ainsi établir un nombre d'unités de fluorescence.

a)



b)

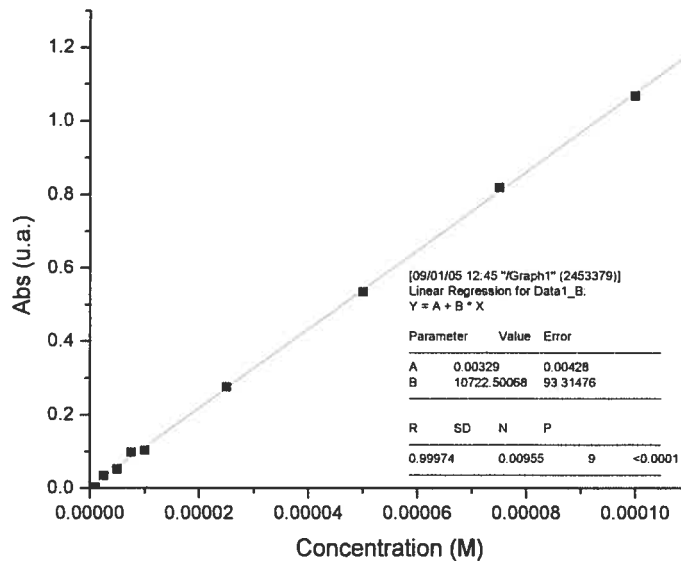
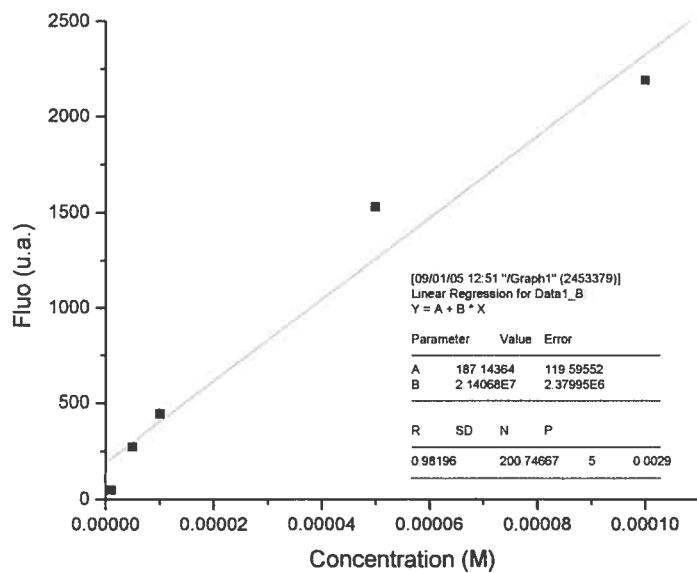


Figure 4.4 Détermination du rendement quantique du composé **41**, droite de la concentration en fonction de a) l'absorbance de **41**, b) l'absorbance de la quinine sulfate H_2SO_4 0.1M

La fluorescence (u.a.) en fonction des concentrations (M) des diverses solutions est exprimée graphiquement (voir figure 4.5 a) et b)). De façon générale, comme c'est le cas pour le composé **41**, on obtient une droite. Toutefois, dans certains cas, il est possible que la figure ressemble d'avantage à une courbe de type polynomiale. L'explication la plus plausible est l'obtention d'un quench de collision à haute concentration. Il faudrait alors prendre la tangente de la courbe puis poursuivre la suite des mêmes étapes.

a)



b)

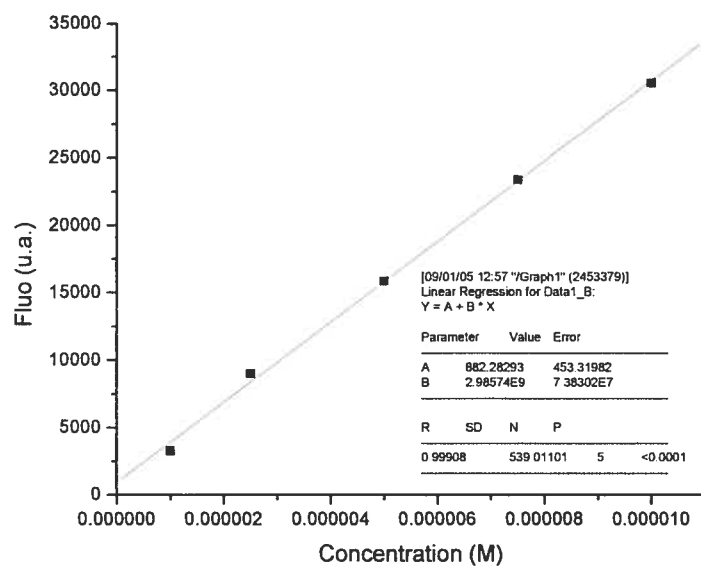


Figure 4.5 Détermination du rendement quantique du composé **41**, droite de la concentration en fonction de a) la fluorescence de **41**, b) la fluorescence de la quinine sulfate H_2SO_4 0.1M

Connaissant la loi de Beer-Lambert (équation 7), l'étape suivante consiste à calculer la pente des graphiques de a et b puisque celle-ci correspond au coefficient d'extinction molaire (ϵ). De plus, sachant la valeur numérique de ce paramètre et connaissant la longueur de trajectoire du faisceau (l), il sera possible de trouver une concentration (c) à une valeur d'absorbance de notre choix.

$$A = l c \epsilon$$

A = absorbance (u.a.)
 l = parcours optique (cm)
 c = concentration (M)
 ϵ = coefficient d'extinction molaire ($M^{-1}cm^{-1}$)

(7)

Ainsi, toujours grâce à l'équation (7) et pour une même valeur arbitraire de A, une concentration sera trouvée pour **41** et une autre pour le standard. À l'aide de la pente des droites des figures a et b (page précédente), il sera possible de trouver le nombre d'unités de fluorescence correspondant aux concentrations. Finalement, selon l'équation (8), le rendement quantique pourra être calculé.

$$\Phi_{35} = \Phi_{\text{standard}} \times \left(\int \mathbf{41} / \int \text{standard} \right)$$
(8)

$\Phi_{(35)}$ = rendement quantique du composé **41**
 Φ_{standard} = rendement quantique du standard
 $\int \mathbf{41}$ = nombre d'unités de fluorescence de **41**
 $\int \text{standard}$ = nombre d'unités de fluorescence du standard

Chacune de ces étapes a été réalisée pour les échantillons énumérés ci-dessus et le tableau IV montre les valeurs obtenues quant aux rendements quantiques.

Tableau V. Rendements quantiques et caractéristiques fluorométriques des composés à l'étude.

Fluorogène / adduit	DMSO				H ₂ O / DMSO (9:1)			
	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (fwhm) (nm)	Ratio des I _F	Φ (10 ⁻³) M)	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (fwhm*) (nm)	Ratio des I _F	Φ (10 ⁻³) M)
1	351	405 (82)	7.0	1.22	381	531 (200)	50	0.050
/ 14				10.4				2.45
2	384	460 (92)	52	0.740	376	436 (82)	27	0.471
/ 15				42.0				14.7
11	328	398 (82)	20	0.604	---	---	---	---
/ 37				14.5				---
10	509	578 (80)	19	3.69	346	503 (181)	8.0	0.614
/ 41				79.7				4.30

* fwhm: « full width at half maximum »

Les résultats démontrent bien que pour une même structure, le rendement quantique est très variable d'un solvant à un autre. De plus, ce tableau est très important puisqu'il sera utilisé comme référence pour les études à venir.

CHAPITRE 5
Études de sélectivité protéique

5.1. Études de réticulation protéique non spécifique

L'objectif principal de ce chapitre est de voir si la réaction d'une protéine dicystéinée réagit avec un fluorogène donné au dépend de la réaction de deux équivalent d'une protéine mono-cystéinée avec le même fluorogène. Ces derniers ont été construits de telle sorte que cela ne puisse pas se produire. En effet, les maléimides d'un même fluorogène sont toujours orientés dans un angles relativement aiguë, ce qui devrait causer une trop grande tension stérique pour la liaison entre deux protéines monocystéinées. Par contre, il faut tout de même s'en assurer puisque le projet court à sa perte si une réticulation est possible. En effet, un marquage sélectif serait alors impossible et les réticulations pourraient faire mourir une cellule par la formation d'agrégats. Afin de vérifier une éventuelle réticulation, nous avons choisi de construire une protéine monocystéinée à partir de la protéine native appelée thiorédoxine (TRX) et de faire une étude de liaison avec un fluorogène, (voir figure 5.1 a)).

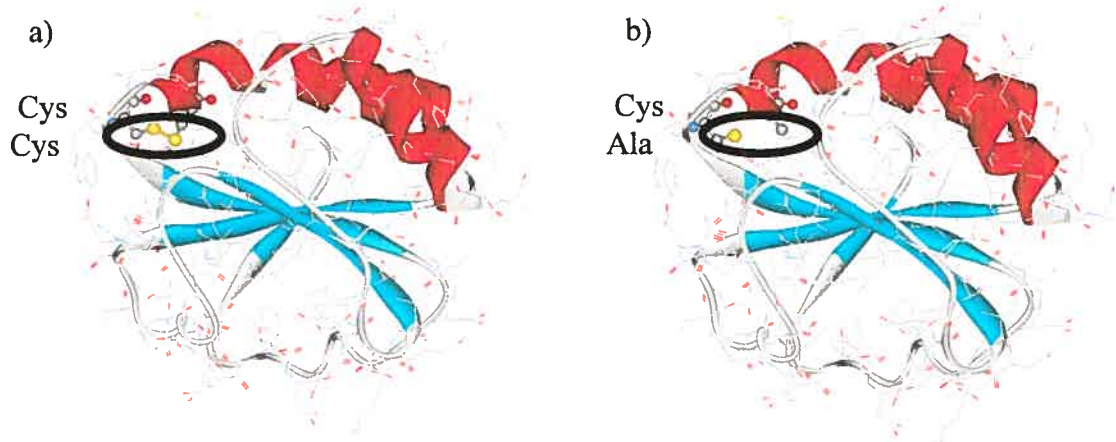


Figure 5.1 Représentation de la protéine thiorédoxine a) type sauvage et b) TRXC35A

Cette protéine d'environ 12 kDa est rencontrée dans presque toutes les cellules vivantes^{106,107}. Dans la nature, elle possède une paire de cystéines (C32 et C35) très près l'une de l'autre de telle sorte qu'elles peuvent aisément faire un pont

disulfure⁴⁸. La thiorédoxine peut être oxydée ou réduite dépendamment des conditions physiologiques. Elle est impliquée, entre autres, dans la réduction des nucléosides diphosphates (NDP). On la retrouve également dans la réponse à un stress oxydatif, dans la formation du glutathion par une réduction du glutathion disulfure¹⁰⁸. Il s'agit donc d'une protéine très connue (sa structure cristalline est d'ailleurs répertoriée depuis 25 ans⁴⁸), très accessible et peu coûteuse.

La thiorédoxine de type sauvage ne peut pas être directement utilisée puisqu'elle est dithiolée. En effet, les études de réticulation doivent être réalisées sur une protéine qui ne porte qu'une seule cystéine. Ainsi, il nous faudra travailler sur un mutant de TRX, soit la TRXC35A (la Cystéine à la position 35 est mutée en Alanine). Le choix de la mutation s'est arrêté sur l'alanine puisque nous voulions garder un maximum de similitude structurale (changer un $-CH_2SH$ en $-CH_3$). Le mutant ne possède alors qu'un seul thiol tel que démontré à la figure 5.1b). Le groupe de recherche du Pr. Michnick (en collaboration avec le groupe du Pr. Keillor sur ce projet) possède le gène qui code pour cette protéine mutante. Ce dernier est sous-cloné dans le plasmide pQE-32 (acheté de la compagnie Qiagen)¹⁰⁸. De plus, le gène code pour une protéine mutante ayant une queue de polyhistidine (His-tag) en N-terminale, ce qui facilite la purification. Les propriétés du vecteur pQE-32 sont présentées à la figure 5.2. Ainsi, la protéine TRXC35A sera exprimée à partir de l'ADN.

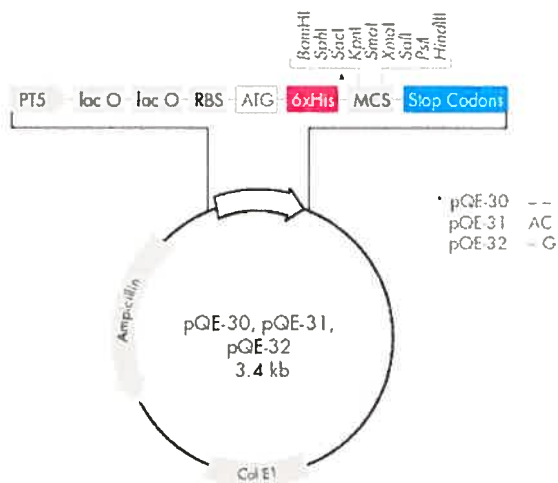


Figure 5.2. Vecteur pQE-32 (Qiagen).

PT5: Promoteur de la polymérase T5.

lac-O: Opérateur lac.

RBS: Site de liaison du ribosome.
ATG: Séquence codante pour le début de la transcription.

6xHis: Séquence (tag) contenant 6 histidines

MCS: Sites de polyclonage permettant l'introduction du gène d'intérêt.

Codon Stop: Séquence codant pour l'arrêt de la transcription dans les cadres de lecture.

Col E1: Origine de réplcation de l'ADN.

Ampicilline: Gène de résistance à l'ampicilline.

5.1.1. Expression et purification de TRXC35A

L'expression protéique a été réalisée dans des cellules compétentes¹⁰⁹ de type *E. Coli* BL21-pRep4. Ces bactéries sont très utiles pour l'expression de protéines, car elles sont dépourvues de protéases, des enzymes qui pourraient détruire notre protéine d'intérêt¹¹⁰. Ainsi, une transformation (incorporation du plasmide au sein d'une bactérie) a été réalisée par choc thermique¹¹¹. Par la suite, un aliquote du milieu de culture a été étalé sur une gélose contenant l'antibiotique kanamicyne (le plasmide pQE-32 confère une résistance à la bactérie, voir figure 5.2). Par conséquent, cela permet d'empêcher la prolifération de bactéries non transformées.

Suite à une incubation d'une nuit, plusieurs colonies bactériennes ont pu croître et l'une d'entre elles a été prélevée, puis placée dans un bouillon de culture de type LB⁴⁸ (50 mL) (contenant de la kanamicyne) pour la nuit afin de permettre à la bactérie de se répliquer. Par la suite, 25 mL de milieu de culture bactérienne ont été prélevés et placés dans 500 mL de milieu de culture stérile (avec kanamicyne) et la solution fut remise à incuber jusqu'à ce que la densité optique atteigne 0.6. À cette D.O., les bactéries sont en phase exponentielle, c'est le moment où elles sont le plus « en forme ».

Le thiogalactoside d'isopropyl (IPTG) est ensuite ajouté au milieu de culture afin de permettre l'expression de la protéine. Ce processus peut avoir lieu puisque l'IPTG permet de bloquer un répresseur d'expression protéique (toujours actif en absence de galactose ou d'un analogue structural tel que l'IPTG) tel que présenté en annexe.

Suite à l'étape d'expression, les bactéries ont été récupérées par centrifugation, puis lysées par sonication en présence de lysosyme, qui fragilise les parois bactériennes en hydrolysant les liens glucosidiques $\beta(1\rightarrow4)$ entre l'acide *N*-

acétylmuramique et la *N*-acétylglucosamine⁴⁸. La protéine recombinante se retrouve ainsi dans le tampon de lyse (avec toutes les autres protéines bactériennes).

Nous avons spécifié, un peu plus haut, que la protéine possède un His-tag (6His) en *N*-terminal (ajouté par manipulation d'ADN, car les protéines naturelles n'en possèdent pas). Plusieurs protéines créées artificiellement utilisent cette queue d'histidines puisque la purification peut être faite très facilement par colonne d'affinité. Cette queue de polyhistidines est très peu immunogénique, ne perturbe pas la structure tridimensionnelle de la protéine (très petite taille) et n'affecte pas la sécrétion, la compartimentation ou la fusion des protéines dans une cellule^{112,113,114}. Ainsi, la purification se réalise en déposant le tampon contenant toutes les protéines du lysat cellulaire dans une colonne de Ni-NTA. Cette dernière, développé par Hoffmann-LaRoche¹⁰⁸, est une colonne d'affinité riche en nickel, un métal adsorbent chélatant tétradentate possédant une grande affinité pour les histidines tel que démontré à la figure 5.3. La protéine d'intérêt est alors solidement retenue au support qui ne lie pas les autres protéines du surnageant ne possédant pas de His-tag. Suite à un lavage avec du tampon phosphate (voir partie expérimentale), la protéine peut être éluée en faisant passer une solution tampon contenant de l'imidazole, qui remplace la protéine par compétition, puisque les histidines possèdent un groupement imidazole.

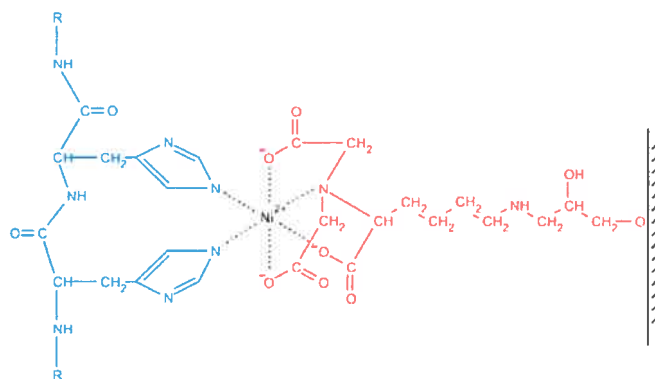


Figure 5.3 Interaction entre les résidus d'un His-tag et de la matrice Ni-NTA.

La dernière étape de purification consiste à faire une dialyse. C'est-à-dire de changer le tampon d'éluion phosphate par du tampon MOPS 25 mM (pH 7.5) et

d'éliminer, par le fait même, les molécules d'imidazole (cette manipulation se réalise à 4°C). Les protéines recueillies suite à cette purification sont conservées à -80°C. Par la suite, un gel SDS-PAGE a été réalisé afin de voir si la protéine isolée est pure et en quantité suffisante (voir figure 5.4)

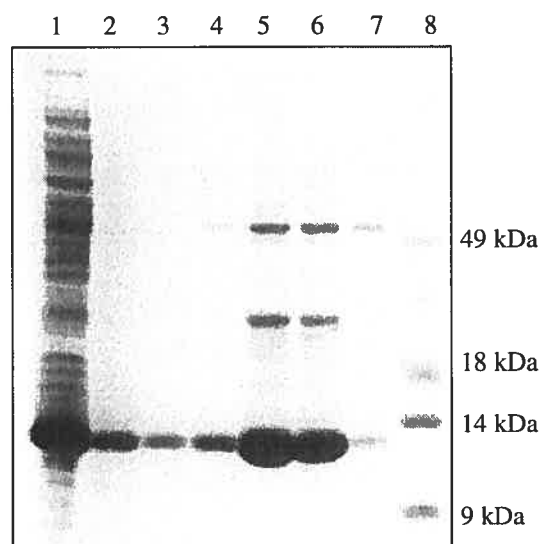


Figure 5.4 SDS-PAGE (acrylamide 15%) des étapes de purification de l'expression de TRXC35A. Puits 1) culot, puits 2, 3 et 4) tampon de lavage, puits 5, 6 et 7) tampon d'élution (notre protéine), puits 8) marqueurs.

Comme il est possible d'observer à la figure 5.4, les standards (dernière colonne du gel) nous démontre bien que la protéine obtenue est d'environ 12 kDa et qu'elle semble pure puisque les bandes plus hautes sont beaucoup moins intenses (une estimation sur le logiciel ScionImage estime le niveau de pureté à plus de 77% par une comparaison d'intensité lumineuse).

5.1.2. Quantification de la protéine TRXC35A

La quantification des protéines peut se réaliser en ayant recours à plusieurs procédés. Pour notre part, nous avons choisi de faire le test de Bradford^{115,116}. Il s'agit de colorer les protéines avec un réactif qui devient bleu (après réaction) par les nucléophiles protéiques et de faire une comparaison d'absorbance (à 595 nm) avec

une protéine témoin de concentration connue et d'absorbance similaire (voir figure 5.4b).

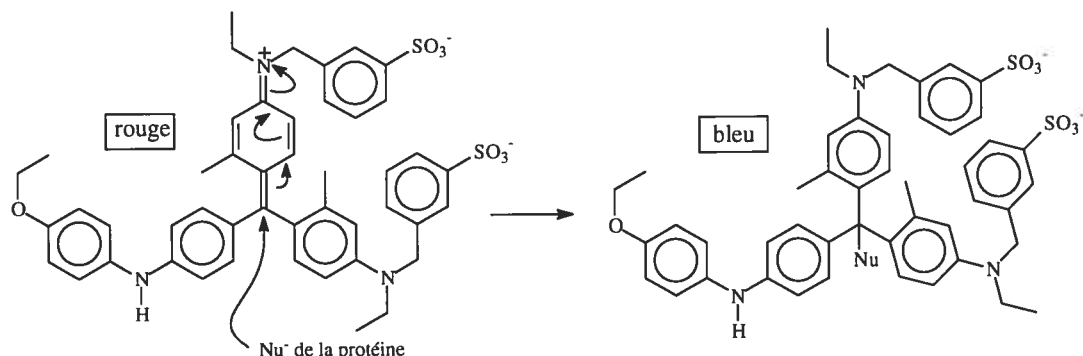


Figure 5.4b) Représentation mécanistique de la coloration par le test de Bradford.

Il est connu que TRX de type sauvage (sans mutation) à une absorbance similaire à la γ -immunoglobuline bovine (IgG)¹¹⁷. Le test se réalise à l'aide de deux séries de dilution tel que préétabli par Bio-Rad Protein Assay. Une première dilution se réalise avec l'IgG et une seconde série constituée de notre protéine de concentration inconnue. Par la suite, un colorant brun (le bleu brillant de Coomassie^{118,119}) interagit avec les protéines par une apposition électrostatique avec des chaînes latérales chargées positivement (Arginine) ou par empilement π avec les chaînes latérales hydrophobes (Phénylalanine, Tryptophane, Tyrosine) pour devenir bleu (voir la structure du bleu de Coomassie à la figure 5.4c)).

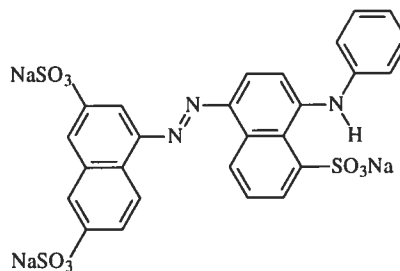


Figure 5.4c) Structure du bleu de Coomassie.

Plus le bleu est intense, plus la concentration de protéines est grande. Ainsi, une longueur d'onde de 595 nm est utilisée pour la mesure d'absorbance des échantillons. Une courbe étalon est alors tracée de l'absorbance en fonction de la concentration protéique d'IgG. Le domaine de linéarité de la méthode lorsque l'IgG est utilisée se trouve entre 0,2 et 1,5 mg/mL. Les aliquots doivent donc être dilués de façon à ce que leur concentration en protéines se trouve à l'intérieur de ce domaine de linéarité. Il suffit alors de comparer l'intensité du bleu de notre inconnu avec celui de l'IgG pour connaître la concentration de notre échantillon. La concentration trouvée pour nos solutions de protéines est de 114,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Cette concentration est plus que suffisante pour réaliser les études de liaison avec le fluorogène, nous pourrions donc poursuivre nos objectifs sans avoir à faire une étape de concentration protéique.

5.1.3. Test de liaison protéine (TRXC35A) – fluorogène

La présente section fera le point sur les possibilités de réticulation entre un fluorogène et deux protéines portant une seule cystéine. Cette donnée peut être mesurée à l'aide d'un seul équivalent de protéines puisque les données d'électrophorèse capillaire⁸⁰ présentées en introduction avaient démontré que les fluorogènes ont pour étape limitante leur liaison au premier thiol et que l'ajout du second thiol est rapide et beaucoup plus facile que celle du premier. Un excès de protéines est alors évité afin de minimiser un quench de collisions. L'expérience se réalise dans un tampon MOPS 25 mM (pH 7) / DMSO 10 % et placé à 70°C (permet d'exposer la cystéine au solvant par dénaturation) pour une heure. La concentration de la protéine et du fluorogène sont évaluée à 45.8 μM .

Pour cette étude, nous avons choisi de tester le fluorogène **2**. Ce dernier a été choisi, car il offre une plus grande distance entre les maléimides. En effet, si une réticulation doit se produire, il est plus probable qu'elle se réalise sur une molécule dont les deux maléimides sont à une distance de 15 Å plutôt que sur une molécule où les maléimides sont distants de 10 Å comme dans le cas de la structure **10**. Plus la distance qui sépare les maléimides est petite, plus la tension stérique entre deux

protéines serait grande et moins il est probable que ces deux protéines se lient au même fluorogène.

L'expérience se réalise à l'aide de trois tubes Eppendorfs. Le premier, contient seulement TRXC35A afin de voir la fluorescence intrinsèque de la protéine. Dans le second tube, TRXC35A sera placée avec le fluorophore **2** et soumise aux conditions décrites plus haut. Pour sa part, le troisième tube possède exactement les mêmes substances que le deuxième tube, mais celui-ci sera saturé en éthanethiol (1 μ L) à la fin de l'incubation et après que la température soit redescendue à la température de la pièce.

Un gel SDS-PAGE est alors effectué sur les échantillons en prenant soin de respecter les étapes de coloration (détaillées dans la partie expérimentale) à la fois pour la révélation, mais également pour la migration lors du gel (les résultats sont présentés à la figure 5.5).

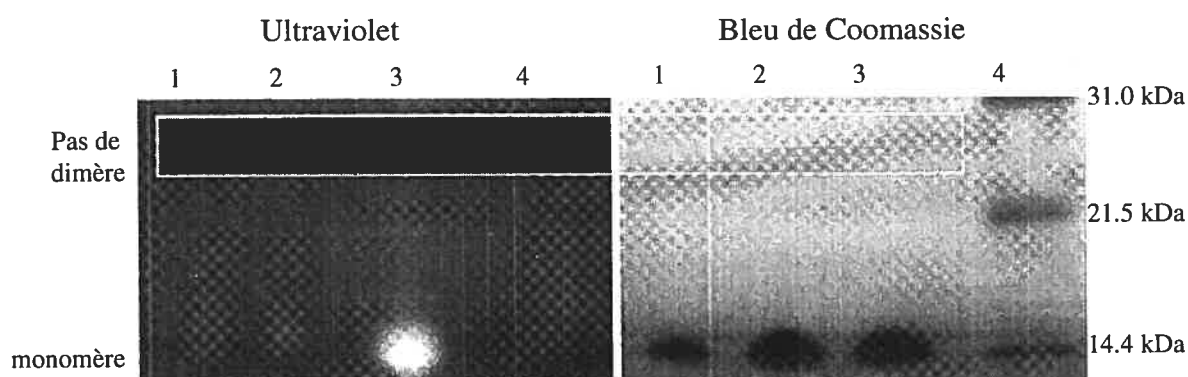


Figure 5.5 Résultats du SDS-PAGE des tests de réticulation. Puits 1) TRXC35A seule, puits 2) TRXC35A + **2**, puits 3) TRXC35A + **2** + EtSH, puits 4) marqueurs.

Les résultats nous démontrent, par la coloration au bleu de Coomassie que la protéine est présente dans tous les puits. Pour sa part, la révélation à l'ultra violet nous démontre que la protéine TRXC35A ne fluoresce pas dans cette longueur d'onde lorsqu'elle n'est pas liée à un fluorogène (voir puits 1). Il est également

possible de voir que la protéine liée au fluorogène ne fluoresce pas (voir puits 2), ce qui nous laisse croire que le deuxième maléimide est encore intact. Par conséquent, il conserve son pouvoir d'atténuateur de fluorescence. De plus, lorsque l'on ajoute de l'éthanedithiol, la fluorescence de la protéine est facilement observable (voir puits 3). Cette fluorescence provient du fait que le premier maléimide a réagi sur la protéine et que le deuxième a réagi avec un thiol. Le potentiel d'atténuation de fluorescence est alors éliminé. Il est à noter qu'aucune trace de dimère n'a été observée. Ces résultats semblent concordants avec nos hypothèses de départ. Il semble donc que la molécule ne puisse pas faire de réticulation, sans aucun doute grâce à une tension stérique qui serait trop grande.

Les mêmes expériences ont été réalisées sur une série de concentrations afin de percevoir la limite de détection de fluorescence du composé **2**. Une protéine à pu être marquée à des concentrations de l'ordre de 5 μM .

5.2. Conception des protéines mCys-Fos et diCys-Fos.

Quel que soit le type de cellules (eucaryotes ou procaryotes), une régulation de l'expression des gènes est essentielle afin de maintenir l'homéostasie. Pour ce faire, elles possèdent toutes des complexes spécifiques ADN-protéine^{120,121} qui permettent un contrôle de la production protéique à différentes étapes de la transcription. La protéine Fos est impliquée dans le contrôle de l'induction des facteurs de transcription¹²² (eux-mêmes des régulateurs de la synthèse protéique). Son expression est induite par des stimuli extracellulaires¹²³ et la protéine ainsi produite offre un hétérodimère¹²⁴ (avec la protéine Jun) ou encore un homodimère¹²⁴ sous forme d'un leucine zipper¹²⁵ (voir figure 5.6).

Tel que décrit au chapitre 1, nous désirons construire une protéine hélicoïdale (pour maintenir rigide les acides aminés... et donc avec une distance constante et mesurable) portant deux cystéines (partie réactive aux maléimides) afin de vérifier

s'il est possible de faire un marquage protéique en ayant recours aux fluorogènes synthétisés. Ainsi, nous avons choisi de travailler avec la protéine Fos qui est reconnue pour être sous forme d'hélice homodimérique (en absence de Jun). La complexation sous forme dimérique de cette protéine n'est pas un problème puisque les deux thiols d'une même protéine sont exposés au solvant exactement à 180° de la deuxième protéine¹²⁴ (voir figure 5.6). Il ne serait donc pas possible qu'un fluorogène lie une cystéine de deux monomères apposés. Il faut également spécifier que nous n'avons utilisé qu'un fragment de Fos type sauvage, soit entre les nucléotides 116 et 408 (appelé c-Fos), car ce n'est que cette portion hélicoïdale qui nous intéresse (elle possède deux cystéines : C49 et C99). Ces deux cystéines sont beaucoup trop éloignées pour être utiles à des fins de marquage protéique. Ainsi, nous verrons dans les sections à venir que la cystéine 99 sera mutée en sérine et qu'une cystéine de taille appropriée (modélisée avec le logiciel HyperChem) sera insérée par mutagenèse dirigée à la position 56 afin d'obtenir une distance analogue à celle des maléimides du fluorogènes soit 10Å. De plus, cette petite protéine est reconnue pour conserver sa forme secondaire d'hélice α dans un solvant H₂O/DMSO 9:1, ce qui est essentiel à notre étude.

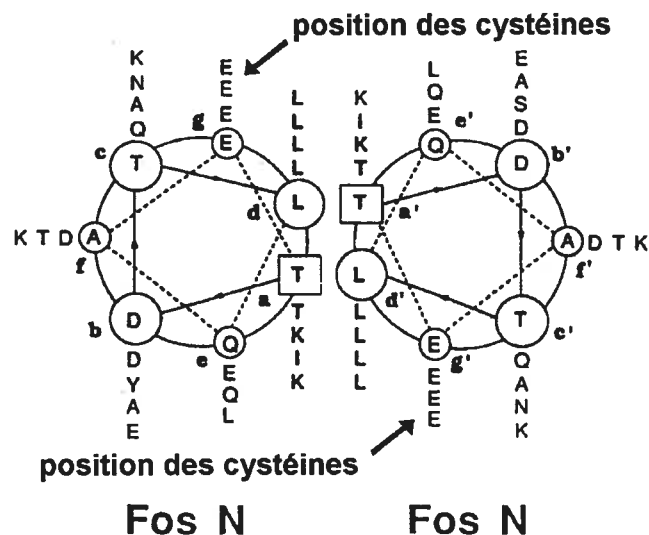


Figure 5.6 Représentation schématique de l'homodimère de Fos¹²⁴.

Contrairement à la protéine TRXC35A, nous n'avions pas le plasmide qui code pour Fos portant deux cystéines de distance adéquate (C49 et C99 sont beaucoup trop loin l'une de l'autre). Par contre, nous avons reçu le plasmide mutant (FosC99S), une généreuse donation du laboratoire du Dr Tom Curran. Ainsi, cette protéine porte une seule cystéine à la position 49. Notre travail consistait donc à faire de la biologie moléculaire afin de construire un ADN capable d'exprimer la protéine avec deux cystéines distantes de 10 Å (notre choix s'est arrêté sur cette distance en raison du composé **10** déjà synthétisé et efficace pour les tests de fluorescence). Par la suite, une expression protéique (pour obtenir le diCys-Fos) et des études de fluorescence pourront être réalisées.

5.2.1. Biologie moléculaire

Le gène que nous avons reçu était en très faible quantité et dans le plasmide pDS56 (voir commentaires sur la séquence et sur la résistance plus bas). La première chose à faire est d'amplifier le plasmide. Ainsi, une transformation dans la souche bactérienne *E. coli* de type XL1-bleu a été réalisée et une prolifération bactérienne a permis d'obtenir une grande quantité de plasmides après purification (quantification à l'aide du marqueur de référence λ DNA/HindIII sur un gel d'agarose). XL1-bleu a été choisi puisqu'il s'agit d'une souche bactérienne efficace pour une grande variété de transformations, offrant une répllication plasmidique de qualité et résistante à l'antibiotique rapamicine. Les caractéristiques biochimiques de XL1-bleu seront décrites à la section 8.2.1.1.

Une amplification du gène est également nécessaire pour pouvoir y effectuer une mutation. Le problème est que la séquence du pDS56 n'est par connue en littérature et que le groupe de recherche du Pr. Curran n'avait plus la séquence, le plasmide ne leur étant plus d'aucun intérêt depuis plusieurs années¹²². Nous avons tout de même tenté une PCR (amplification du gène) sur le plasmide à l'aide des

amorces universelles, mais cette expérience s'est avérée infructueuse. Par conséquent, nous avons choisi d'effectuer un sous-clonage (changement de plasmide) dans le pQE-32, qui, pour sa part, est très bien connu¹⁰⁸.

Le second problème rencontré est que le cadre de lecture des codons n'était alors plus compatible, il nous fallait donc ajouter des paires de bases de façon à corriger ce problème. La figure 5.7 présente la séquence d'ADN du gène Fos. Nous avons ainsi ajouté les paires de bases AC, tel que montré en jaune, pour rétablir le cadre de lecture. La conséquence est une légère modification protéique qui change une sérine en une isoleucine et histidine (voir figure 5.8 en jaune). Les répercussions ne seront que minimales puisque cette région n'est pas déterminante sur l'initiation de l'hélicité de la protéine¹²⁶.

HindIII

GGATCCACGGTCGTGCGCAGTCCATCGGTCGTGCGGGTAAAGTTGAACAA
 CTGTCCCCGGAAGAGGAAGAGAAACGTCGCATCCGCCGTGAACGTAACA
 AAATGGCGGCAGCGAAATGCCGTAACCGCCGTCGTGAAACAACCGACAC
 CCTCCAGGCGGAAACCGACCAGCTGGAAGACGAAAAATCCGCGCTGCAA
 ACCGAAATCGCGAACCTGCTGAAAGAAAAAGAAAAGCTGGAGTTCATCC
 TGGCGGCACACCGTCCGGCGTGCAAAATCCCGAACGACCTGGGTAAACAA
GCTT

HincII

BamHI

Figure 5.7 Séquence d'ADN du gène FosC99S.

a)

H₂N - MRGSHHHHHHGS GRAQSIG
 RRGKVEQLSPEEEKRRIRR
 ERNKMAAAKCRNRRRECTDT
 LQAETDQLEDEKSALQTEIA
 NLLKEKEKLEFILAAHRPAS
 KIPNDLG-COOH

b)

H₂N - MRGSHHHHHHGIHG RAQSIG
RRGKVEQLSPEEEKRRIR
ERNKMAAAKCRNRRRECTDT
LQAETDQLEDEKSALQTEIA
NLLKEKEKLEFILAAHRPAS
KIPNDLG-COOH

Figure 5.8 Acides aminés de la protéine FosC99S a) dans pDS56 et b) dans pQE-32.

Le sous clonage consiste à couper les extrémités du gène à l'aide d'enzymes de restriction. Ici, *Bam*HI et *Hind*III ont été utilisées puisque ces séquences de paires de bases commencent et terminent le gène c-Fos (voir les nucléotides soulignés à la figure 5.7), mais également parce qu'elles se retrouvent dans le pQE-32. Le site de clivage des enzymes de restriction est présenté à la figure 5.9.

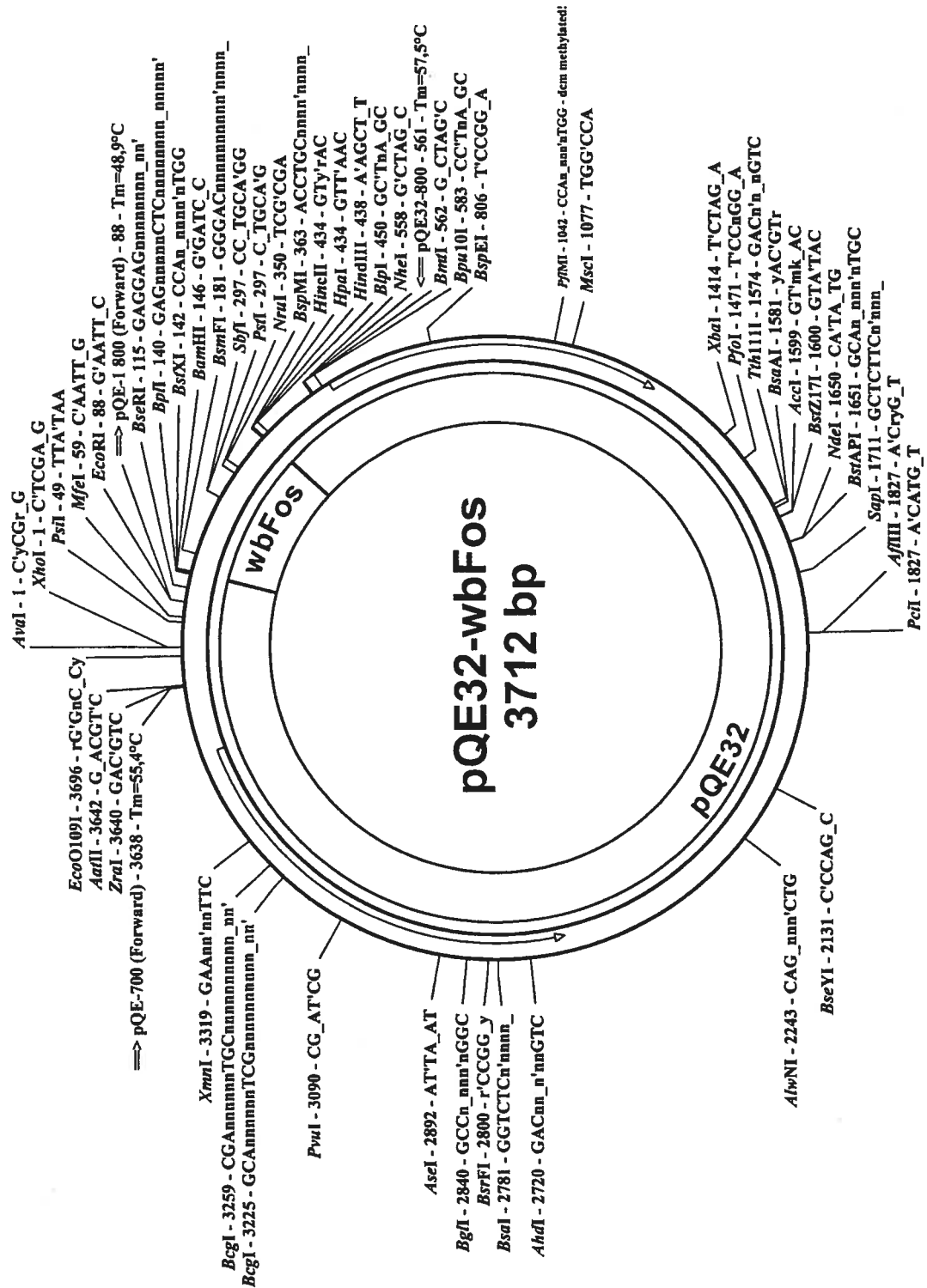


Figure 5.9 Présentation des sites de restrictions dans le plasmide recombinant pQE-32-Fos.

Ces enzymes sont spécifiques à une séquence bien précise d'ADN (qui doit évidemment être unique afin de ne pas fragmenter à plusieurs reprises le gène d'intérêt). En effet, *BamHI* reconnaît la séquence GGATCC et coupe entre les deux guanines alors que *HindIII* reconnaît la séquence AAGCTT et coupe entre les deux adénines (voir figure 5.7). Le même traitement doit être fait sur pQE-32 afin d'obtenir des bouts collants complémentaires. Par la suite, ils pourront former un plasmide recombinant (possédant le gène d'intérêt) après avoir lié de manière covalente les deux brins d'ADN. Cette dernière étape se réalise par voie enzymatique, à l'aide d'une ligase.

Une transformation (insertion du plasmide dans une cellule) a ensuite été réalisée, mais cette fois par électroporation. Un aliquot du résultat de l'électroporation a été étalé sur une gélose contenant de l'ampicilline et le lendemain, plusieurs colonies bactériennes étaient visualisables. Onze de ces colonies furent prélevées et remises en milieu de culture (à 37°C pour la nuit) pour amplifier le plasmide. Les bactéries furent ensuite séparées du milieu par centrifugation et le plasmide fut purifié (voir la démarche de purification à la partie expérimentale). Un aliquot de chacun des tubes a ensuite été prélevé et traité avec deux enzymes de restriction. La première doit couper une fois à l'intérieur du gène et la seconde doit couper une fois à l'extérieur du gène. Ce traitement est essentiel puisqu'il est possible que le plasmide se cyclise sans la présence du gène. Si ce même plasmide parvient à entrer dans une cellule après l'étape de transformation, la survie bactérienne est tout de même assurée, nous laissant croire qu'il s'agit du plasmide recombinant. Ainsi, avec la digestion, nous serons en mesure de voir une ou deux bandes de poids moléculaires bien distinctes. Une bande à 3420 paires de bases (pb) serait significative d'un plasmide sans gène alors que deux bandes (avec un total de 3712 pb) seraient représentatives d'un plasmide avec insert (en supposant évidemment que les bandes correspondent à la taille attendue). Les enzymes choisies pour faire la digestion sont *HincII* et *NdeI*. Ces enzymes ont été choisies pour leur efficacité de digestion, pour leur compatibilité (par rapport au tampon de lyse) et parce que les séquences reconnues par les enzymes ne se retrouvent qu'une seule fois dans le

plasmide. Le résultat du gel d'agarose 1% est présenté à la figure 5.10.



Figure 5.10 Résultats du gel d'agarose 1% après digestion du plasmide recombinant pQE-32-Fos. Puits 1 à 6) digestions avec *HincII* et *NdeI*, Puits 7) identique au puits 6 mais non digéré, Puits 8) marqueurs, Puits 9) identique au puits 10 mais non digéré, Puits 10) identique au puits 11 mais non digéré, Puits 11 à 14) digestion avec *HincII* et *NdeI*.

Il est possible de constater que le puits 2 ne contient rien et que les puits 3, 5, 6, 11 à 14 ne contiennent qu'une seule bande à environ 3500-4000 pb (voir les bandes du marqueur à la figure 5.11 pour faire la comparaison), ce qui est significatif d'un plasmide sans gène. Par contre, les puits 1 et 4 possèdent trois bandes. La première est représentative d'une coupure avec une seule enzyme (ça arrive!) et les deux bandes du bas, de 1353 pb et 2359 pb représentent le plasmide recombinant clivé. Puisque le puits 4 semble plus intense, nous avons choisi cette colonie pour la suite des expériences.

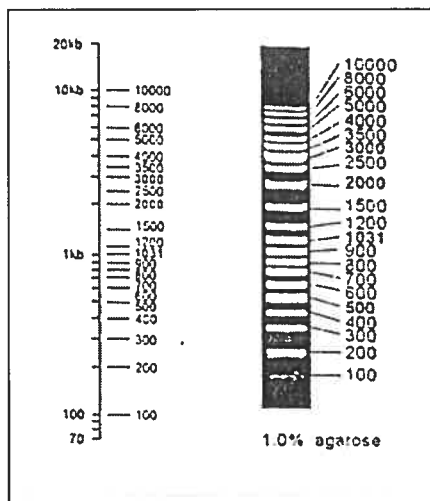


Figure 5.11 Marqueurs (de type Gene Ruler™ DNA Ladder Mix) et nombres de paires de bases associés à chacun d'eux.

Une fois le sous-clonage réalisé, nous avons joué de prudence en faisant un séquençage du gène d'intérêt. Cette étape est conseillée puisque le plasmide envoyé était âgé de 9 ans. Le choix des amorces ne fut pas problématique puisque le gène est maintenant dans le plasmide pQE-32. Nous avons donc utilisé les amorces standards et nous avons obtenu des résultats très encourageants. En effet, aucune mutation du gène ne fut observée, ce qui nous permit de passer à l'étape de mutagenèse dirigée.

La méthode standard pour faire de la mutagenèse dirigée est d'utiliser quatre amorces et de faire une seule PCR (Polymerase Chain Reaction)¹²⁷. Nous avons plutôt opté pour l'utilisation de trois amorces et de deux PCR, soit la technique du mégaprimer¹²⁸. La première étape consiste à utiliser une amorce de début de gène (avec les deux paires de bases additionnelles pour rétablir le cadre de lecture dans pQE-32) et une deuxième amorce localisée exactement sur la séquence à modifier (cette amorce porte donc la mutation L56C représentée en vert (ACA) à la figure 5.7 (voir la partie expérimentale pour les détails)). Une mutation silencieuse a également été faite sur le site de coupure de PstI (CTC) (en vert à la figure 5.7) pour d'éventuels tests contrôles. Cette dernière amorce est inversée (3' → 5') et suffisamment longue pour qu'une bonne complémentarité puisse être réalisée de part et d'autre de la mutation. Un schéma des étapes réalisées est présenté à la figure 5.12. Tous les

détails concernant ces manipulations sont inscrits au chapitre 8.

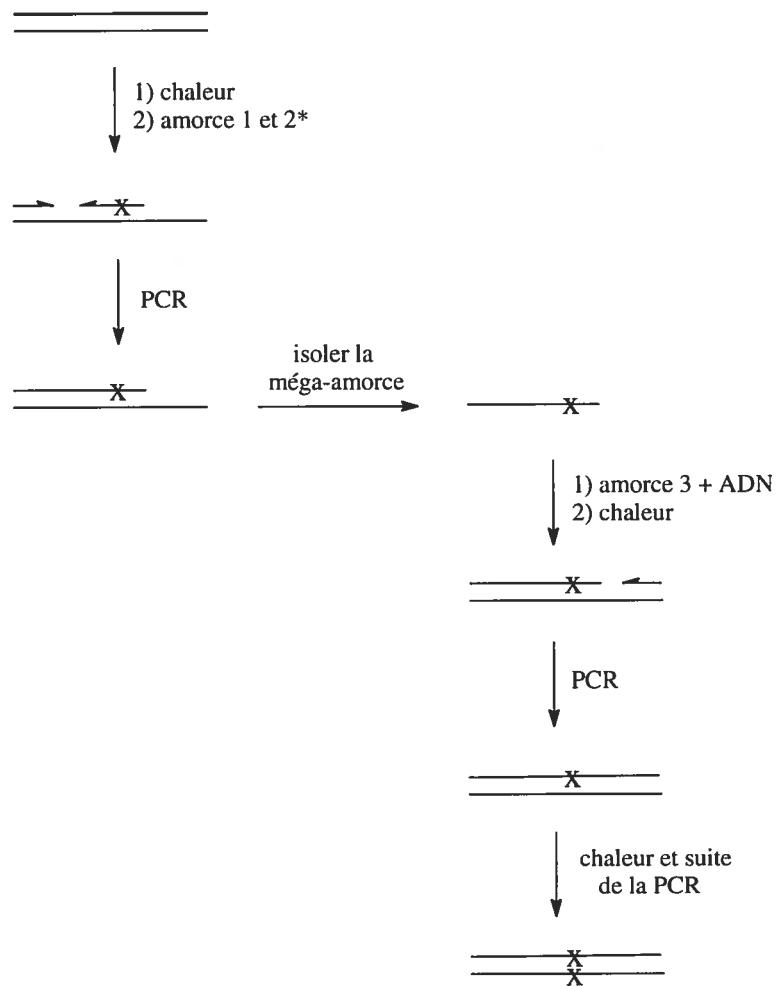


Figure 5.12 Étapes générales à suivre pour réaliser une mutagenèse dirigée par la méthode du mégaprimer.

Ne connaissant pas les conditions réactionnelles adéquates pour l'étape de liaison d'amorce, plusieurs températures ont été tentées afin d'optimiser la formation de la mégaamorce. La température de 60°C s'est avérée être optimale (voir figure 5.13).

Fait à noter, il est parfois possible de réaliser une PCR sans ajouter de $MgSO_4$ additionnel. Pour cette expérience, il s'avère essentiel, car sa trop faible concentration

empêche la production du mégaprimé (l'enzyme Vent polymérase est magnésium dépendante).

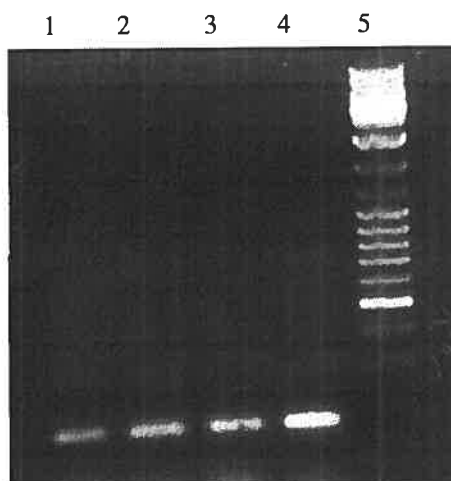


Figure 5.13 Résultats de la PCR pour la formation de la mégaamorce à différentes températures: puits 1) 50.0°C, puits 2) 52.8°C, puits 3) 56.0°C, puits 4) 60.0°C, puits 5) marqueur (migration du gel avec 2% d'agarose).

La figure 5.13 a été réalisée en prenant un aliquot de chacune des expériences à différentes températures. Ainsi, lorsque nous avons identifié la température où la formation de la mégaamorce est optimale (ici 60°C), il est possible de mettre la totalité du résultat de la PCR à 60°C sur gel d'agarose. Suite à la migration de l'ADN sur gel, il sera possible de couper l'agarose à l'endroit spécifique où la mégaamorce est localisé, de le faire fondre et de recueillir la mégaamorce à l'aide de billes capables de lier spécifiquement l'ADN (une purification qui se fait à partir d'un kit vendu commercialement). Cette étape est essentielle afin d'utiliser, pour la deuxième PCR, seulement la mégaamorce et non les restes de l'amorce initiale ou encore les sels.

La seconde étape de mutagenèse dirigée consiste à faire une deuxième PCR, mais cette fois avec une amorce terminale inverse et la mégaamorce. Cette PCR a été essayée à une seule température soit 56,0°C puisqu'il faut mettre une très grande quantité de mégaamorce pour que la PCR soit efficace. Ainsi, les quantités étaient insuffisantes pour faire plus d'un test. Toutefois, l'expérience s'est avérée adéquate puisque le gène muté a été obtenu. En effet, une bande est observable à 310 pb, la

taille du gène (voir figure 5.14).

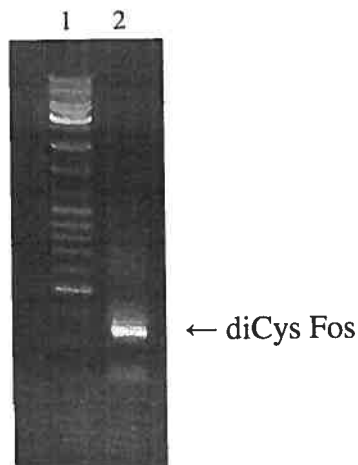


Figure 5.14 Résultats de la deuxième PCR (agarose 2%). Puits 1) marqueurs, puits 2) gène Fos muté (L56C,C99S).

L'obtention du gène muté pur a été effectuée via les mêmes étapes de purification que celles décrites plus haut. Par la suite, ce même gène a été clivé à l'aide des enzymes de restriction BamHI et HindIII et sous-cloné dans le plasmide pQE-32 via la même technique que décrite précédemment. Le plasmide recombinant ainsi obtenu a pu être transformé dans des bactéries XL1-bleu par électroporation afin d'obtenir une souche bactérienne capable d'exprimer notre protéine mutée Fos(L56C,C99S). Fait à noter, la mutation C99S n'a pas été introduite puisqu'elle était déjà présente dans le plasmide envoyé par le Pr. Curran.

Le résultat de la transformation a été placé sur gélose et après la croissance bactérienne, douze colonies ont été purifiées. Un aliquot de chacun des clones a été clivé par les enzymes de restriction NdeI et HincII pour bien identifier si l'insert est présent ou non. Nous avons eu la chance d'observer que 100 % des clones portaient l'insert.

Un séquençage a été réalisé par la suite sur le plasmide recombinant muté et aucune autre mutation non désirable n'a été révélée. L'expression protéique peut ainsi avoir lieu!

5.2.2. Expression, purification et caractérisation des protéines mCys-Fos et diCys-Fos

L'expression de la protéine Fos dicystéinée (que nous appellerons diCys-Fos) a évidemment dû être faite, mais nous avons également décidé d'exprimer la protéine monocystéinée (mCys-Fos). Cette expression supplémentaire pourra nous permettre de réaliser des études comparatives de fluorescence, ce qui peut s'avérer très intéressant quant à la sélectivité de nos fluorogènes.

L'expression s'est effectuée en utilisant une méthode tout à fait similaire à celle présentée pour TRXC35A. La plus grande différence est l'utilisation de l'antibiotique ampicilline plutôt que kanamycine pour faire la sélection puisque le plasmide utilisé pour Fos offre cette résistance. La purification a été, elle aussi, faite grâce à une colonne de nickel puisque les Fos possèdent également un His-tag tel que montré à la figure 5.8. Suite à toutes les étapes de purification, un gel de polyacrylamide a été réalisé afin de voir si la quantité en protéine est adéquate et si celle-ci est pure (voir figure 5.15).

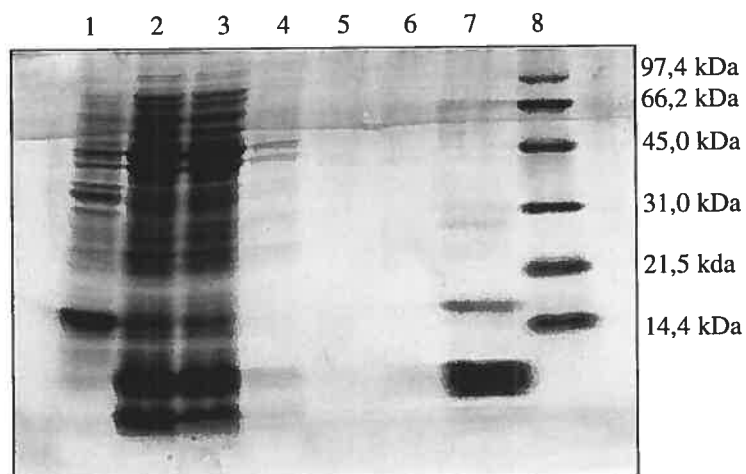


Figure 5.15 Résultats du SDS-PAGE (acrylamide 15%) des étapes de purification de la protéine diCysFos. Puits 1) culot, puits 2) lysat, puits 3) filtrat, puits 4, 5 et 6) lavages, puits 7) élution, puits 8) marqueurs.

Plusieurs informations peuvent être tirées de la figure 5.15. En effet, il est possible de constater qu'une protéine est exprimée. La protéine attendue a une masse de 12 kDa et la tache semble être un peu plus basse sur le gel soit environ 9 kDa (voir puits 7). Nous expliquerons plus tard que ce phénomène est dû à une dénaturation incomplète plutôt qu'à une protéine tronquée. De plus, nous constatons que cette expression se réalise en très grande quantité puisque la tache observée est très intense et le puits 3 démontre qu'il y a encore beaucoup de protéines qui ne se sont pas liées au nickel (donc trop concentré). Le puits 7 quant à lui laisse croire que la protéine est présente en grande quantité, mais que le milieu possède une petite impureté (tache à environ 16 kDa). Il sera démontré un peu plus loin que cette tache est en fait la protéine désirée sous forme dimérique. La protéine est donc exclusive, en très grande quantité et très pure. Un fait intéressant à remarquer en regardant le puits 1 correspondant au culot est que le dimère protéique semble avoir précipité en grande quantité.

La dernière étape de purification est le changement de tampon car la protéine ne peut pas être conservée dans le tampon d'élution (Nous utiliserons le tampon MES 25 mM pH 6.0). De plus, plutôt que de faire une dialyse, nous avons cette fois-ci opté pour une centrifugation sur une membrane avec une porosité de 10 kDa. Cette étape a été réalisée parce qu'initialement, nous n'étions pas certain que la tache à environ 9 kDa était la bonne (sa migration est un peu basse et les publications ne révèlent que la bande à environ 16-17 kDa¹²⁹). Ainsi, la protéine est demeurée retenue par le filtre, ce qui démontre que la masse réelle est de plus de 10 kDa, bien que sur SDS-PAGE elle semble de 9 kDa.

Bien que les conditions du SDS-PAGE soient très dénaturantes, la stabilité de la conformation tridimensionnelle du monomère et du dimère est reconnue pour être extrêmement élevée¹²⁹. Ainsi, pour comprendre les différentes tailles observées (9kDa vs 12 kDa vs 16 kDa) sur SDS-PAGE, nous avons conclu que la meilleure analyse à effectuer serait par électrophorèse capillaire. Les conditions utilisées (pH=2.00) dénaturent complètement la protéine (et ses complexes) et permet donc de

voir s'il s'agit de deux protéines distinctes ou d'une seule protéine. Les résultats de cette expérience sont présentés à la figure 5.16. Il est possible de constater que la protéine est unique puisqu'un seul pic est détecté par EC. Ce résultat est toujours observé en ayant recours à toutes les méthodes de purification possible et même sans purification antérieure (tampon de lyse, tampon MES 25 mM pH 6.0, dialyse). On peut donc conclure qu'une seule protéine est présente dans le milieu et que les taches à 9 kDa et 16 kDa sont en fait un monomère et un dimère. De plus, un clivage au bromure de cyanogène a coupé la protéine, un comportement conforme à ce qui était attendu. En effet, CNBr coupe les liens peptidiques du côté C terminal des méthionines, un acide aminé qui se retrouve dans notre protéine étudiée (revoir figure 5.8).

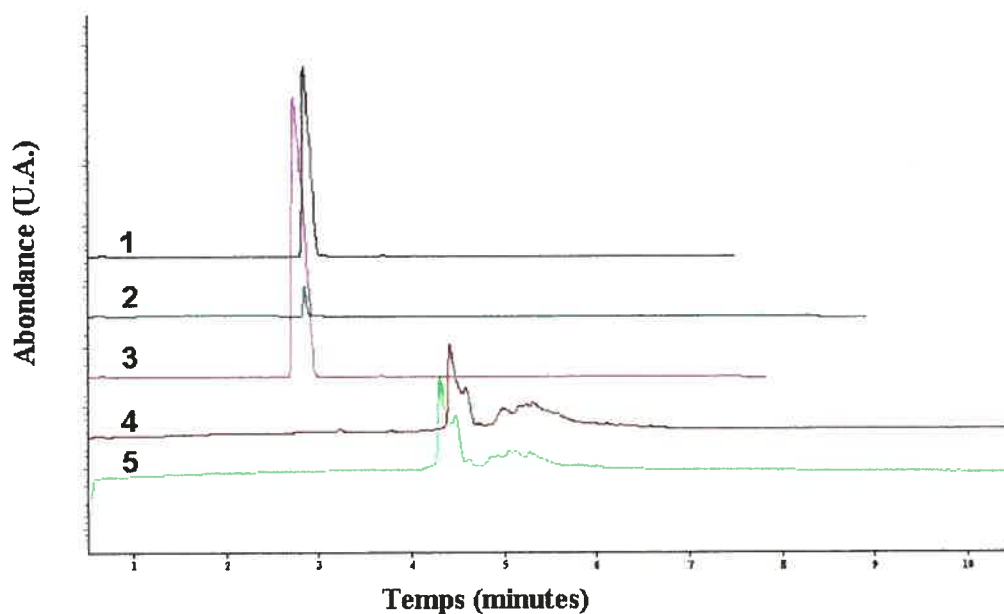


Figure 5.16 Résultats de l'électrophorèse capillaire (révélation par masse) de la protéine diCysFos. 1) EC du tampon de lyse, 2) EC du tampon MES, 3) EC de la dialyse, 4) EC du tampon MES traité au CNBr, 5) EC de la dialyse traité au CNBr.

La prochaine caractérisation nécessaire est de vérifier si la protéine diCysFos est bien une hélice α puisque c'est la seule façon de pouvoir être certain que la distance entre les thiols est fixe. Pour ce faire, une analyse par dichroïsme circulaire a été réalisée. Le dichroïsme circulaire est une technique permettant l'obtention d'un

spectre d'absorbance dans l'ultraviolet polarisé circulairement. Ainsi, comme dans tout spectre d'absorption, il y a un « ϵ » qui est dépendant de la stéréochimie globale de la protéine. Le spectre obtenu est significatif des liens amides du peptide et peut présenter quatre profils distinctifs soit une hélice α , un feuillet β , un tour β ou encore une région aléatoire⁴⁸. Le profil d'une hélice α pure présente trois pics distinctifs, c'est-à-dire un pic positif à 193 nm, un négatif à 208 nm et un dernier négatif à 222 nm¹³⁰. De plus, le pic à 222 nm devrait être plus prononcé que celui à 208 nm. En regardant la figure 5.17, il est possible de constater que les pics à 193 nm et à 222 nm sont présents, mais que celui à 208 nm est légèrement décalé vers la gauche (à 205 nm). De plus, la figure 5.18 démontre un pic à 222 nm moins intense que celui à 208 nm. L'élément essentiel à comprendre en dichroïsme circulaire est que le spectre est additif. Ainsi, la présence de tour β aurait eu pour effet de déplacer le pic positif vers la droite. Or, puisque ce dernier n'a pas du tout été déplacé, il est possible d'exclure sa présence. De plus, la présence de feuillets β est très peu probable puisque les acides aminés qui constituent le peptide diCysFos ne sont pas propices à former cette organisation structurale. Par contre, la présence de région aléatoire devrait donner un pic entre 198 et 202 nm. L'effet additif ainsi obtenu donne bien l'impression d'un déplacement du pic central de l'hélice α vers la gauche. Les résultats obtenus à la figure 5.18 sont donc représentatifs d'un spectre peptidique comportant une très grande région sous forme d'hélice α ainsi que d'une portion aléatoire. L'étude peptidique des acides aminés réalisée sur SwissProt a effectivement démontré que l'hélicité débute à l'acide aminé Glu31, se termine à l'acide aminé His95 et que le reste de la protéine est aléatoire. Les études de dichroïsme circulaire vont dans ce sens et laisse croire que les deux cystéines sont donc bien orientées dans l'espace. Ainsi, les études de fluorescence protéique sont envisageables.

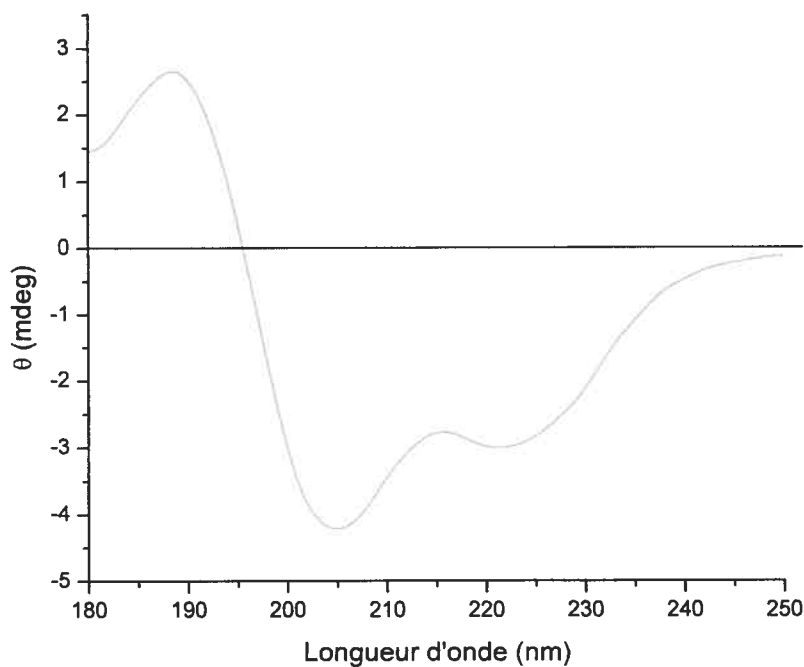


Figure 5.17 Résultats de l'analyse de diCysFos par dichroïsme circulaire (0.22mM dans du tampon MES 25 mM).

Afin d'éviter toute redondance, les résultats de l'expression du mCysFos (séquençage à l'appuis) ne sont pas présentés, mais ils sont semblables en tout point à ceux du diCysFos.

5.2.3. Études de la fluorescence du complexe fluorophore-protéine (Fos) purifié

Afin de vérifier si le marquage protéique fonctionne, nous avons fait une étude de fluorescence avec les composés **2** et **10** sur les protéines diCys-Fos et mCys-Fos. Les résultats sont présentés à la figure 5.18. Tout comme les résultats présentés pour la protéine TRXC35A à la figure 5.5 (puits 3 et 4), la révélation du gel avec la coloration au bleu de Coomassie n'est utile que pour démontrer la présence de la protéine, même en absence de fluorescence.

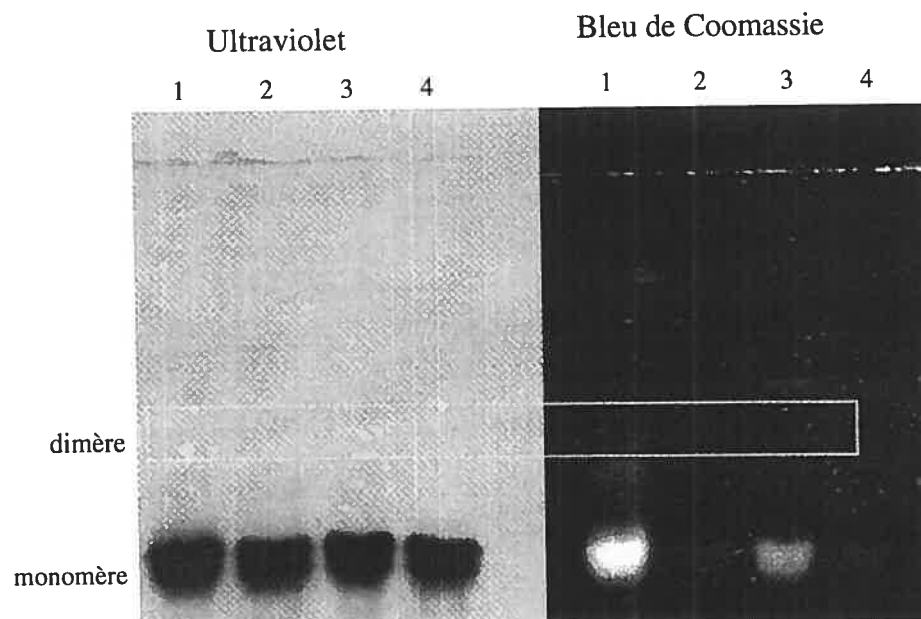


Figure 5.18 Gel SDS-PAGE (acrylamide 15%) des fluorogènes **2** (0.05 mM) et **10** (0.5 mM) avec les protéines diCys-Fos (0.22 mM) et mCys-Fos (0.22 mM) après réaction pour la nuit à 25 °C dans du tampon 9:1 MES 25 mM (pH 6.0)/DMSO. Puits 1) diCysFos + **10**, Puits 2) mCysFos + **10**, Puits 3) diCysFos + **2**, Puits 4) mCysFos + **2**

On constate d'abord que les complexes mCys-Fos avec les fluorogènes n'engendrent aucune fluorescence (puisque'un maléimide du fluorogène est toujours présent) (puits 2 et 4). Par contre, les complexes diCys-Fos avec les fluorogènes engendrent de la fluorescence (puits 1 et 3).

On remarque cependant que les concentrations de **2** (puits 3 et 4) sont beaucoup moins grandes que les concentrations de **10**. À première vue, il serait logique de penser que la différence de fluorescence n'est expliquée que par un facteur de concentration. Toutefois, nous verrons à la section 5.2.4. que c'est tout à fait le contraire. Les concentrations de **2** et de **10** utilisées pour ce test sont les concentrations optimales de fluorescence. Par conséquent, pour réaliser une étude quant à la différence fluorométrique entre les composés **2** et **10**, la situation illustrée à

la figure 5.18 n'est pas du tout adéquate. En effet, nous verrons un peu plus tard que si nous utilisons une concentration de 5×10^{-4} M (concentration pour une fluorescence optimale avec le composé **10**) pour les deux structures fluorogènes, le complexe avec **2** sera, à toute fin pratique, invisible en fluorescence.

Nous dirons tout de suite, même si les résultats seront analysés en détail plus loin dans ce chapitre, que la plus grande fluorescence observée avec le fluorogène **10** s'explique par le fait que celui-ci est de taille adéquate pour lier le diCysFos, ce qui lui confère une plus grande affinité. Le complexe diCysFos-**2** quant à lui, ne devrait pas être possible, mais il semble que la molécule puisse se tordre légèrement pour faire une double interaction avec la protéine (même si cette apposition est plus difficile). À cause de cette torsion, une moins bonne efficacité de liaison peut être observée, ce qui mène à la visualisation d'une plus faible fluorescence.

L'objectif de cette section, soit la visualisation de fluorescence par une liaison entre les deux maléimides des fluorogènes sur les deux sulfures de la protéine diCysFos, est donc atteint. Le système élaboré est tout à fait adéquat: la protéine monothiolée ne fluoresce pas et l'efficacité de liaison avec la protéine est nettement plus grande pour le composé **10** qui est de taille appropriée. Il reste cependant à éclaircir les notions mentionnées brièvement dans cette section concernant l'influence des concentrations des fluorogènes sur la fluorescence, ainsi que l'observation inattendue de fluorescence pour le complexe diCysFos-**2**.

5.2.4. Études du gradient de concentrations

Tel que décrit à la section précédente, des comportements différents de fluorescence ont été signalés lors de la formation du complexe protéine dithiolée - fluorogène à des concentrations variables. Une étude plus approfondie devait donc être réalisée afin de mieux comprendre ce phénomène. Ainsi, une étude de la protéine diCys-Fos à une concentration constante (les tests de Bradford évaluent la

concentration à 0.22 mM) a été réalisée avec des concentrations variables de fluorogène **10**. Les mêmes études ont ensuite été réalisées avec le fluorogène **2**. Les résultats de cette expérience sont présentés à la figure 5.19.

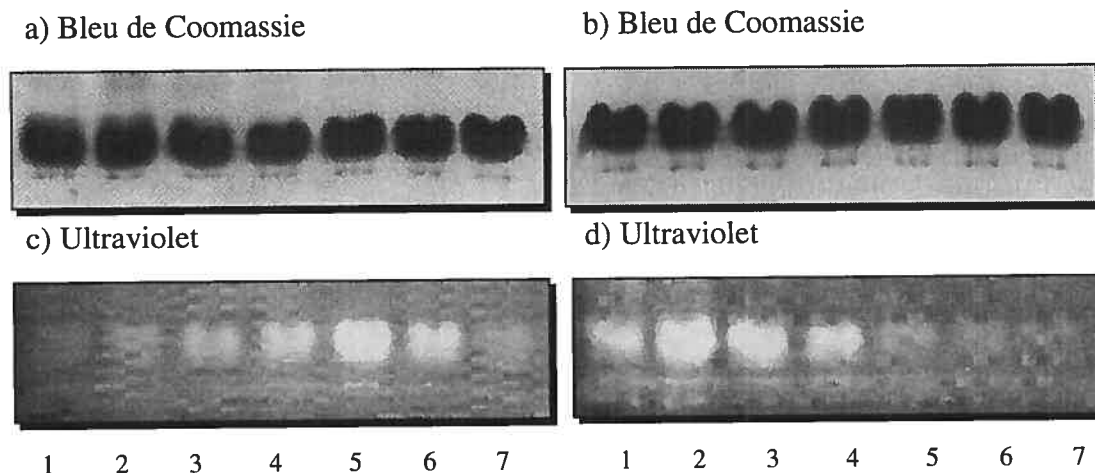


Figure 5.19 Résultats de l'étude du gradient de concentrations des fluorogènes **2** et **10** pour une concentration fixe de protéine (0.22 mM). Composé **10**: image a et c, composé **2**: image b et d. Puits 1) 10^{-3} M, puits 2) 5×10^{-4} M, puits 3) 10^{-4} M, puits 4) 5×10^{-5} M, puits 5) 10^{-5} M, puits 6) 5×10^{-6} M, puits 7) 10^{-6} M.

La fluorescence du complexe protéine-**10** est effectivement plus intense à forte concentration alors que la fluorescence du complexe protéine-**2** est plus intense à faible concentration. La première interprétation, pour expliquer la diminution de fluorescence de **10** avec la diminution de concentration, est simplement une question de rendement quantique. Puisque ce dernier n'est pas très élevé ($\Phi = 4.30 \times 10^{-3}$), la fluorescence est perdue avec des concentrations de l'ordre de 10^{-5} M. Par contre, à forte concentration, la réaction des maléimides sur les deux thiols se réalise très facilement et offre une très bonne fluorescence. La seule exception est la plus faible fluorescence à 10^{-3} M, ce qui s'explique par un facteur stœchiométrique de moins de un de la protéine diCysFos par rapport au fluorogène et peut être cumulé à un effet de quench de collisions.

Pour ce qui est de la fluorescence du complexe protéine-**2**, il est possible de remarquer une augmentation graduelle de fluorescence jusqu'à une concentration de 10^{-5} M puis une diminution de fluorescence à partir de 5×10^{-6} M. Cette valeur optimale est nettement moins élevée que celle du complexe avec le fluorogène **10**, ce qui s'explique par le rendement quantique plus grand de **2**. À des concentrations plus élevées, la fluorescence est moindre. Cela ne peut s'expliquer par un quench de collisions, car une concentration de l'ordre de 10^{-4} M est beaucoup trop diluée pour pouvoir faire ce type d'atténuation de fluorescence. De plus, les tests en cuvette, effectués à l'aide d'un fluorimètre, avec **2** n'ont jamais démontré de quench de collisions à cette concentration puisque nous avons obtenu une droite pour le graphique d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration⁸⁰. Cela ne peut pas être dû, non plus, pour les puits 2 et 4 au ratio stœchiométrique puisque la protéine est toujours à 0.22 mM dans tous les échantillons, ce qui correspond à une plus grande concentration protéique. Ainsi, l'hypothèse la plus plausible est que le composé **2** lie facilement son premier maléimide sur la protéine, mais est de taille inappropriée pour faire la deuxième liaison maléimide-soufre. Celle-ci est alors très lente puisque la molécule doit se tordre afin d'obtenir la distance de 15 Å nécessaire. Ainsi, à de fortes concentrations, une deuxième molécule de **2** pourrait venir se fixer au complexe empêchant une cyclisation et offrant alors un complexe protéine-(**2**)₂ qui n'est pas fluorescent. Par contre, à de faibles concentrations, la torsion de la molécule peut avoir lieu puisqu'elle a un grand délai pour se réaliser (voir figure 5.20).

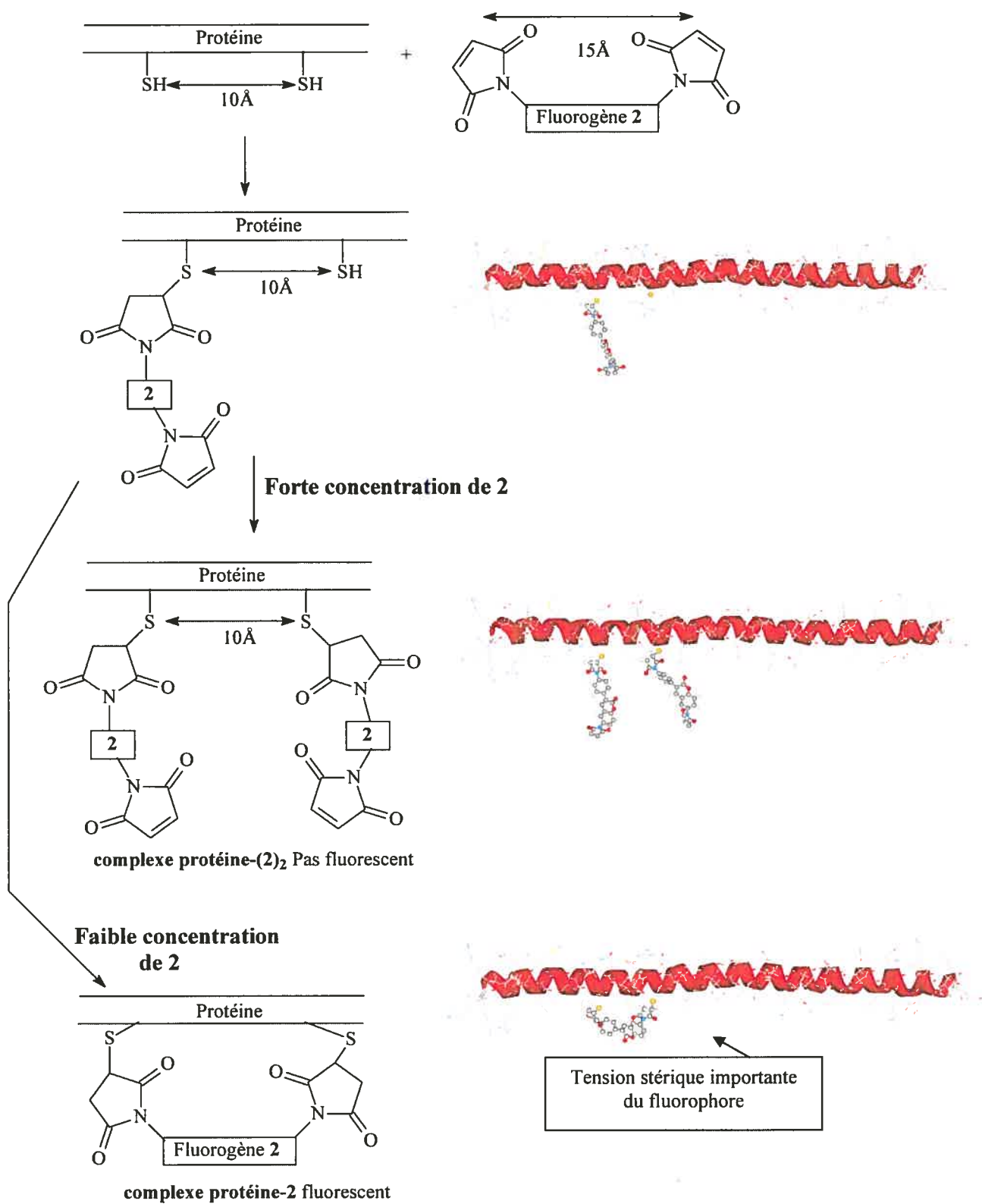


Figure 5.20 Représentation simplifiée du complexe protéine-diCysFos en réaction avec le composé 2 à de fortes et faibles concentrations.

Ce phénomène ne constitue donc pas un problème en soi (comme cela a pu sembler être le cas à la section précédente) puisque les fluorogènes ne seront jamais placés simultanément lors des études de fluorescence. Même si cela était le cas, nous travaillerions toujours à forte ou à faible concentration, ce qui discrimine toujours un des deux fluorogènes. Et encore là, même si nous travaillerions à fortes concentrations de **10** et à faibles concentrations de **2**, nous avons vu à la section précédente que la fluorescence est beaucoup moins forte pour le composé **2** que pour le **10** puisque l'efficacité de liaison est de loin plus adéquate avec un fluorogène dont la distance entre les deux maléimides est de 10 Å pour la protéine diCysFos.

En comparant la fluorescence du complexe protéine-**10** à 5×10^{-4} M et **2** à 10^{-5} M de la figure 5.19, elle semble très similaire. Par contre, la même comparaison est faite à la figure 5.18 et on y dénote une très grande différence. Il faut savoir, ici, que l'on ne doit jamais comparer une différence de fluorescence entre deux gels distincts provenant d'une photographie sous la lampe U.V. puisque l'irradiation peut varier légèrement (contrairement aux photographies prises par microscopie qui seront détaillées au chapitre 6). Il est adéquat de comparer l'intensité de fluorescence de deux structures distinctes sur un même gel tel que présenté aux figures 5.5 et 5.18. Ainsi, les gels à la figure 5.19 permettent de déceler une tendance de fluorescence pour un même fluorogène, mais ne peuvent être comparés entre eux.

5.2.5. Étude du lysat cellulaire

Une autre étape délicate est l'étude de sélectivité protéique. Nous savons que plusieurs protéines cellulaires possèdent des cystéines. Bien que celles-ci soient généralement localisées à l'intérieur de la structure tridimensionnelle des protéines, impliquées dans des ponts disulfures⁴⁸, il est possible de retrouver certains thiols exposés à leur surface. Cependant, il ne faut pas oublier que pour avoir un marquage protéique avec les fluorogènes synthétisés, une distance bien précise entre les thiols doit être retrouvée ce qui est plutôt rare chez les protéines. Par conséquent, le

marquage protéique avec le fluorogène pourrait se faire non seulement sur la protéine diCys-Fos, mais également sur les autres protéines du lysat cellulaire. Nous devons donc faire ce test pour s'assurer de la faible présence, voire de l'absence, de protéines autres que diCysFos pouvant faire le marquage protéique. Ainsi, nous avons pris un peu du lysat cellulaire (puits 2 de la figure 5.15) et nous avons fait une incubation avec les fluorogènes **2** et **10** (séparément) dans leur concentration optimale de fluorescence pour 4h à la température de la pièce. Par la suite, un gel SDS-PAGE a été réalisé (voir résultats à la figure 5.21).

Tel que décrit précédemment, dans un milieu cellulaire, diCysFos existe de manière plus abondante sous forme de dimères. Ainsi, le marquage protéique de **10** avec le lysat révèle le complexe avec le diCys-Fos monomérique et dimérique. De plus, la sélectivité semble très bonne puisqu'il n'y a pas vraiment d'autres types de protéines qui ressortent très intensément marquées. Le fluorogène **2**, pour sa part, est à peine perceptible à sa concentration optimale. Ainsi, la sélectivité a été démontrée.

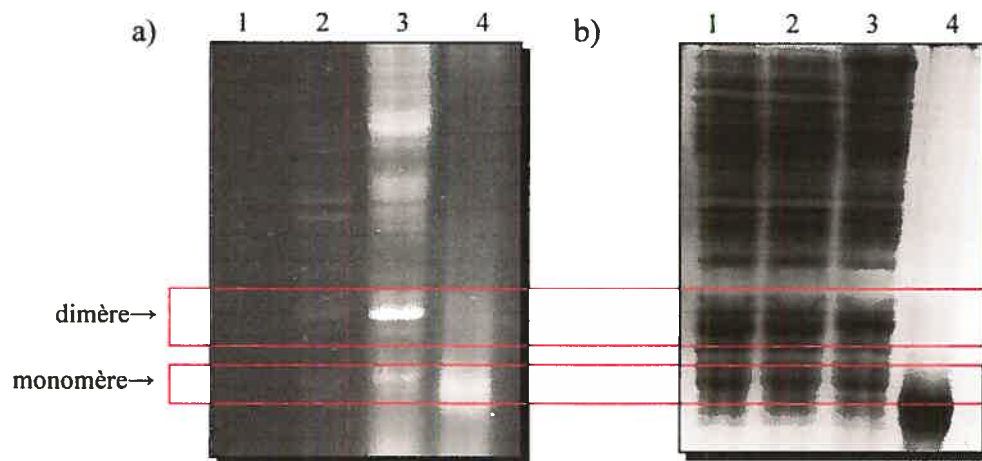


Figure 5.21 Études de sélectivité a) sous ultraviolet, b) au bleu de Coomassie. Puits 1) lysat cellulaire sans fluorogène, puits 2) lysat cellulaire avec $[2]=10^{-5}$ M, puits 3) lysat cellulaire avec $[10]=5 \times 10^{-4}$ M, puits 4) diCys-Fos monomérique purifié.

CHAPITRE 6
Études du marquage
protéique *in vivo*

Puisque les tests contrôles *in vitro* ont été concluants, il est possible maintenant d'accéder à un autre niveau et de réaliser une étude *in vivo*. Nous procéderons tout d'abord à une étude de l'impact des composés **2** et **10** sur la croissance cellulaire dans une bactérie puis dans une cellule eucaryote. Par la suite, des études cellulaires de fluorescence seront réalisées.

6.1. Étude des composés **2** et **10** sur la croissance cellulaire de la bactérie XL1-bleu

La première étude qui fut envisagée était de faire croître des colonies bactériennes de XL-1 bleu sur des géloses. Pour ce faire, plusieurs expériences ont été réalisées en modifiant certains paramètres tels que la température d'incubation, la présence ou non de fluorogène, d'IPTG et du vecteur d'expression de la protéine diCysFos. Le tableau VI présente les différentes tentatives réalisées.

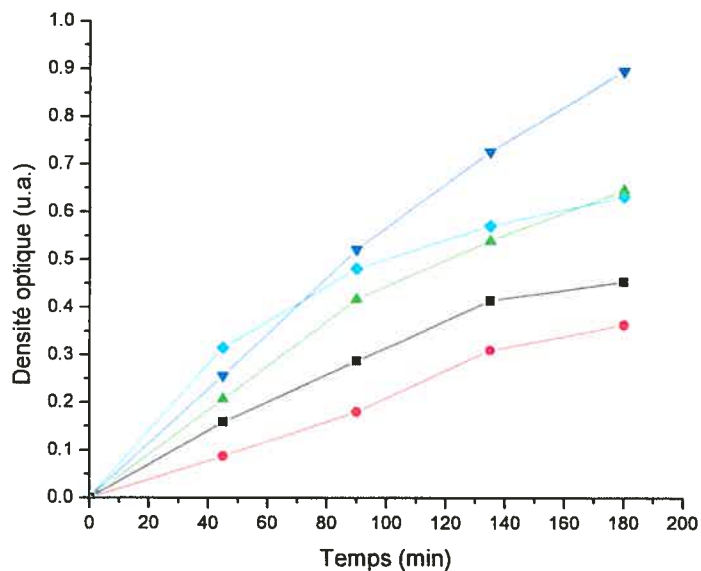
Tableau VI Résultats des études de croissance cellulaire chez la bactérie

Température (°C)	Fluorogène	IPTG (1mM)	Bactérie / vecteur	Croissance bactérienne
28	Non	Oui	XL1-bleu	Oui
28	Non	Oui	XL1-bleu + plasmide de Fos	Non
37	Non	Oui	XL1-bleu	Oui
37	Non	Non	XL1-bleu	Oui
37	10	Oui	XL1-bleu	Oui
37	10	Non	XL1-bleu	Oui
37	2	Oui	XL1-bleu	Oui
37	2	Non	XL1-bleu	Oui
37	Non	Oui	XL1-bleu + plasmide de Fos	Non
37	Non	Non	XL1-bleu + plasmide de Fos	Oui

Les résultats du tableau VI semblent plutôt étranges puisque la présence des fluorogènes **2** ou **10** n'empêche pas la croissance bactérienne de XL1-bleu. Par contre, la présence d'IPTG dans XL1-Bleu portant le vecteur inhibe la croissance des bactéries.

Afin de mieux comprendre ces résultats, une autre expérience fut réalisée. En effet, nous avons fait croître des bactéries XL1-bleu avec et sans le vecteur d'expression de la protéine diCysFos dans un bouillon de culture jusqu'à ce que la densité optique soit de 0.6. Il est possible de suivre la croissance des bactéries en mesurant la dispersion de la lumière visible, causée par les cellules de celles-ci à 600 nm. Plusieurs études de croissance bactérienne ont été effectuées en variant l'ajout de différents composés (IPTG, DMSO, fluorogène...) dans chaque type de bouillon de culture A et B. Les résultats sont présentés à la figure 6.1. Les valeurs de densité optique figurant sur les graphiques ont été obtenues en soustrayant celle de la densité optique initiale. Cette soustraction est en effet essentielle puisque l'ajout des différents composés influence la D.O. dans des ratios qui sont propres à chaque solution. Ainsi, immédiatement après l'ajout des différents constituants, une D.O. a été prise et est devenue le point zéro.

a) Bouillon de culture A: bactérie XL-1 bleu + vecteur d'expression de diCysFos



b) Bouillon de culture B: bactérie XL-1 bleu sans vecteur d'expression de diCysFos

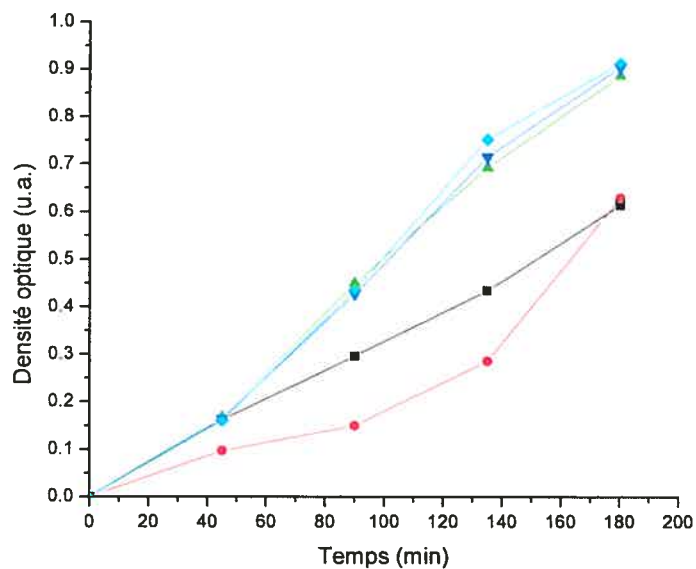


Figure 6.1 Croissance de XL1-bleu dans différents milieux d'expression protéique. bleue foncée: DMSO 3.7 %, bleue pâle: DMSO/IPTG (1mM), verte: IPTG, noire: 2 (5×10^{-4} M dans DMSO)/IPTG, rouge: 10 (5×10^{-4} M dans DMSO)/IPTG.

La figure 6.1 montre très clairement que ni **2**, ni **10** n'empêche la croissance bactérienne et ce, même à la concentration démesurée de 5×10^{-4} M (les concentrations utilisées *in vivo* sont toujours plus faibles soit de l'ordre de 10^{-5} M ou 10^{-6} M)¹³¹.

Elle montre également qu'aucun substituant ne semble tuer la cellule. Il est vrai que la croissance bactérienne diminue lors de l'ajout de réactifs (par rapport à XL1-bleu seul), mais il n'en demeure pas moins qu'ils ne tuent pas la cellule. Une colonie, même toute petite aurait donc dû être observée sur gélose dans l'expérience précédente, ce qui ne fût pas le cas. La seule hypothèse qui peut être avancée est que c'est la protéine qui est problématique (à de très fortes concentrations). En effet, il faut garder à l'esprit que Fos est une protéine qui possède le rôle de lier l'ADN. Ainsi, la production d'une immense quantité de protéines pourrait former des agrégats qui peuvent précipiter⁴⁸ ou encore lier l'ADN et perturber l'homéostasie cellulaire⁴⁸. Si l'on retourne voir la figure 5.15, il est possible de remarquer à quel point la protéine est exprimée en grande quantité. La surexpression pourrait donc empoisonner la cellule.

Il faut faire la différence entre l'expérience réalisée en bouillon de culture et le test sur gélose. L'expérience en bouillon de culture prenait des cellules XL1-bleu (avec le plasmide) en phase exponentielle (le moment où elles sont les plus en forme) et on y ajoutait ensuite l'IPTG. La croissance bactérienne avait alors le temps de se produire avant qu'elles ne soient empoisonnées par une trop grande production de protéines. Par contre, l'expérience réalisée sur pétris place plusieurs fois une cellule unique sur une gélose. Cette dernière peut effectivement se répliquer sur la gélose avant d'être empoisonnée, mais jamais suffisamment pour qu'elle ne forme une colonie que l'on puisse à voir à l'oeil nu.

Par conséquent, les études cellulaires dans les bactéries devront être mises de côté puisque l'expression protéique est trop abondante et cause des problèmes de survie cellulaire.

6.2. Étude de cytotoxicité dans les cellules eucaryotes

Contrairement aux bactéries, les cellules eucaryotes n'expriment pas les protéines avec autant d'efficacité¹³² (ce qui devrait être avantageux dans notre cas). Par contre, son mécanisme de reconnaissance de protéines étrangères est beaucoup plus efficace et les petites protéines telles que Fos sont facilement reconnues et détruites. La manière de contrer ce problème est de greffer Fos sur une autre protéine plus volumineuse. Il ne faut pas croire que ceci constitue un problème puisque c'est en fait notre objectif principal. En effet, nous avons spécifié en introduction que l'objectif était de greffer une toute petite protéine (Fos) sur une protéine d'intérêt. On dit alors que cette dernière se voit marquée. Il pourrait ainsi être possible de suivre son évolution dans la cellule.

Puisque les résultats préliminaires illustrés dans les chapitres précédents ont semblé très encourageants, le groupe de recherche en collaboration avec nous (le groupe du Pr S. Michnick) a augmenté ses effectifs afin de construire rapidement cette nouvelle protéine pouvant être liée à Fos. La protéine d'intérêt qui a été choisie est Raf (N.B.: Raf et Fos sont séparés par un espaceur de 5 acides aminés (GGGGS)). Cette protéine est très intéressante puisqu'elle est très bien connue en littérature^{133,134,135} et est une des protéines utilisées et étudiées dans le groupe du Pr S. Michnick. Cette protéine existe sous deux formes. La première forme (non active) est libre dans le cytoplasme de la cellule et la seconde forme (active) est liée à la protéine Ras, une protéine elle-même directement liée aux parois membranaires. Ras et Raf sont des protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire induite par les facteurs de croissance^{136,137}. Raf et Ras participent à des processus biologiques comme la prolifération et la différenciation cellulaires pour ne nommer que ceux-ci. La localisation cellulaire peut se produire après une activation de Ras (par un échange entre GDP et GTP¹³⁸) (voir la figure 6.2). Il est à noter que Raf n'est pas complet (la protéine recombinante utilisée dans ces tests est un fragment de Raf), ce n'est que la

partie essentielle à la liaison de Ras qui sera exprimée (région appelée RBD pour Ras Binding Domain).

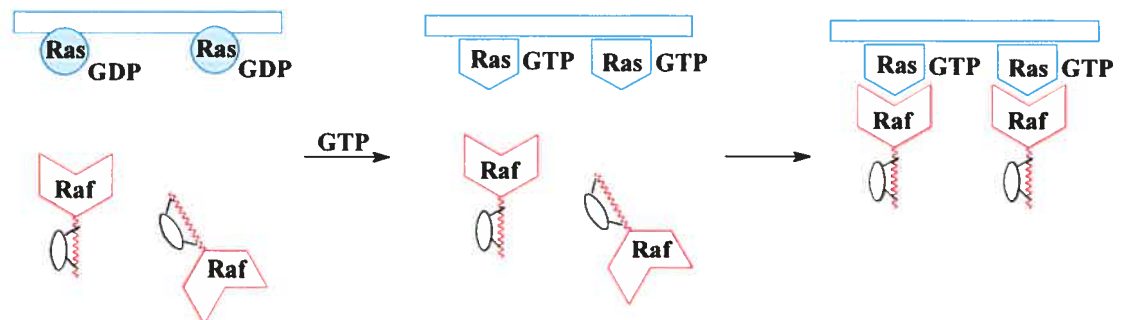


Figure 6.2 Voie de localisation cellulaire de la protéine Raf suite à l'activation de Ras

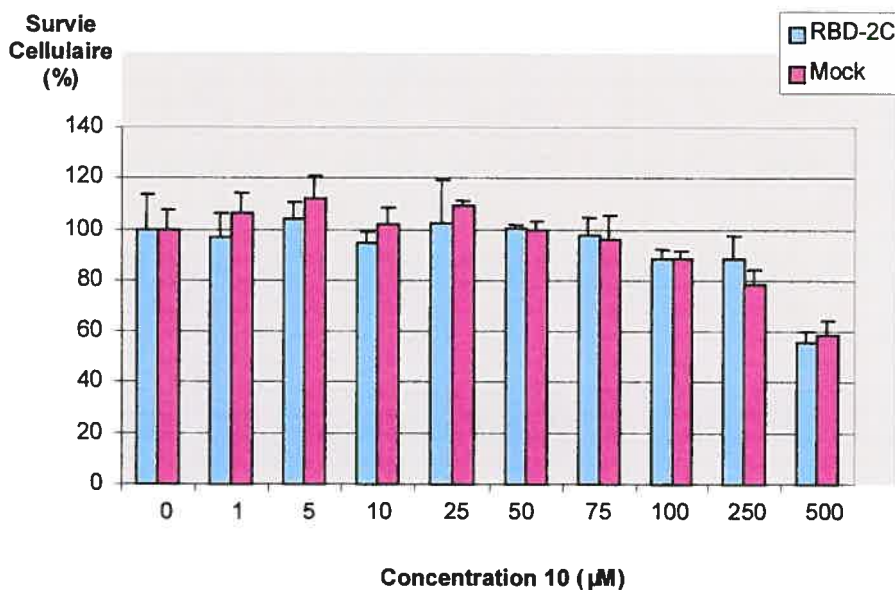
Avant de passer à une étude de marquage protéique et de localisation cellulaire (au niveau de la membrane), il est essentiel de vérifier la cytotoxicité des fluorogènes au sein de cellules eucaryotes. Ici, seule la molécule **10** a été testée puisque nous avons démontré que c'est la seule molécule qui a le pouvoir de marquer avec efficacité la protéine Fos mutante (portant deux thiols distants de 10 Å).

Les cellules eucaryotes, dont il est question pour cette étude, sont les Cos-1 et les HEKC293. Avant de décrire les résultats obtenus concernant la cytotoxicité, il est intéressant de présenter les cellules utilisées. Les cellules Cos-1 (African green monkey cells) offrent l'avantage d'exprimer facilement et efficacement les protéines. Cependant, elles présentent l'inconvénient de posséder une fluorescence intrinsèque qui nuit au traitement de l'image lors de l'utilisation du logiciel de déconvolution. Pour leurs parts, les cellules HEKC293 (Human embryonic kidney cells) offrent une très bonne expression protéique, mais moins forte que pour les Cos-1, et leurs membranes cellulaires sont plus perméables que les Cos-1.

Deux souches de chacune des cellules eucaryotes ont été soumises aux études de cytotoxicité. La première possède le plasmide qui code pour Raf-diCysFos (RBD-2C dans la légende de la figure 6.3) et la seconde possède un plasmide (Mock) qui ne

code pour aucune protéine, et qui permet une étude plus rigoureuse et enlèvera le doute de cytotoxicité due à la seule présence du plasmide. Les études ont été réalisées dans le laboratoire du Pr Michnick par M.Sc. Galia Ghaddar. Elle a mis en contact les souches de cellules Cos-1 avec des concentrations croissantes de **10** dans du HBSS-DMSO 5 % pour une durée totale de 30 minutes à la température de la pièce (HBSS est un tampon (Hank's Balanced Salts Solution) dont la composition est: NaCl 8 g/L, Sodium Phosphate dibasique 0.05 g/L, KCl 0.4 g/L, Potassium Phosphate monobasique 0.06 g/L, MgSO₄ 0.098 g/L, CaCl₂ 0.14 g/L, D-glucose 1.00 g/L, Phénol rouge 0.01 g/L). Les échantillons ont ensuite été soumis à l'essai MTT. Les tests ont été faits en triplicata et les résultats obtenus sont présentés à la figure 6.3.

a)



b)

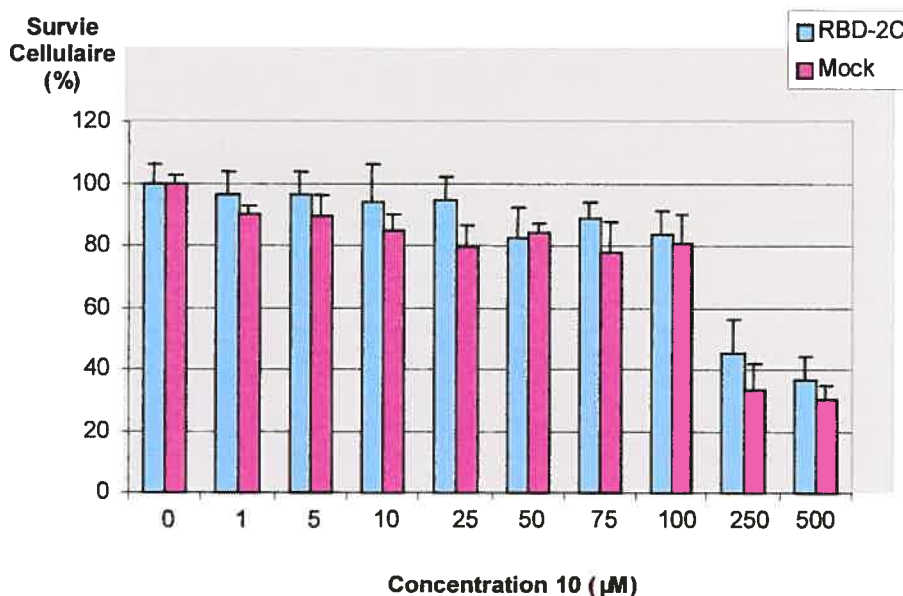


Figure 6.3 Résultats du test de cytotoxicité du composé **10** sur les cellules a) Cos-1 et b) HEKC293.

L'essai MTT est un test impliquant une molécule, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrasodium, de couleur jaune pâle. Cette dernière peut subir une transformation d'oxydoréduction due à la présence d'une enzyme mitochondriale (une déshydrogénase). Cette enzyme transforme donc le MTT en un composé bleu foncé, indiquant ainsi la présence de cellules vivantes. En effet, les études ont démontré qu'une cellule, même fraîchement morte, voit ses déshydrogénases mitochondriales complètement inhibées. Le test MTT est donc un révélateur de cellules vivantes^{139,140,141}.

Les résultats démontrent donc clairement que la molécule **10** n'est pas cytotoxique, ce qui est en accord avec les études présentées avec les tests bactériens. De plus, la cellule eucaryote ne semble pas produire suffisamment de protéines pour que cette dernière puisse causer des dommages irréparables à la cellule. Sur cette note encourageante, nous pourrions procéder à des études de marquage protéique.

6.3. Études de marquage protéique

Une fois l'expression réalisée, les cellules furent placées en présence du fluorogène **10** (10 μM) pour des durées variables, puis visualisées par microscopie confocale. Les résultats des expériences sont présentés aux figure 6.4 et 6.5. Pour chaque temps d'exposition, quatre images sont représentées. Celles du haut représentent les images révélées à l'ultraviolet et celles du bas sont les images perçues dans le visible. Ces dernières sont présentées simplement pour démontrer qu'une absence de fluorescence n'est pas due à une absence de cellules. Les deux images de gauche sont représentatives d'une expression de la protéine d'intérêt (Ras-diCysFos) et les images de droites correspondent au plasmide Mock qui n'exprime aucune protéine.

La première constatation à réaliser entre les deux souches de cellules étudiées est la différence quant au temps de réaction avec le fluorogène **10**. Nous avons constaté que les temps de 45 min pour HECK293 et 20 min pour Cos-1 sont les temps optimum. Une durée de réaction plus longue ou moins longue n'améliore pas l'intensité de fluorescence perçue pour ces images. En effet, nous remarquons une croissance de fluorescence jusqu'au temps optimal indiqué et l'obtention d'un plateau de fluorescence pour des durées supérieures. Par contre, puisque le fluorogène **10** réagit très lentement avec des thiols non spécifiques (glutathion ou autres) dans la cellule eucaryote, une augmentation linéaire faible mais constante du bruit de fond de fluorescence est observée. Par conséquent, une déconvolution a dû être réalisée pour soustraire cette fluorescence basale et c'est donc pour cette raison qu'il n'est pas avantageux de laisser exposer la cellule au fluorogène plus longtemps que le temps optimal.

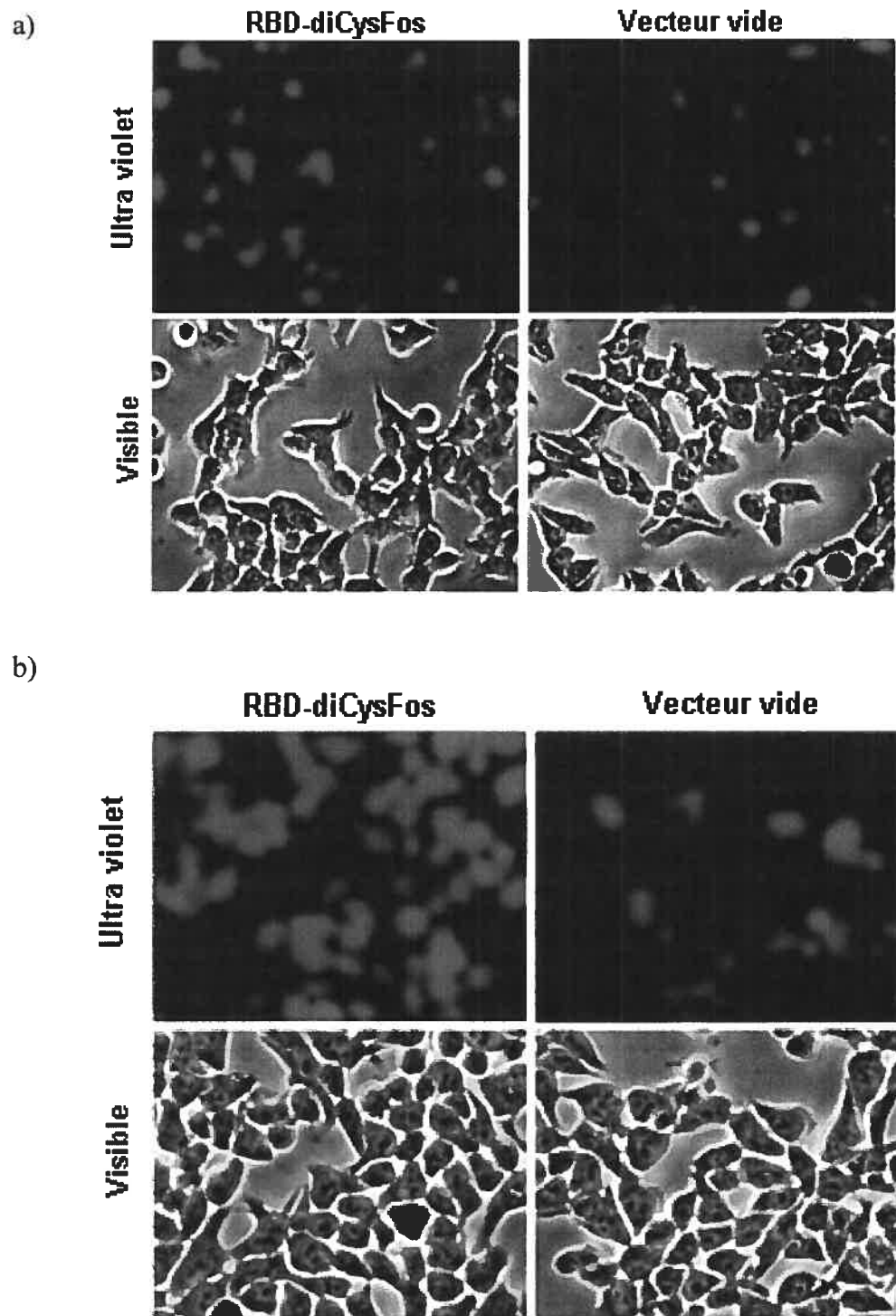


Figure 6.4 Résultats du marquage protéique de HEK293 exprimant la protéine Raf-Fos ou non (plasmide Mock) en présence de ^{125}I pour a) 20 min, b) 45 min

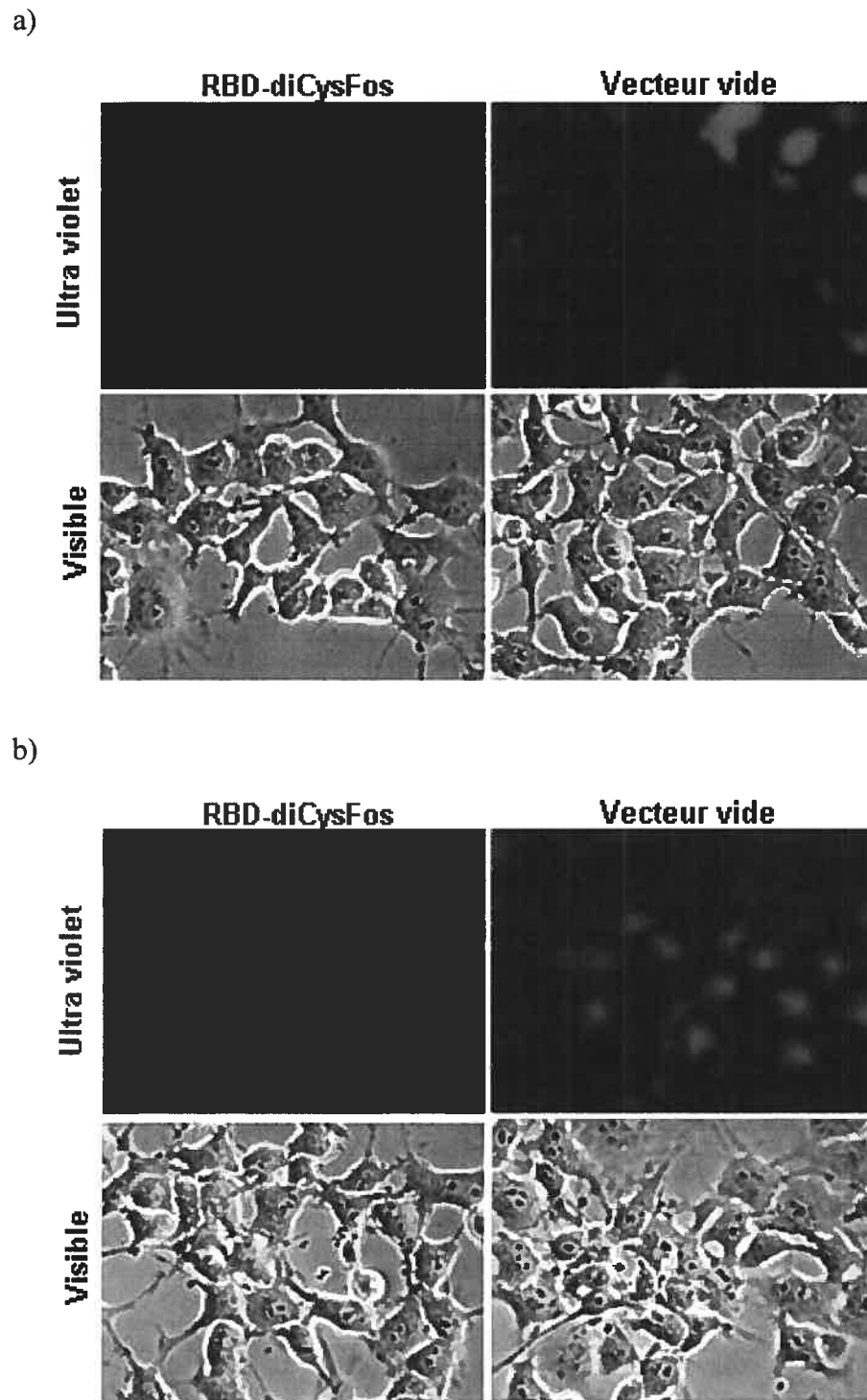


Figure 6.5 Résultats du marquage protéique de Cos-1 exprimant la protéine Raf-Fos ou non (plasmide Mock) en présence de 10 pour a) 10 min, b) 20 min

Le marquage protéique semble donc très efficace. Des études de localisation protéique au niveau des membranes cellulaires furent donc tentées via l'activation de Ras par l'ajout de GTP.

6.4. Étude de localisation cellulaire

Les résultats de localisation cellulaire ne sont malheureusement pas concluants. La localisation semble aléatoire voire même légèrement dirigée vers le noyau cellulaire. Par contre, il est peu probable que ce soit l'inactivation de Ras qui soit la cause de l'échec puisqu'il s'agit d'un système très connu et réputé pour sa grande efficacité de localisation membranaire¹³⁸. La légère tendance de localisation de la protéine d'intérêt Raf-diCysFos vers les noyaux nous démontre que la portion diCysFos est potentiellement capable de compétitionner avec celle de Raf. En effet, bien que Raf lutte pour se diriger vers Ras, diCysFos dirigerait la protéine vers les noyaux pour se lier à l'ADN. Il suffit en fait de se rappeler que diCysFos possède une affinité pour l'ADN, tel que discuté à la section 5.2.

Ainsi, nous sommes parvenus à la limite du potentiel de l'outil de travail actuellement développé. Une protéine d'intérêt fusionnée avec Fos permet de faire un marquage protéique, mais ne permet pas de faire une étude de localisation cellulaire spécifique aux membranes en raison d'une compétition potentielle. Nous verrons dans le chapitre 7 concernant les projets futurs, les modifications envisagées afin de contrer ce problème.

CHAPITRE 7
Projets Futurs
et Conclusion

À la lumière des résultats obtenus jusqu'à maintenant, il est évident que nous sommes en présence d'un nouvel outil biochimique capable de marquer une protéine dicystéinée. Une très grande diversité d'applications peut alors être envisagée. Nous discuterons, dans ce chapitre, des différentes optimisations et applications potentielles qui pourront constituer plusieurs projets futurs au sein du laboratoire.

7.1. Conception d'hélices α minimisées pour remplacer le diCysFos

Tel que décrit au chapitre 6, les études de localisation cellulaire se sont avérées infructueuses puisque la protéine diCys possède elle-même une localisation qui lui est propre (au niveau du noyau cellulaire). Ainsi, il serait intéressant de construire des hélices artificielles qui n'ont aucun rôle biologique, et donc aucune localisation cellulaire spécifique. Pour ce faire, nous nous sommes inspirés des peptides artificiels de G. A. Woolley¹⁴², qui lui-même s'est basé sur des études menées sur un peptide hélicoïdal et monomérique développé par le Pr. R. L. Baldwin¹⁴³ et le Pr. E. Stellwagen¹⁴⁴.

Le Pr. Woolley étudie des hélices α artificielles possédant deux cystéines liées à une molécule (un azobenzène). Cette dernière porte une double liaison qui existe sous forme *cis* ou *trans*¹⁴². La forme *trans* favorise les hélices α et la forme *cis* les détruit. L'objectif principal de ses recherches consiste à contrôler l'activité d'une enzyme (ou peptides) via la modification de sa structure tridimensionnelle occasionnée par le changement d'isométrie géométrique de la molécule qui y est greffée. Ainsi, la caractérisation de ces peptides a été faite et nous servira de modèle de base pour créer nos propres hélices α dithiolées. La séquence peptidique de Woolley choisie est la suivante: Ac-EACAREAAAREAACRQ-NH₂. Ce peptide est artificiel (acétylé en *N*-terminal et sous la forme d'amide en *C*-terminal), car sa synthèse a été réalisée sur support solide. Par contre, nos polypeptides (voir page suivante) seront exprimées par la cellule. Ainsi, nous devons utiliser une séquence

légèrement différente afin de conserver l'hélicité soit LSAA-...-AGGK. L'ajout de cette petite séquence est connu en littérature et a été établi par le Pr. A. J. Doig¹⁴⁵. Les parties ajoutées sont des extrémités qui stabilisent l'hélice en renforçant le moment dipolaire.

À la figure 7.1, trois protéines conceptualisées sont illustrées. Le calcul du pourcentage d'hélicité fut réalisé en utilisant l'algorithme AGADIR¹⁴⁶ et sont basées sur le travail du Pr. L. Serrano¹⁴⁷. Chacune des hélices possède une distance bien précise entre les deux fonctions thiol respectivement de un, deux ou trois tours d'hélice α correspondant à 5 Å, 10 Å et 15 Å respectivement.

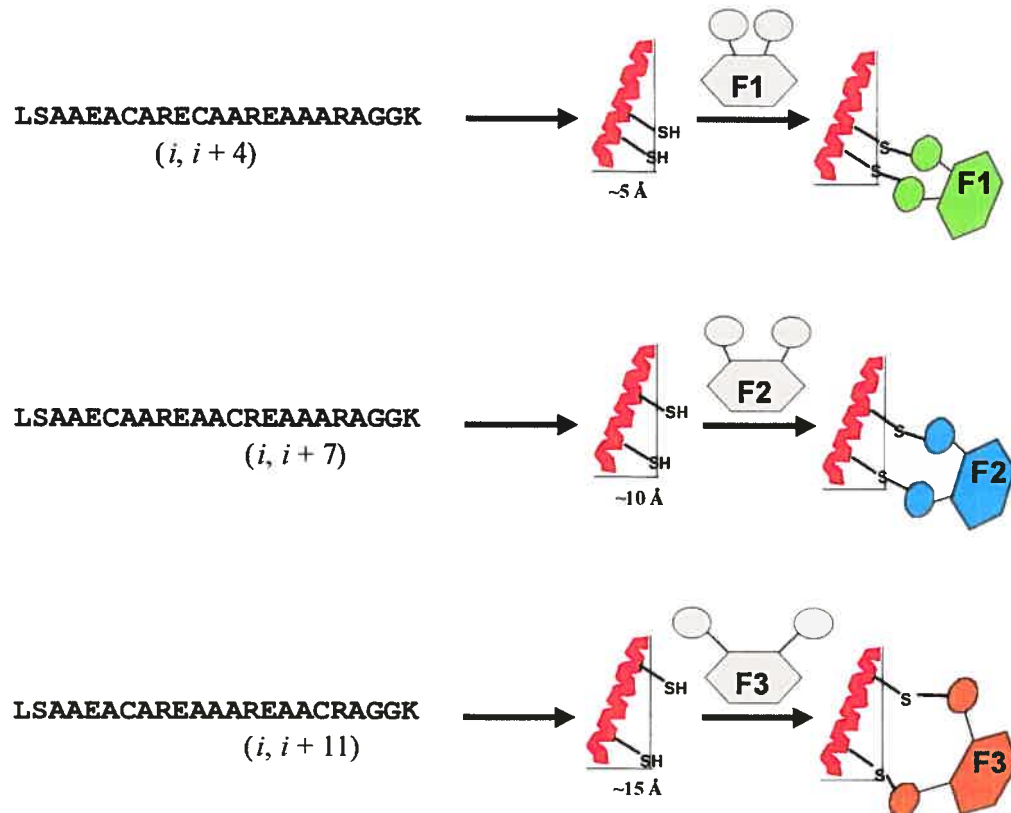


Figure 7.1 Représentation de la conception des nouvelles hélices α .

Il serait donc possible de construire ces trois protéines et de tenter à nouveau des études de localisation cellulaire via l'activation de Ras. Effectivement, il ne

devrait plus y avoir de problèmes puisqu'il n'y aura plus de compétition de localisation à l'intérieur de la cellule entre Ras et la nouvelle hélice artificielle.

7.2. Élaboration de nouveaux fluorogènes

À la lumière des résultats obtenus lors des études *in vivo*, il est possible de marquer une protéine dans une cellule. Par contre, le bruit de fond de fluorescence observé à l'intérieur même d'une cellule est plus important que nous l'aurions espéré. Ce phénomène est observable dans toutes les classes de cellules testées et est probablement dû à des liaisons non spécifiques entre le fluorogène **10** et de petites molécules portant des sulfures telles que le glutathion. Par le fait même, il serait à notre avantage de créer de nouveaux fluorogènes qui possèdent une plus grande différence de fluorescence entre le complexe thiolé et le fluorogène seul.

Par abus de langage, nous parlerons de la synthèse de molécules ayant un meilleur rendement quantique, mais il faut comprendre que nous parlons en fait de fluorogènes ayant une plus grande efficacité de fluorescence entre sa forme complexée à la protéine dicystéinée et celle non complexée. En effet, une molécule ayant un très grand rendement quantique pourrait ne présenter qu'une très faible différence de fluorescence entre ces deux formes.

Par la même occasion, nous avons choisi d'élaborer des structures qui pourraient offrir des longueurs d'émission dans le rouge, le vert ou le bleu. Ces variations des longueurs d'onde d'émission pourront être exploitées dans une technique de FRET modifiée que nous avons envisagée. Cette technique sera expliquée en détail à la section 7.4. Pour concevoir ces nouveaux fluorogènes, nous avons utilisé des structures chimiques reconnues pour leur grande fluorescence dans le rouge et portant deux fonctions amines séparées par des distances de 5, 10 ou 15 Å tel que présenté à la figure 7.2. Il faut bien remarquer que ces distances entre les maléimides n'ont pas été déterminées de façon aléatoire, mais bien pour qu'elles soient concordantes avec les distances entre les deux thiols des hélices α présentées à

la section 7.1. Ce travail a été réalisé avec Tze Chieh Shiao dans le cadre d'un stage d'été (été 2004).

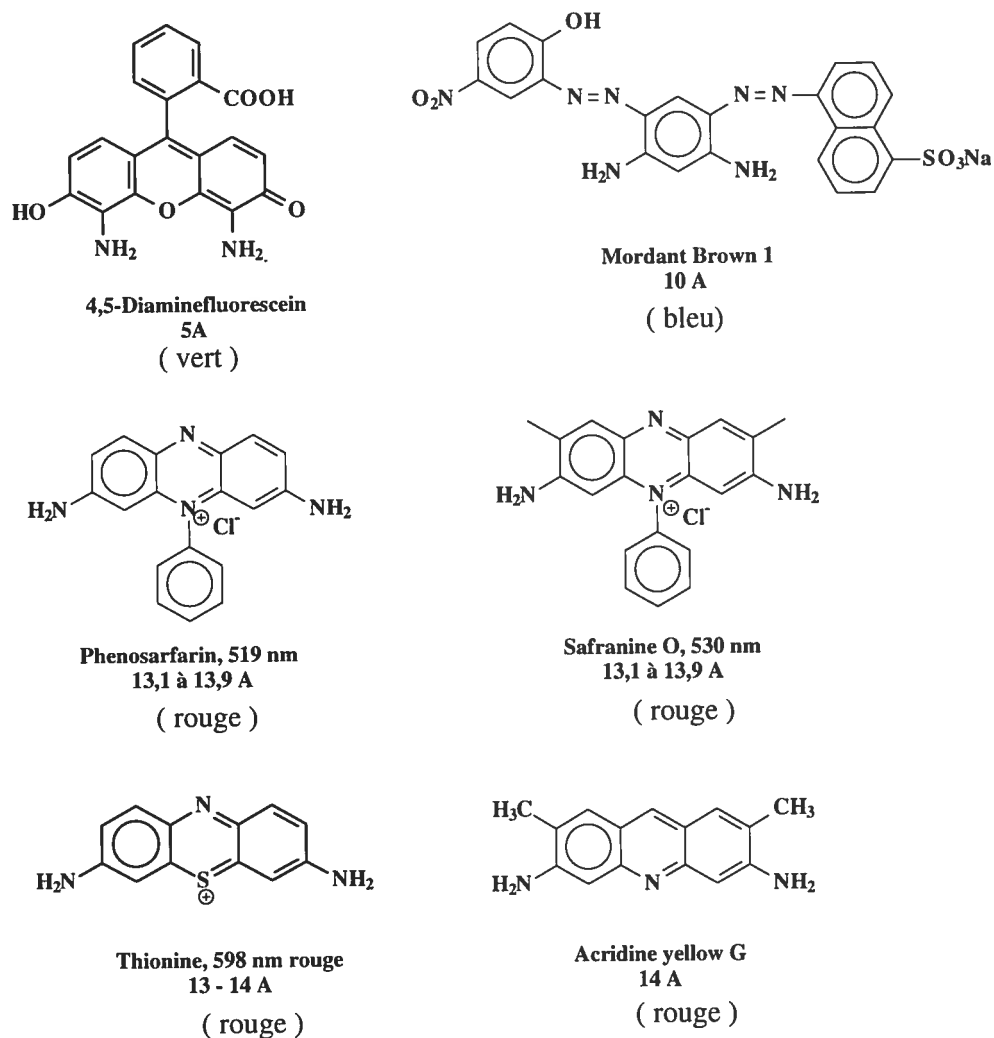


Figure 7.2 Présentation des fluorophores (avant formation de maléimides) connus pour émettre dans le rouge, le vert ou le bleu et possédant des distances variables entre les deux fonctions maléimides (une fois la réaction complétée).

Malheureusement, la voie de synthèse de ces molécules s'est avérée problématique puisque, contrairement aux coumarines ou aux naphthalènes, les structures choisies sont très polaires, se solubilisant et réagissant ainsi difficilement dans l'anhydride acétique (le solvant habituel pour obtenir les maléimides). Une revue de la littérature a permis de constater que ce problème est connu¹⁴⁸ et il est

spécifié qu'un changement de solvant donne également des résultats catastrophiques. De plus, il semble que le fait d'utiliser un co-solvant n'aide pas du tout la réaction. Plusieurs alternatives de synthèses de maléimides (à partir des amines) ont été testées, mais aucune d'entre elles ne s'est avérée efficace (ex: formation du chlorure d'acide à partir de la forme ouverte, utilisation d'agent de couplage sur la forme ouverte...).

De plus, la plupart des structures présentées possèdent un troisième cycle aromatique qui peut faire de la résonance avec le doublet d'électrons de l'amine. Cette propriété diminue grandement la nucléophilie de l'amine et rend donc son attaque beaucoup plus difficile. En effet, l'attaque nucléophile sur le carbonyle de l'anhydride maléique peut fonctionner mais est beaucoup plus lente que ce qui a été observé pour les structures à deux cycles de résonance (coumarines et naphthalènes).

Enfin, même lorsque le doublet de l'azote parvient à faire le lien amide, celui-ci se voit encore moins apte à faire une cyclisation pour former le maléimide puisque sa nucléophilicité se voit encore plus diminuée¹⁴⁸ (voir figure 7.3). Ainsi, une alternative devra être proposée afin de construire une structure fluorogène équivalente.

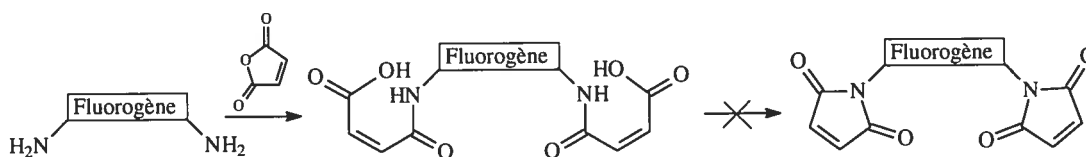


Figure 7.3 Schématisation de l'incapacité à former les maléimides en raison de la faible nucléophilicité du doublet de l'azote des fluorogènes.

7.3. Alternative proposée : ajout d'un espaceur sur la structure des fluorogènes

Bien que la voie de synthèse classique n'ait pas fonctionné, il aurait probablement été possible d'obtenir les structures désirées par d'autres approches

synthétiques. À titre d'exemple, il aurait été envisageable de prendre un ester boronique aromatique (qui serait le cœur fluorescent) et de faire une substitution du bore par un maléimide à l'aide d'acétate de cuivre¹⁴⁹ tel que présenté plus bas à la figure 7.4a. Toutefois, nous avons choisi de mettre ce projet de synthèse en attente et de faire une étude sur le comportement fluorescent de molécules possédant un espaceur entre les cœur fluorescent et le maléimides.

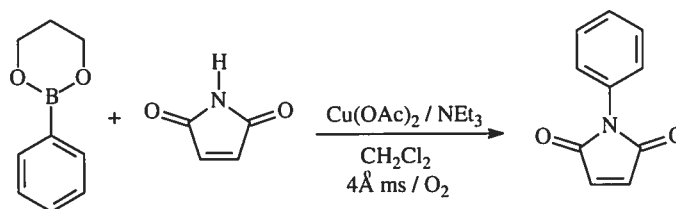


Figure 7.4a) Méthode connu en littérature pour faire un couplage de maléimide.

Cette alternative offre l'avantage d'augmenter de manière significative la nucléophilicité de l'azote, ce qui faciliterait par conséquent la synthèse des maléimides et permettrait, par le fait même, une plus grande mobilité des maléimides, ce qui devrait aider la liaison entre ceux-ci et la protéine dicystéinée étudiée. Ainsi, une molécule modèle a été synthétisée afin d'analyser le comportement fluorescent et d'en déduire si le projet a du potentiel ou non. La structure choisie est celle du piperonylmaléimide **42** (initialement très peu fluorescent). La voie de synthèse est assez simple puisqu'elle implique une amine primaire (très nucléophile comparativement à une amine liée à un cycle aromatique), et n'implique qu'une seule étape (voir figure 7.4b).

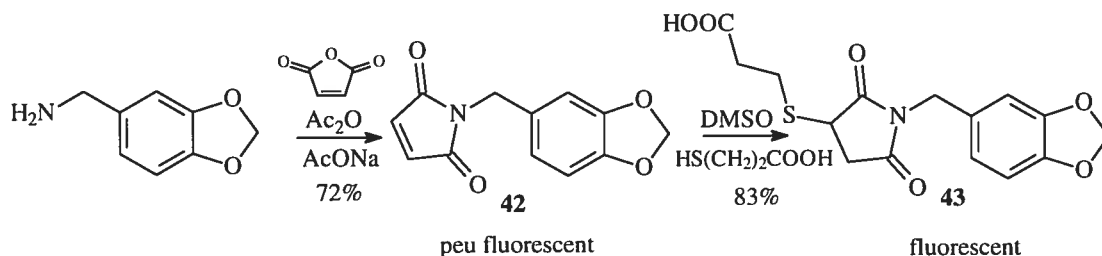


Figure 7.4b) Voie de synthèse de la piperonylmaléimide **42** et réaction avec un thiol.

La piperonylamine a été traitée avec de l'anhydride acétique par la méthode classique et la molécule **42** a été obtenue dans des rendements de l'ordre de 72 %. Ainsi, il a été possible de faire une étude de fluorescence pour vérifier si l'hypothèse de départ est bonne.

7.3.1. Comportement fluorescent du fluorogènes avec espaceur.

Il a été spécifié au chapitre 2 que pour les molécules sans espaceur le doublet d'électrons de l'azote de la fonction maléimide est en compétition, au niveau de la résonance, entre le carbonyle (amide) et le cycle aromatique du cœur fluorescent. Nous avons également dit que plus le doublet se délocalise avec efficacité et sur une grande distance, plus la fluorescence est importante. Ainsi, il va de soi que pour la pipéronylmaléimide **42**, la fluorescence ne peut être causée par la délocalisation du doublet d'électrons de l'azote puisque ce dernier n'est pas conjugué au cycle aromatique. Il ne faut pas oublier que la résonance de ce doublet dans le carbonyle n'engendre qu'une très faible résonance. Ainsi, il est essentiel d'avoir une source de donneurs de doublets d'électrons dans le cycle aromatique pour que la fluorescence puisse avoir lieu (par exemple les doublets d'électrons des oxygènes pour la molécule **42**). Ainsi, le cœur aromatique a toujours un potentiel fluorescent pour ce qui est de la structure piperonyle, mais c'est la présence du maléimide dans **42** ou du succinimide dans **43** qui dicte si la fluorescence peut s'exprimer ou non.

Nous avons donc préparé une solution de pipéronylmaléimide **42** de concentration 10^{-3} M dans le DMSO et pris un spectre de fluorescence. Une très faible fluorescence fut observée, ce qui démontre bien la grande capacité d'atténuation de fluorescence du maléimide. Par la suite, de l'acide 3-mercaptopropionique fut ajouté pour ainsi obtenir le composé **43** et une augmentation significative de fluorescence fut observée (voir figure 7.5).

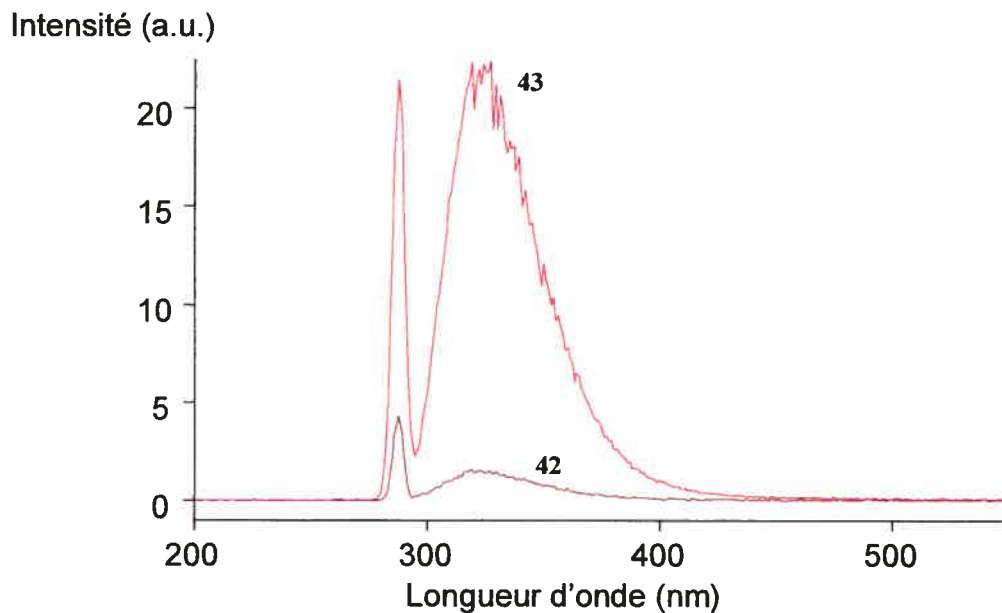


Figure 7.5 Spectres de fluorescence de la piperonylmaléimide **42** et du produit thiolé **43**.

Il est donc possible de conclure que la présence des espaceurs ne nuit pas au comportement fluorescent attendu et que la nucléophilicité beaucoup plus grande de l'amine devrait aider la synthèse. L'ébauche de ce projet, qui sera mis à terme par un des membres du groupe de recherche, constitue une base pour mettre de l'avant la conception d'une série de nouveaux fluorogènes ayant des longueurs d'onde d'émission variables (rouge, verte, bleue).

7.4. Application possible de la technique du FRET

Le FRET est une technique qui fait appel à un transfert d'énergie de fluorescence par la résonance¹⁵⁰. Ce phénomène permet le transfert d'énergie provenant d'un fluorophore donneur à un fluorophore accepteur. Le fluorophore donneur est d'abord excité par la lumière et si l'accepteur est situé à proximité (moins de 100 Å), l'énergie d'émission du donneur peut être transféré à l'accepteur. Ceci permet la réduction de l'émission de fluorescence du donneur et augmente celle de

l'accepteur. Le transfert d'énergie dépend directement de la distance et de l'orientation moyenne retrouvée entre les deux fluorophores. En fusionnant les polypeptides d'intérêts aux protéines fluorescentes (fluorophores), il est possible, si les contraintes structurales le permettent, d'étudier directement la dimérisation des deux protéines (voir figure 7.6). Jusqu'à ce jour, le fluorophore utilisé a toujours été la GFP. En FRET, lorsque l'on excite la GFP donneuse (représentée en rouge à la figure 7.6) en absence d'interaction protéique, celle-ci ne peut transmettre son énergie d'émission à la GFP accepteur (en bleu à la figure 7.6). On note alors une fluorescence bleue d'une longueur d'onde de 460 nm. Par contre, lors d'une interaction protéique positive, il y a transfert d'énergie de la GFP donneuse à la GFP accepteur qui émet à ce moment une fluorescence verte à 530 nm.

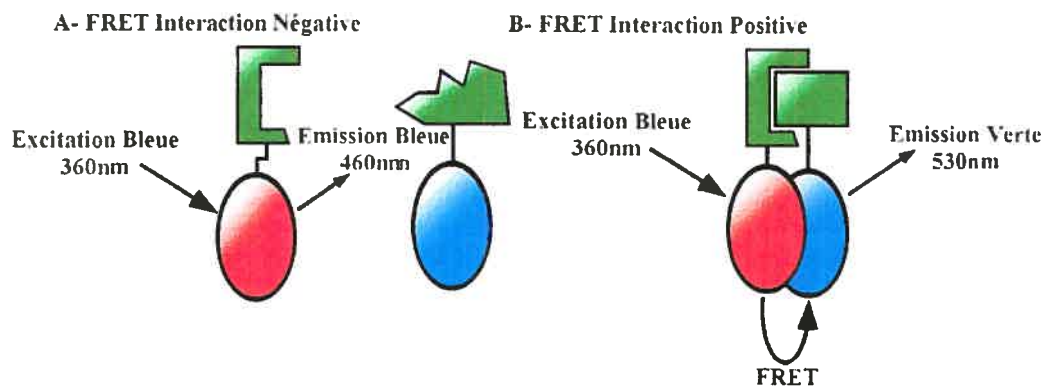


Figure 7.6: Principe du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).

Le pouvoir de localiser l'interaction directement au niveau cellulaire procaryotique ou eucaryotique ainsi que la capacité de mesurer directement l'interaction via la fluorescence sans la présence d'un intermédiaire (tel qu'un substrat) sont les principaux avantages de cette technique. Les contraintes structurales imposées par le système constituent cependant la limite majeure du FRET. En effet, la distance et l'orientation entre les fluorophores donneur et accepteur doivent être favorables au transfert d'énergie. Si les deux protéines interagissent de manière à ce que le donneur soit dans une position défavorisant le transfert de son énergie à l'accepteur, il sera impossible d'étudier cette interaction. C'est pourquoi une absence

de signal dans un système utilisant le FRET ne signifie pas nécessairement que les protéines sont incapables d'interagir entre elles.

Le groupe de recherche du Pr Herman¹⁵¹ a cependant étudié une interaction protéine-protéine entre Bcl-2 et Bax par la méthode utilisant le FRET. Ces protéines sont impliquées au niveau des voies cellulaires apoptotiques. De plus, grâce à ce genre de technique, plusieurs questions fondamentales sur la structure des gènes¹⁵², sur les repliements protéiques^{153,154}, et sur le rôle de la structure tridimensionnelle des protéines lors de la catalyse enzymatique¹⁵⁵ ont pu être résolues en étudiant différentes associations de fragments protéiques.

Ainsi, il faut en déduire que le FRET est un outil de travail très utile, mais présente parfois de faux négatifs puisque la GFP est volumineuse et difficile à positionner de manière optimale. Par le fait même, le remplacement de la GFP par une petite hélice greffée sur chacune des deux protéines d'intérêt pourrait minimiser cette difficulté d'apposition. La fluorescence pourrait alors se transmettre à l'aide de deux fluorophores (liés aux hélices via les thiols). Afin d'appliquer un FRET optimisé, il est primordial de travailler avec un système d'apposition protéique déjà reconnu pour sa grande efficacité. Les deux protéines utilisées seraient TOR-2 et FKBP, puisque celles-ci sont reconnues pour dimériser en présence de l'antibiotique rapamycine⁴⁸.

Chez les levures ou les cellules mammifères, la rapamycine lie tout d'abord la protéine FKBP. Par la suite, le complexe peut lier TOR2 et ainsi inhiber la voie de signalisation de TORC2¹⁵⁶. Cette dernière est responsable de la biogenèse des ribosomes, de l'initiation de la traduction de protéine, de l'absorption des nutriments¹⁵⁷...

La visualisation de cette nouvelle technique de FRET envisagée est illustrée à la figure 7.7.

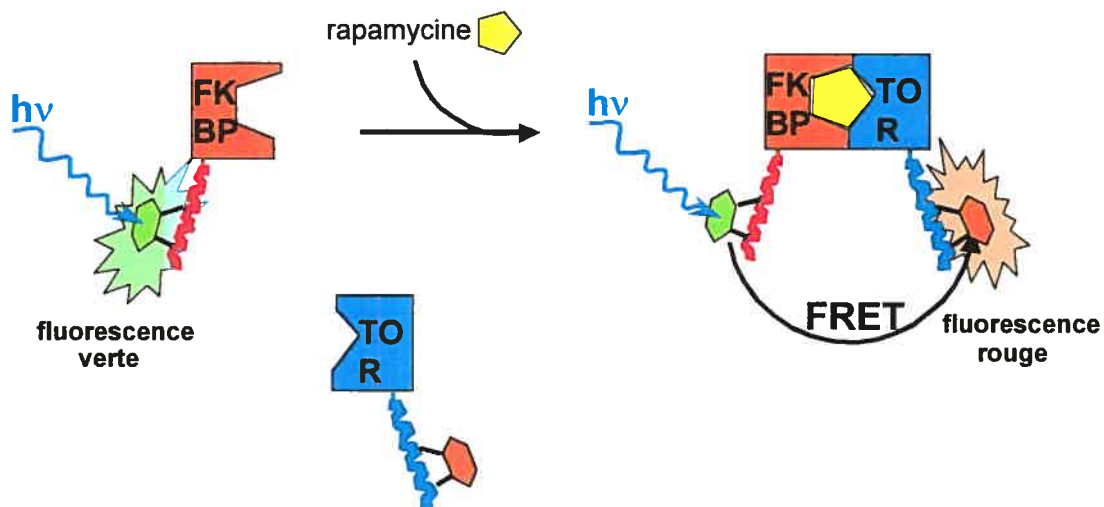


Figure 7.7. Principe du FRET modifié à l'aide d'hélices α et de fluorogènes

Il a été discuté à la section 7.2. de l'utilité de construire des molécules ayant des longueurs d'ondes d'émission dans le rouge. En effet, les fluorogènes dans le rouge pourraient agir comme molécules accepteurs lors du FRET. Nous pourrions ainsi, par exemple, construire un donneur vert avec accepteur rouge (voir figure 7.7.) en autant que la longueur d'onde d'excitation du récepteur corresponde à la longueur d'onde d'émission du donneur. Par le fait même, la couleur de la cellule nous donnerait une information sur une dimérisation protéique.

De plus, même s'il était possible de faire des études de FRET en utilisant deux couleurs distinctes de fluorophores possédant tous deux la même distance entre les maléimides, il serait toutefois préférable d'utiliser deux fluorogènes ayant des distances différentes entre les maléimides. Ceci nous éviterait la complexation possible du même fluorogène sur les deux hélices α liées aux protéines apposées et donc éviter les faux négatifs.

7.5. Mutagenèse dirigée sur une protéine d'intérêt sans greffe d'hélice α

Jusqu'à présent, nos études ont démontré qu'une fois l'optimisation réalisée de notre méthode, il serait possible d'égaliser les meilleures méthodes de marquage protéique connues à ce jour (GFP, FLASH...). Il serait également intéressant d'accomplir un marquage protéique directement via deux cystéines de l'hélice α d'une protéine d'intérêt. L'hélice α d'une protéine dicystéinée liée à la protéine d'intérêt deviendrait alors inutile! Les deux cystéines à la surface de l'hélice α d'une protéine d'intérêt devraient néanmoins être insérées par mutagenèse dirigée. Cette méthode pourrait s'appliquer tant pour le simple marquage protéique que pour la localisation cellulaire, voire même pour le FRET en supposant une structure tridimensionnelle adéquate. Ainsi, la présence de faux négatifs (causé par un mauvais repliement à cause de la chaîne de greffage) serait complètement enrayerée et cet outil deviendrait encore plus efficace.

7.6. Conclusion

Il a été discuté en introduction des différentes méthodes permettant de faire du marquage protéique *in vivo*. Dans tous ces cas, des problèmes majeurs furent signalés. Par exemple, la GFP liée à une protéine d'intérêt peut modifier la structure tridimensionnelle de cette dernière et, par le fait même, perturber son rôle physiologique. De plus, les composés synthétisés par le groupe de recherche du Pr. Tsien sont potentiellement très toxiques en raison de l'utilisation d'atomes d'arsenic dans les tests cellulaires.

Au cours de cette thèse, nous avons élaboré la synthèse de nouveaux fluorogènes et mis au point toutes les étapes à suivre en ce qui a trait à leurs caractérisations chimiques, fluorométriques et biochimiques. Ces mêmes fluorogènes ont démontré une augmentation significative de fluorescence lors de la réaction de leurs maléimides avec des fonctions thiols.

Par la suite, la conception d'une protéine dithiolée de taille adéquate pour un fluorogène a été construite. Après purification de celle-ci, des études de fluorescence *in vitro* ont démontré que la liaison peut se réaliser avec la molécule fluorogène et ainsi permettre de faire un marquage protéique sur un gel SDS-PAGE. Sur ce même gel, il a été possible de voir que la liaison de deux protéines sur un seul fluorogène est impossible puisqu'une trop grande tension stérique serait présente. Une seconde étude *in vitro* fut réalisée, mais cette fois, sur le lysat cellulaire. Les résultats ont démontré que seule la protéine d'intérêt a été intensément marquée, ce qui démontre une excellente sélectivité.

Des études *in vivo* ont également été réalisées et ont permis de démontrer que les fluorogènes sont perméables aux parois cellulaires, qu'ils ne sont pas toxiques et qu'ils peuvent faire fluorescer la cellule par la liaison aux thiols de la protéine exprimée. Même si la localisation cellulaire protéique n'a pu être observée, les études

de localisation réalisées avec la protéine diCysFos liée à la protéine Raf nous ont permis d'analyser la situation et d'élaborer une hypothèse quant à l'obtention d'un test négatif. En effet, il est connu que la protéine diCysFos possède sa propre localisation cellulaire au niveau du noyau. Ainsi, suite à ces résultats, tel que décrit dans la section 7.1. de projets futurs, des modifications peuvent être envisagées comme le remplacement de la protéine greffée diCysFos par une nouvelle protéine hélicoïdale artificielle inconnue de la cellule (et donc sans localisation qui lui serait propre).

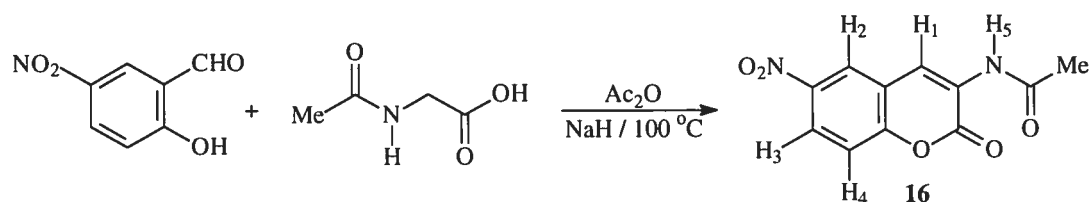
Il serait prétentieux d'affirmer avoir construit un outil biochimique plus puissant que tous les autres connus à ce jour. En effet, il reste énormément de travaux de recherche à réaliser afin de pouvoir faire cette affirmation. Par contre, puisque la protéine greffée a très peu de chance d'altérer la structure tridimensionnelle de la protéine d'intérêt et puisque les fluorogènes synthétisés ne sont pas toxiques pour une cellule (des études de cytotoxicité réalisées au cours de cette thèse à l'appui), nous croyons être en mesure de pouvoir y parvenir un jour!

CHAPITRE 8
Partie expérimentale

8.1. Synthèse organique

- Les points de fusion ont été réalisés à l'aide d'un appareil de type Unimelt Thomas-Hoover ou encore sur un Gallenkamp.
- Les spectres infrarouge proviennent d'un appareil Perkin-Elmer (FTIR).
- Les spectres ^1H RMN et ^{13}C RMN ont été pris sur un Bruker AMX300 (75MHz) ou sur un Bruker AMXR400 (100MHz).
- Les spectres de masse ont été faits par la méthode AutoSpecQ FAB + Magnet, grâce au centre régional de spectrométrie de masse de l'Université de Montréal.
- Tous les spectres de fluorescence proviennent d'un Cary-Eclipse de la compagnie Varian, inc.
-
- La silice proviens de la compagnie Silicycle, chemical division.
- Les solvants proviennent de la compagnie VWR international alors que les composé chimie proviennent de la compagnie Sigma-Aldrich.

3-Acétamido-6-nitro [2H-1-benzopyran-2-one] 16



Le 2-hydroxy-5-nitrobenzaldéhyde (7.11 g, 42.5 mmol) est placé dans un ballon sec de 100 mL. Par la suite, la *N*-acétylglycine (4.98 g, 42.5 mmol) et l'anhydride acétique (40.10 mL) sont ajoutés. Petit à petit, l'hydrure de sodium (NaH 60 % dans l'huile) (1.71 g, 42.5 mmol) est mis dans le ballon. Une solubilisation est alors observée, suivie d'une précipitation importante. Le tout est chauffé à 100°C pendant 20 h. Suite à ce délai, la solution est refroidie et de l'eau (7.11 mL) est ajoutée. Ensuite, de l'acide acétique (43 mL) est ajouté au mélange réactionnel qui est placé à 4°C pendant 4 h. Le précipité est filtré et lavé abondamment avec de l'acide acétique glacial froid. L'acide acétique est coévaporé avec du toluène (250 mL) à trois reprises. Le tout est séché sous pression réduite pour obtenir le produit attendu **16** sous forme d'une poudre beige (6.40 g, 25.8 mmol) dans un rendement de 61 %.

Point de fusion: 277-279 °C.

IR (KBr) (cm⁻¹): 3350 et 3050 (-NH-), 1710 (C=O, ester), 1680 (C=O, amide), 1600 et 1420 (C=C), 1500 et 1335 (-NO₂)

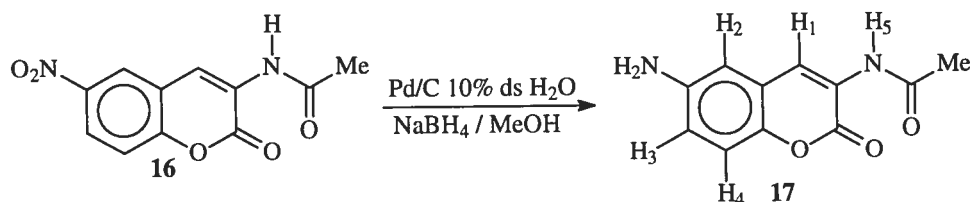
RMN ¹H (DMSO - D₆): δ (ppm) 9.93 (s, 1H, H₅), 8.76 (s, 1H, H₁), 8.73 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H₂), 8.28 (dd, *J* = 2.8 Hz, *J* = 9.1 Hz, 1H, H₃), 7.60 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H₄), 2.19 (s, 3H, acétyl)

RMN ¹³C (DMSO - D₆): δ (ppm) 171.47, 157.69, 145.07, 127.11, 124.96, 124.52, 122.79, 121.52, 118.26, 25.00 (Le carbone manquant est dû à une superposition de pics et non à un problème de concentration qui empêcherait de voir tous les pics.)

Masse exacte attendue: 249.05240 g/mol ; masse trouvée : 249.05339 g/mol

Analyse élémentaire de C₁₁H₈N₂O₅ attendue : C, 53.23 ; H, 3.25 ; N, 11.27
trouvée : C, 53.19 ; H, 3.34 ; N, 11.06

3-Acétamido-6-amino [2H-1-benzopyran-2-one] 17



Le palladium sur charbon (10 % dans l'eau), (0,322 g) est placé dans un ballon d'un litre et un courant d'azote est passé dans celui-ci. Une solution de borohydrure de sodium (1.21 g, 32.9 mmol) dans l'eau (22.6 mL) est ajoutée goutte à goutte. Par la suite, le mélange réactionnel est traité avec une suspension du composé **16** (3.20 g, 12.9 mmol) dans du méthanol (775 mL) sur une période de deux heures, laissée à la température de la pièce pour trente minutes, puis concentrée et séchée. Ensuite, de l'eau est ajoutée (750 mL) et le mélange est refroidi à 4°C pendant 20 h. Le précipité est ensuite filtré et rincé avec de l'eau distillée froide puis séché. Le solide est recristallisé dans l'éthanol pour obtenir un composé jaune **17**, (1.59 g, 7.3 mmol) dans un rendement de 57 %.

Point de fusion: 250 – 252°C

IR (KBr) (cm⁻¹): 3410 et 3310(-NH), 1700 (C=O, ester), 1650 (C=O, amide), 1630 (C=C)

RMN ¹H (DMSO - D₆): δ (ppm) 9.65 (s, 1H, H₅), 8.40 (s, 1H, H₁), 7.10 (dd, J=9.1 H₃, J=2.7 H₃, 1H, H₃), 6.73 (d, J=9.1 H₃, 1H, H₄), 6.68 (d, J=2.7 H₃, 1H, H₂), 5.19 (ds, 2H, NH₂), 2.14 (s, 3H, CH₃);

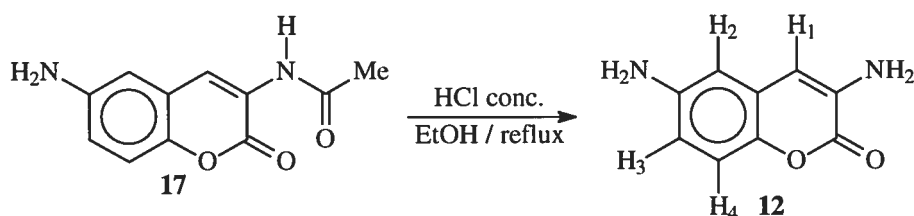
RMN ¹³C (DMSO - D₆): δ (ppm) 171.12, 158.78, 146.92, 142.52, 125.26, 124.98, 120.82, 117.54, 117.15, 110.66, 24.93.

Masse exacte attendue: 219.07770 g/mol; masse trouvée :219,07697 g/mol

Analyse élémentaire de C₁₁H₁₀N₂O₃ attendue: C, 60.55 ; H, 4.62 ; N, 12.84.

trouvée: C, 60.15 ; H, 4.50 ; N, 12.62.

3,6-Diamino [2H-1-benzopyran-2-one] 12



À une solution d'éthanol (6,32 mL) et d'acide chlorhydrique (12 M), (12,63 mL), le composé **17** (0.919 g, 4.2 mmol) est ajouté. Un reflux est fait pendant trente minutes puis la solution est refroidie à 4°C pour la nuit. Le précipité est filtré, puis redissous dans un minimum d'eau distillée. La solution est neutralisée avec de l'hydroxyde d'ammonium 25 %. Par la suite, la température du milieu réactionnel est abaissée à 4°C pendant trois heures. Le précipité est filtré et recristallisé dans l'eau et un composé jaune **12** (0.484 g, 2.7 mmol) est obtenu dans un rendement de 65 %.

Point de fusion: 183 – 186°C

IR (KBr) (cm⁻¹): 3420 et 3340 (NH₂), 1690 (C=O), 1635 (C=C)

RMN ¹ H (DMSO - D₆): δ (ppm) 6.95 (d, *J*=8.5 H₃, 1H, H₄), 6.56 (s, 1H, H₁), 6.49 (d, *J*=2.4 H₃, 1H, H₂), 6.46 (dd, *J*=10.0 H₃, *J*=2.6 H₃, 1H, H₃), 5.48 (ds, 2H, NH₂), 5.00 (ds, 2H, NH₂)

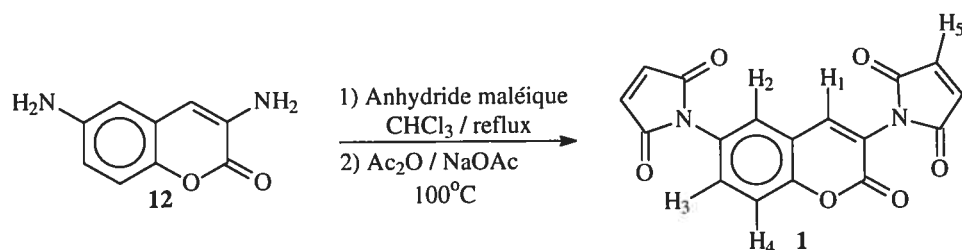
RMN ¹³ C (DMSO - D₆): δ (ppm) 159.95, 146.50, 141.19, 134.13, 123.04, 116.75, 113.70, 109.30, 108.42

Masse exacte attendue: 177.05920 g/mol ; masse trouvée : 177.0579 g/mol

Analyse élémentaire de C₉H₈N₂O₂ attendue : C, 61.36 ; H, 4.58 ; N, 15.90.

Trouvée : C, 61.02 ; H, 4.60 ; N, 15.63.

3,6-Bis [1H-pyrrole-2,5-dione] 2H-1-benzopyran-2-one 1



À une suspension du composé **12** (0.200 g, 1.14 mmol) dans du chloroforme anhydre (11,5 mL), l'anhydride maléique (0.335 g, 3.42 mmol) est ajouté. Un reflux est ensuite effectué pendant 20h. Le tout est refroidi puis le précipité est filtré en rinçant avec beaucoup de chloroforme. Après avoir bien séché, de l'anhydride acétique (9 mL) et de l'acétate de sodium (35 mg, 0.427 mmol) sont ajoutés. Le tout est chauffé à 90 – 100 °C pendant 1.5h. Le ballon est ensuite refroidi, de l'eau distillée froide (30 mL) est ajoutée, puis une agitation vigoureuse est réalisée pendant quelques minutes. Le précipité est filtré en rinçant avec de l'eau pour obtenir le produit final beige **1** dans un rendement de 20 % (76 mg, 0.226 mmol).

Point de fusion , 296°C (dégradation)

IR (KBr) (cm^{-1}): 3500 à 3300 (NH amide), 1700 (C=O, ester et lactone), 1620 (C=C)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ (ppm) 7.78 (s, 1H, H_1), 7.66 (dd, $J=9.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, 1H, H_3), 7.63 (d, $J=2.5$ Hz, 1H, H_2), 7.50 (d, $J=8.7$ Hz, 1H, H_4), 6.93 (s, 2H, H_5), 6.91 (s, 2H, H_5)

RMN ^{13}C (DMSO-D_6) : δ (ppm) 169.99, 169.06, 156.80, 151.50, 143.62, 135.82, 134.89, 131.61, 128.63, 127.11, 118.60, 118.13, 117.58.

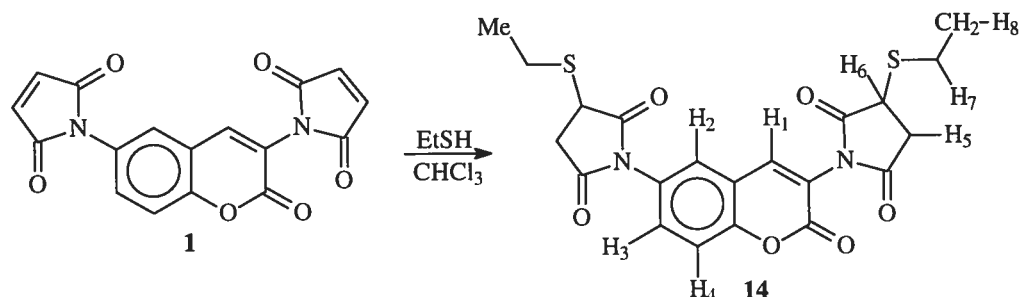
Masse exacte attendue : 337,04630 g/mol ; masse trouvée : 337,04605 g/mol

Analyse élémentaire de $\text{C}_{17}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_6$ attendue: C, 60.72 ; H, 2.40 ; N, 8.33.

trouvée: C, 59.24 ; H, 2.36 ; N, 7.92

3,6-Bis[1H-pyrrolidine-2,5-dione-3-thioéthyl]2H-1-benzopyran-2-one

14



À une suspension du composé **1** (40 mg, 0.12 mmol) dans le chloroforme anhydre (3 mL), sont ajoutés de l'éthanethiol (27 μ L, 0.36 mmol). Le tout est laissé à la température de la pièce pour douze heures, puis concentré sous pression réduite et purifié sur gel de silice en utilisant l'acétate d'éthyle et l'hexane comme solvants d'éluion (rapport de 3 : 7). Un solide jaune **14** est ainsi obtenu dans un rendement de 85 % (47 mg, 0.10 mmol).

Point de fusion: 128-131°C

IR (KBr) (cm^{-1}): 3500 - 3000 (amide), 1700 (C-O lactone), 1620 (C=C aromatique), 600 (C-S)

RMN ^1H (CDCl_3) : δ (ppm) 7.46 (m, 2H, H₁ et H₃), 7.42 (d, $J=11.0$ Hz, 1H, H₄) 7.39 (s, 1H, H₂), 3.90 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, H₅), 3.88 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, H₅), 3.35 (q, $J=9.7$ Hz, 2H, H₆), 2.94 (m, 2H, H₇), 2.80 (m, 2H, H₇), 2.69 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, H₅), 2.64 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, H₅), 1.29 (t, $J=8.0$ Hz, 6H, H₈)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ (ppm) 175.20, 173.42, 167.90, 155.98, 151.07, 136.55, 130.14, 128.85, 128.25, 125.39, 118.72, 117.35, 38.72, 35.96, 26.04, 20.40, 14.03 (Les carbones manquants sont dus à une superposition de pics et non à un problème de concentration qui empêcherait de voir tous les pics. En effet, une pseudosymétrie des succinimides thiolés occasionne ce profil.)

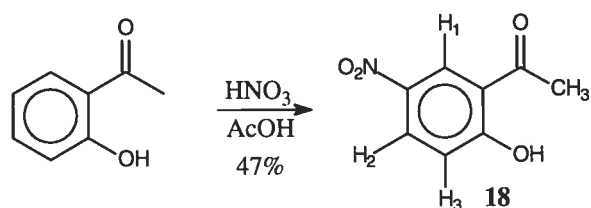
Masse exacte attendue : 461,08510 g/mol ; masse trouvée : 461,08411 g/mol

Analyse élémentaire de $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$

attendue: C, 54.77 ; H, 4.38 ; N, 6.08 ; S, 13.92

trouvée: C, 54.49 ; H, 4.35 ; N, 5.99 ; S, 13.50

2-hydroxy-5-nitroacétophénone 18



À une solution d'acide acétique (10 mL) et d'acide nitrique (2.5 mL) à $\sim 10^\circ\text{C}$, le 2'-hydroxyacétophénone (2.41 mL, 20 mmol) est ajouté. Le tout est laissé à la température de la pièce pour la nuit puis, de l'eau (10 mL) est ajoutée. Suite à une filtration, le produit attendu **18** (9.4 mmol) est obtenu dans un rendement de 47%.

Point de fusion: 97°C .

IR (KBr) (cm^{-1}): 3300 - 2900 (alcool), 3091 (C-H), 1692 (cétone), 1526 et 640 (NO_2).

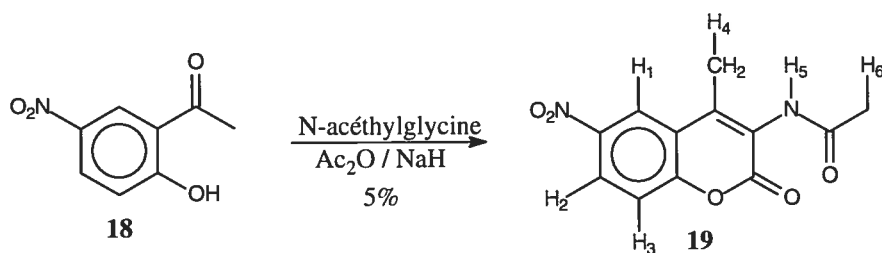
RMN ^1H (CDCl_3): δ (ppm) 8.69 (d, $J = 2.71$ Hz, 1H, H_1), 8.32 (dd, $J = 8.94$ Hz, $J = 2.53$ Hz, 1H, H_2), 7.07 (d, $J = 9.23$ Hz, 1H, H_3), 2.84 (s, 1H, OH), 2.74 (s, 3H, CH_3)

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ (ppm) 200.03, 164.09, 138.80, 129.27, 126.28, 121.60, 118.13, 28.88

Masse exacte attendue pour $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_4$: 181.037507 g/mol

masse trouvée : 181.037491 g/mol

3-Acétamido-4-méthyl-6-nitro[2H-1-benzopyran-2-one] 19



Il s'agit des mêmes conditions réactionnelles qui ont été utilisées pour la synthèse du composé **16**. La seule différence est que la réaction a été réalisée avec du 5-nitro-2-hydroxyacétophénone **18** (180 mg, 0.92 mmol). Les conditions quant à la purification sont également les mêmes et le produit **19** a été obtenu dans un rendement de 5 % (12 mg, 0.046 mmol).

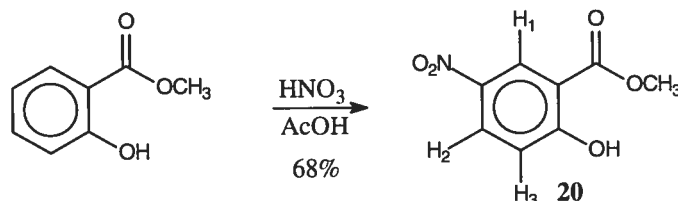
IR (KBr) (cm^{-1}): 3340 et 3027 (-NH-), 1743 (C=O, lactone), 1680 (C=O, amide), 1603 (C=C), 1332 (NO_2)

RMN ^1H (DMSO- D_6): δ (ppm) 9.90 (s, 1H, H_5), 8.71 (d, $J = 2.52$ Hz, 1H, H_1), 8.31 (dd, $J = 9.11$ Hz, $J = 2.64$ Hz, 1H, H_2), 7.63 (d, $J = 9.12$ Hz, 1H, H_3), 2.16 (s, 3H, H_6), 1.82 (s, 3H, H_4)

Masse exacte attendue pour $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_6$: 278.053886 g/mol

masse trouvée : 278.053621 g/mol

5-nitro-méthylsalicylate 20



Les conditions réactionnelles exploitées ici sont les mêmes que pour la synthèse du composé **18**. La seule différence est que la réaction a été réalisée avec du méthylsalicylate (2.59 mL, 20 mmol). Suite à une filtration, le produit **20** est obtenu, mais un sous-produit avec un groupement nitro en position 3 est également observé dans un ratio de 2 : 1 (déterminé par RMN) en faveur du nitro en para. Le rendement global de cette réaction est de 68 % (pour les deux produits) (2.68 g, 13.6 mmol).

Le produit de réaction **20** a été utilisé pour la prochaine étape sans purification.

Caractérisation du mélange (produit majoritaire) :

IR (KBr) (cm^{-1}): 3100 - 2800 (alcool), 3095 (C-H), 1679 (ester), 1520 et 599 (NO_2).

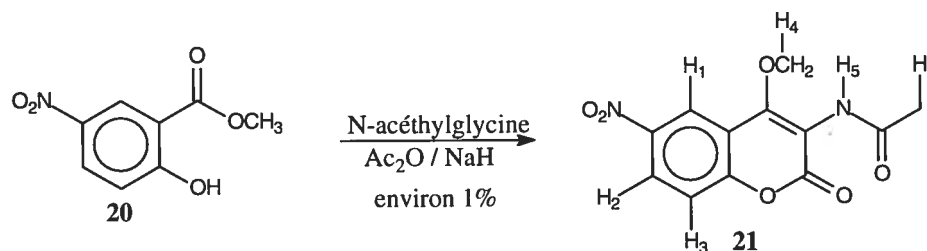
RMN ^1H (DMSO- D_6) : δ (ppm) 8.51 (d, $J = 2.94$ Hz, 1H, H_1), 8.31 (dd, $J = 9.18$ Hz, $J = 2.97$ Hz, 1H, H_2), 7.16 (d, $J = 9.18$ Hz, 1H, H_3), 3.91 (s, 3H, ester), 3.66 (s, 1H, OH)

RMN ^{13}C (DMSO- D_6): 165.74, 163.61, 138.70, 129.18, 126.23, 118.68, 118.07, 52.62

Spectre de masse pour $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_5$: 197.0324 g/mol

masse trouvée : 197.0363 g/mol

3-Acétamido-4-méthyl-6-nitro[2H-1-benzopyran-2-one] 21



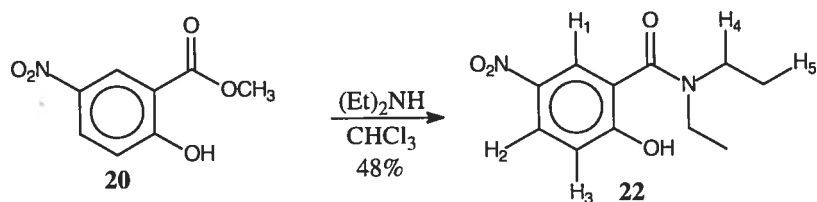
Les conditions réactionnelles utilisées sont les mêmes que pour la synthèse du composé **16** à l'exception que cette réaction a été effectuée avec comme réactif de départ le 5-nitro-méthylsalicylate (544 mg, 2.76 mmol). Suite à une purification (mêmes conditions que pour le composé **16**), des traces du produit **21** attendu ont été obtenues.

IR (KBr) (cm^{-1}): 3340 et 3021 (-NH-), 1760 (C=O, lactone), 1672 (C=O, amide), 1600 (C=C), 1350 (NO_2), 1260 (ether)

RMN ^1H (DMSO- D_6): δ (ppm) 9.92 (s, 1H, H₅), 8.73 (d, $J = 2.47$ Hz, 1H, H₁), 8.27 (dd, $J = 9.08$ Hz, $J = 2.63$ Hz, 1H, H₂), 7.58 (d, $J = 9.06$ Hz, 1H, H₃), 3.48 (s, 3H, H₄), 2.16 (s, 3H, H₆)

Masse exacte attendue pour $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_6$: 278.053886 g/mol
 masse trouvée : 278.053926 g/mol

N,N-diéthylamido-5-nitrophénol 22



À une solution de 3-méthyl-5-nitro-méthylsalicylate (916 mg, 4.65 mmol) dans le chloroforme anhydre (5 mL), la diéthylamine (2.1 mL, 20 mmol) est ajoutée. Le tout est chauffé à 40°C pour quatre jours. Suite à ce délai, le tout est concentré, puis purifié sur gel de silice en utilisant l'acétate d'éthyle et l'hexane comme solvants d'élution (rapport 1: 1) pour obtenir le produit désiré dans un rendement de 48 % (532 mg, 2.23 mmol).

IR (KBr) (cm^{-1}): 3200 - 2900 (alcool), 3087 (C-H), 1648 (amide), 1523 et 607 (NO_2).

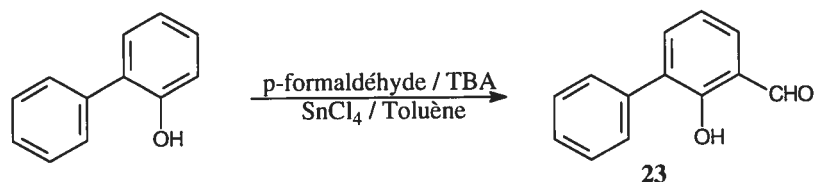
RMN ^1H (CD_3OD): δ (ppm) 8.66 (d, $J = 2.43\text{Hz}$, 1H, H_1), 8.33 (dd, $J = 9.12\text{ Hz}$, $J = 2.47\text{ Hz}$, 1H, H_2), 7.15 (d, $J = 9.17\text{ Hz}$, 1H, H_3), 3.28 (q, $J = 7.24\text{ Hz}$, 4H, H_4), 1.27 (t, $J = 7.23\text{ Hz}$, 6H, H_5)

RMN ^{13}C (CD_3OD): δ (ppm) 169.42, 163.91, 139.24, 129.07, 127.82, 123.63, 116.41, 40.32, 13.71

Masse exacte attendue pour $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$: 238.095357 g/mol

masse trouvée : 238.095296 g/mol

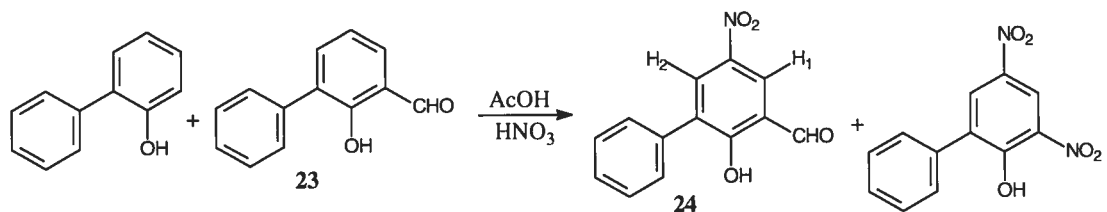
2-hydroxy-3-phenylbenzaldehyde 23



Le 2-phénylphénol (10 g, 58.8 mmol) est placé dans un ballon sec de 50 mL, traité avec le toluène (12 mL), le tétrachlorure d'étain (683 μ L, 5.88 mmol) et le tri-*n*-butylamine (5.6 mL, 23.5 mmol), agiter à la température de la pièce pour 20 minutes et traité avec le p-formaldéhyde. La solution est chauffée à 100°C pour huit heures. Suite à ce délai, la solution est refroidi et de l'eau est ajoutée (20 mL). Le pH a été, par la suite, baissé à 2 avec du HCl 2 N. Une extraction est faite avec de l'éther. La phase étheré à été séchée avec du MgSO₄, filtré et évaporé. Le tout est mis sous vide pour obtenir le produit attendu **23**.

Le produit de réaction est très propre, mais contient un mélange de produits de départ et de **23** dans un ratio de 1 : 3 respectivement (déterminé par RMN). Par souci de commodité, le tout a été remis en réaction pour l'étape suivante.

2-hydroxy-5-nitro-3-phénylbenzaldéhyde 24



Un mélange du produit **23** et du 2-phénylphénol dans des proportions de 3 : 1 (déterminé par RMN) (10 g) est placé dans un ballon de 250 mL. Par la suite, l'acide acétique (12 mL) est ajoutée. Le HNO₃ conc. (900 µL) est ensuite ajouté goutte à goutte au mélange réactionnelle qui est agiter à la température de la pièce pour la nuit. Le précipité est ensuite filtré (précipité 1). De l'eau est ajoutée à la solution (50 mL) et le nouveau précipité formé (précipité 2) est filtré. Le premier précipité comporte un mélange du composé **24** et du 2,4-dinitro-6-phénylphénol dans un ratio de 1 : 1 tandis que le ratio est de 9 : 1 dans le deuxième précipité. Ainsi, par souci de commodité, le tout a été remis en réaction pour l'étape suivante.

Analyse du composé **24** à partir des données spectrales du mélange :

IR (KBr) (cm⁻¹): 3365 (OH), 3087 (phényl), 2860 et 1805 (CHO), 1656 (C=O), 1589 (C=C), 1529 et 1342 (NO₂)

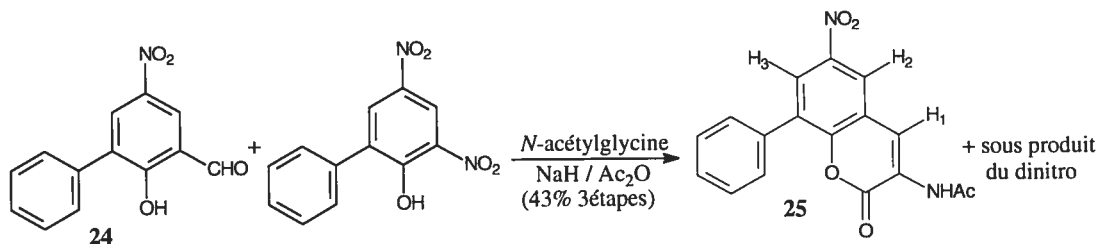
RMN¹H (CDCl₃): δ (ppm) 10.06 (s, 1H, CHO), 8.56 (d, *J* = 2.78 Hz, 1H, H₂), 8.51 (d, *J* = 2.80 Hz, 1H, H₁), 7.70 à 7.43 (m, 5H, Ph), 1.78 (s, 1H, OH)

RMN ¹³C (DMSO-D₆): δ (ppm) 195.27, 161.92, 139.53, 134.03, 130.86, 130.28, 128.83, 128.74, 128.03, 127.94, 127.42, 120.79

Masse exacte attendue pour C₁₃H₉NO₄ : 243.053607 g/mol

masse trouvée : 243.053157 g/mol

3-Acétamido-6-nitro-8-phényl [2H-1-benzopyran-2-one] 25



Les conditions réactionnelles utilisées sont les mêmes que pour la synthèse du composé **16** à l'exception que cette réaction a été effectuée avec comme réactifs de départ le 2-hydroxy-5-nitro-3-phénylbenzaldéhyde **24** et le 2,4-dinitro-6-phénylphénol (10 g dans un ratio 9:1)(déterminé par RMN). La purification a été réalisée dans les mêmes conditions que pour le composé **16**, ce qui a permis d'obtenir le produit blanc **25** dans un rendement global pour les trois étapes de 43 %.

Point de fusion: plus de 230°C

IR (KBr) (cm⁻¹): 3368 (NH), 2924 (phényl), 1716 (C=O ester), 1683 (C=O amide), 1603 (C=C), 1538 et 1342 (NO₂)

RMN¹H (DMSO-D₆): δ (ppm) 9.96 (s, 1H, NH), 8.78 (s, 1H, H₁), 8.70 (d, *J* = 2.68 Hz, 1H, H₃), 8.19 (d, *J* = 2.72 Hz, 1H, H₂), 7.70 à 7.46 (m, 5H, Ph), 2.18 (s, 3H, CH₃)

RMN ¹³C (DMSO-D₆): δ (ppm) 171.54, 157.46, 150.97, 144.82, 134.93, 130.74, 130.49, 129.77, 129.65, 127.09, 124.94, 123.44, 123.11, 122.22, 24.99

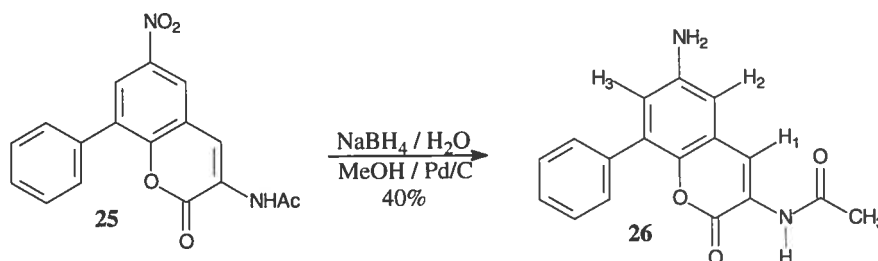
Masse exacte attendue : 324.074621 g/mol

masse trouvée : 324.074637 g/mol

Analyse élémentaire de C₁₇H₁₂N₂O₅ attendue : C, 62.96 ; H, 3.73 ; N, 8.64

trouvé : C, 61.28 ; H, 3.43 ; N, 8.72

3-Acétamido-6-amino-8-phényl [2H-1-benzopyran-2-one] 26



Il s'agit des mêmes conditions réactionnelles qui ont été utilisées pour la synthèse du composé **17**. La seule différence est que la réaction a été réalisée avec du 3-acétamido-6-nitro-8-phényl [2H-1-benzopyran-2-one] **25** (3 g, 9.25 mmol). La purification a été effectuée avec les mêmes conditions que pour le composé **17**, ce qui a permis d'obtenir le produit **26** sous forme d'un solide couleur jaune moutarde dans un rendement de 40 % (1.09 g, 3.7 mmol).

Point de fusion: plus de 230°C

IR (KBr) (cm^{-1}): 3429 et 3316 (NH_2 et NH), 2923 et 2853 (phényl), 1701 (C=O lactone), 1661 (C=O amide), 1630 (C=C)

RMN¹H (DMSO- D_6): δ (ppm) 9.67 (s, 1H, NH), 8.46 (s, 1H, H₁), 7.53 à 7.41 (m, 5H, Ph), 6.76 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H₃), 6.65 (d, $J = 2.3$ Hz 1H, H₂), 5.26 (s, 2H, NH_2), 2.14 (s, 3H, CH_3)

RMN ¹³C (DMSO- D_6): δ (ppm) 171.23, 158.57, 146.79, 137.25, 130.29, 130.20, 130.17, 129.38, 128.72, 125.40, 121.57, 118.35, 110.50, 24.97. (Le carbone manquant est dû à une superposition de pics et non à un problème de concentration qui empêcherait de voir tous les pics.)

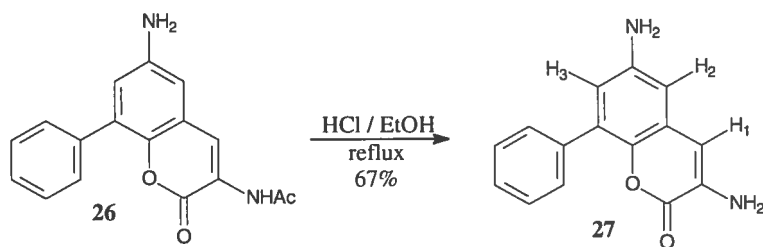
Masse exacte attendue : 294.100442 g/mol

masse trouvée : 294.099784 g/mol

Analyse élémentaire de $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ attendue : C, 69.38 ; H, 4.79 ; N, 9.52

trouvé : C, 72.45 ; H, 5.39 ; N, 9.00

3,6-diamino-8-phényl [2H-1-benzopyran-2-one] 27



Les conditions réactionnelles exploitées ici sont les mêmes que pour la synthèse du composé **12**. La seule différence est que la réaction a été réalisée avec du 3-acétamido-6-amino-8-phényl [2H-1-benzopyran-2-one] **26** (1.24 g, 4.2 mmol). La purification a été réalisée de la même manière que pour le composé **12** pour obtenir finalement le produit jaune **27** dans un rendement de 67 % (710 mg, 2.81 mmol).

Point de fusion: 185 - 188°C (dégradation)

IR (KBr) (cm⁻¹): 3446, 3370 (NH₂), 2954 - 2853 (phényl), 1698 (C=O lactone), 1644 (C=C)

RMN¹H (DMSO-D₆): δ (ppm) 7.51 à 7.37 (m, 5H, Ph), 6.58 (s, 1H, H₁), 6.51 (d, *J* = 2.61 Hz, 1H, H₃), 6.48 (d, *J* = 2.44 Hz, 1H, H₂), 5.53 (s, 2H, NH₂), 5.07 (s, 2H, NH₂)

RMN ¹³C (DMSO-D₆): δ (ppm) 158.19, 144.81, 136.38, 132.64, 128.66, 128.31, 127.77, 126.94, 122.24, 113.24, 108.03, 106.68. (Le carbone manquant est dû à une superposition de pics et non à un problème de concentration qui empêcherait de voir tous les pics.)

Masse exacte attendue : 252.089877 g/mol

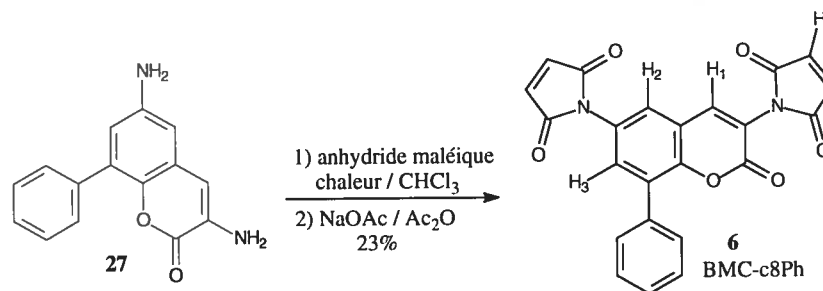
masse trouvée : 252.089743 g/mol

Analyse élémentaire de C₁₅H₁₂N₂O₂ attendue : C, 71.42 ; H, 4.79 ; N, 11.10

trouvé : C, 73.94 ; H, 7.52 ; N, 7.64

(traces de solvant)

8-phényl-3,6-Bis [1H-pyrrole-2,5-dione] 2H-1-benzopyran-2-one 6



Les conditions réactionnelles exploitées ici sont les mêmes que pour la synthèse du composé **1**. La seule différence est que la réaction a été réalisée avec du 3,6-diamino-8-phényl [2H-1-benzopyran-2-one] **27** (130 mg, 0.52 mmol). La purification a été réalisée de la même manière que pour le composé **1** pour obtenir finalement le produit jaune **6** dans un rendement de 23 % (50 mg, 0.12 mmol).

Point de fusion: plus de 230°C

IR (KBr) (cm⁻¹): 3500, 3300 (NH amide), 1700 (C=O lactone), 1620 (C=C)

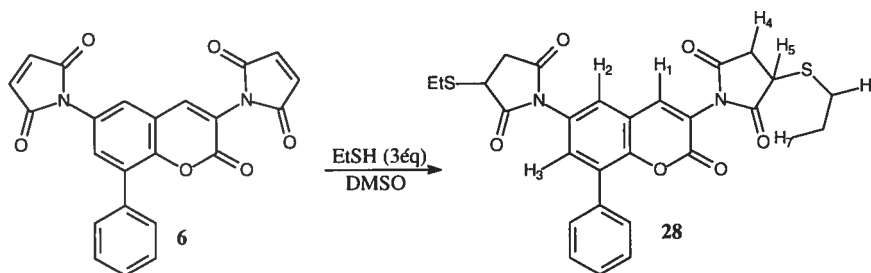
RMN¹H (DMSO-D₆): δ (ppm) 8.06 (d, *J* = 2.46 Hz, 1H, H₃), 7.83 (d, *J* = 2.43 Hz, 1H, H₂), 7.73 (s, 1H, H₁), 7.50 à 7.32 (m, 5H, Ph), 6.93 (s, 2H, H₄), 6.91 (s, 2H, H₅)

RMN ¹³C (DMSO-D₆): δ (ppm) 169.87, 169.08, 156.92, 151.43, 143.58, 136.62, 135.74, 134.32, 131.29, 129.61, 129.06, 127.99, 127.42, 127.28, 127.08, 118.36, 117.98, 117.31 (Le carbone manquant est dû à une superposition de pics et non à un problème de concentration qui empêcherait de voir tous les pics.)

Masse exacte attendue pour C₂₃H₁₂N₂O₆ : 412.069536 g/mol

masse trouvée : 412.069421 g/mol

8-Phenyl-3,6-bis [1H-pyrrolidine-2,5-dione-3-thioéthyl]
2H-1-benzopyran-2-one 28



À une solution de composé **6** (50 mg, 0.12 mmol) dans du DMSO anhydre (3 mL), 27 μ L d'éthanethiol (0.36 mmol) sont ajoutés. Le tout est agité à la température de la pièce pour trois heures. Un volume de 100 mL d'eau est ajouté et plusieurs extractions (4x) avec du dichlorométhane sont effectuées. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$ et concentrées sous pression réduite. Malgré la présence de traces de DMSO (ce qui empêche de fournir le point de fusion et l'analyse élémentaire), le rendement de réaction est évalué à 88 % (54 mg, 0.1 mmol).

IR (KBr) (cm^{-1}): 3500, 3300 (NH amide), 1700 (C=O lactone), 1621 (C=C aromatique), 620 (C-S)

RMN¹H (DMSO-D₆): δ (ppm) 8.03 (d, $J = 2.62$ Hz, 1H, H₃), 7.79 (d, $J = 2.60$ Hz, 1H, H₂), 7.68 (s, 1H, H₁), 7.53 à 7.30 (m, 5H, Ph), 3.32 (q, $J = 9.61$ Hz, 2H, H₅), 2.91 (m, 2H, H₆), 2.83 (m, 2H, H₆), 2.64 (d, $J = 5.61$ Hz, 2H, H₄), 2.61 (d, $J = 5.58$ Hz, 2H, H₄), 1.27 (t, $J = 7.80$ Hz, 6H, H₇)

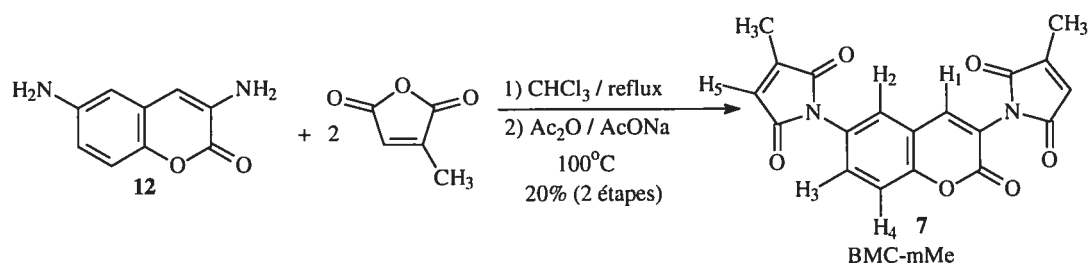
RMN ¹³C (DMSO-D₆): δ (ppm) 175.83, 173.81, 168.26, 156.31, 151.12, 136.62, 136.28, 130.14, 130.02, 128.81, 128.26, 127.66, 125.43, 118.16, 117.69, 38.72, 35.81, 26.21, 26.00, 14.07 (Le carbone manquant est dû à une superposition de pics et non à un problème de concentration qui empêcherait de voir tous les pics.)

Masse exacte attendue pour C₂₇H₂₄N₂O₆S₂ : 536.107580 g/mol

masse trouvée : 536.107319 g/mol

3,6-Bis [3-méthyl-1H-pyrrole-2,5-dione] 2H-1-benzopyran-2-one

7



Les mêmes conditions réactionnelles ont été utilisées pour la synthèse du composé **1**. La seule différence est que la réaction a été effectuée en utilisant de l'anhydride citraconique (410 µL, 4.56 mmol). Quant à la purification, elle a été réalisée dans les mêmes conditions que pour le composé **1**, ce qui mena à l'obtention du produit **7** dans un rendement de 20 % (147 mg, 0.3 mmol).

Point de fusion: plus de 230°C

IR (KBr) (cm⁻¹): 3500 et 3300 (amide), 1720 (C=O lactone), 1654 (C=C aromatique)

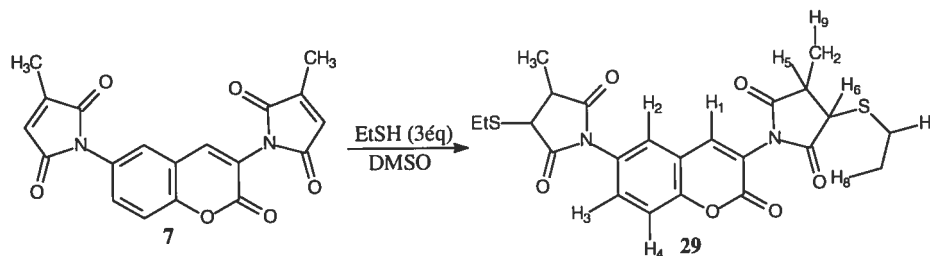
RMN ¹H (CDCl₃): δ (ppm) 8.52 (s, 1H, H₁), 7.88 (d, *J* = 2.29 Hz, 1H, H₂), 7.63 (s, 1H, H₅), 7.52 (dd, *J* = 9.26 Hz, *J* = 2.29 Hz, 1H, H₃), 7.45 (s, 1H, H₅), 7.34 (d, *J* = 8.83 Hz, 1H, H₄), 2.07 (d, *J* = 6.92 Hz, 3H, CH₃), 1.91 (d, *J* = 7.02 Hz, 3H, CH₃)

RMN ¹³C (DMSO-D₆): δ (ppm) 170.00, 169.02, 158.90, 146.22, 137.32, 126.04, 122.06, 120.43, 118.24, 117.16, 24.80 (Le carbone manquant est dû à une superposition de pics et non à un problème de concentration qui empêcherait de voir tous les pics.)

Masse exacte attendue pour C₁₉H₁₂N₂O₆ : 364.069536 g/mol

masse trouvée : 364.069312 g/mol

3,6-Bis[3-méthyl-1H-pyrrolidine-2,5-dione-3-thioéthyl]2H-1-benzopyran-2-one 29



Il s'agit des mêmes conditions réactionnelles utilisées pour la synthèse du composé **28**. La seule différence est que la réaction a été réalisée avec du 8-phényl-3,6-bis[1H-pyrrole-2,4-dione]2H-1-benzopyran-2-one **6** (44 mg, 0.12 mmol). Les conditions de purification sont également les mêmes et le produit **29** a donc été obtenu dans un rendement évalué à 84 % (49 mg, 0,1 mmol).

IR (KBr) (cm^{-1}) : 3500 - 3300 (amide), 1720 (C=O lactone), 1620 (C=C aromatique), 600 (C-S)

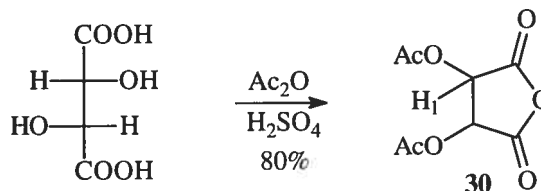
RMN ^1H (CDCl_3) : δ (ppm) 8.21 (s, 1H, H₁), 7.57 (d, $J = 2.53$ Hz, 1H, H₂), 7.39 (dd, $J = 8.47$ Hz, $J = 2.67$ Hz, 1H, H₃), 7.26 (d, $J = 8.33$ Hz, 1H, H₄), 3.84 (s, 1H, H₆), 3.76 (s, 1H, H₆), 3.12 (s, 1H, H₅), 3.07 (s, 1H, H₅), 2.83 (m, 4H, H₇), 1.93 (d, $J = 7.08$ Hz, 3H, H₉), 1.90 (d, $J = 7.25$ Hz, 3H, H₉), 1.30 (t, $J = 7.28$ Hz, 6H, H₈)

RMN ^{13}C (DMSO-D_6) : δ (ppm) 175.04, 172.32, 167.92, 156.34, 150.73, 137.21, 129.87, 128.65, 124.34, 118.03, 117.04, 38.53, 34.29, 26.02, 20.68, 14.27, 11.67 (Le carbone manquant est dû à une superposition de pics et non à un problème de concentration qui empêcherait de voir tous les pics.)

Masse exacte attendue pour $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$: 488.107580 g/mol

masse trouvée : 488.107213 g/mol

Anhydride diacétyltartrique 30



À une suspension d'acide tartrique (17.17 g, 0.114 mol) dans l'anhydride acétique (37 mL), de l'acide sulfurique (1 mL) est ajouté goutte à goutte. Lorsque la dissolution est complétée, le tout est mis à reflux pour 20 minutes. Suite à ce délai, la solution est refroidie à 4°C pendant une heure et le précipité est filtré et lavé avec de l'éther froid pour obtenir le produit attendu **30** dans un rendement de 80 % (19.71 g, 91.2 mmol). Il est à noter que la présence d'acide a causé une épimérisation du produit **30** (déterminé par RMN). Ainsi, le point de fusion peut être erroné.

Point de fusion du mélange: 131-133°C

IR (KBr) (cm^{-1}): 2939 (C-H), 1900 à 1700 (ester et lactone)

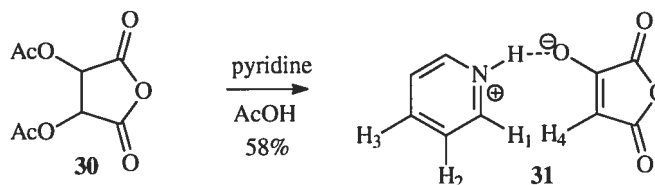
RMN¹H (DMSO-D₆) du produit majoritaire: δ (ppm) 6.23 (d, $J = 0.8$ Hz, 2H, H₁), 2.14 (s, 6H, Ac)

RMN ¹³C (DMSO-D₆) du produit majoritaire: δ (ppm) 169.09, 164.60, 71.19, 19.49

Masse attendue: 216.027002

Masse trouvée: 216.026987

Anhydride hydroxymaléique (sel de pyridinium) 31



L'anhydride diacétyltartarique **30** (4.34 g, 20.05 mmol) est placé dans un ballon sec de 25 mL. De l'acétone est ensuite ajouté (7 mL) et la suspension est alors chauffée légèrement, jusqu'à dissolution complète. La solution est refroidie à 10°C et la pyridine (3 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le tout est laissé à 10°C pour 3 heures. Suite à ce délai, l'acide acétique (2.34 mL) est ajouté et le tout est agité vigoureusement. La solution est alors placée au réfrigérateur pour la nuit et le précipité est ensuite filtré et lavé avec de l'éther éthylique froid pour donner le composé attendu **31** dans un rendement de 58 % (2.25 g, 11.63 mmol).

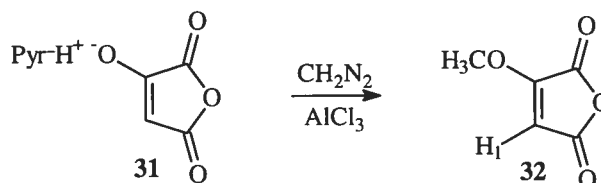
Point de fusion: plus de 230°C (point de fusion théorique: 230°C ¹⁰¹)

IR (KBr) (cm⁻¹): 3400 - 3000 (C=N-H), 1860 et 1770 (C=O lactone), 1650 (C=C aromatique)

RMN¹H (DMSO-D₆): δ (ppm) 8.81 (dd, *J* = 6.36 Hz, *J* = 1.60 Hz, 2H, H₁), 8.32 (tt, *J* = 9.40 Hz, *J* = 1.65 Hz, 1H, H₃), 7.84 (td, *J* = 6.35 Hz, *J* = 1.34 Hz, 2H, H₂) 4.90 (s, 1H, H₄)

Masse exacte attendu pour C₉H₇NO₄: 193.037507 g/mol

Anhydride méthoxymaléique 32



Du diazométhane en solution dans 50 mL d'éther anhydre est placé à 0°C. Par la suite, l'anhydride **31**, (500 mg, 2.59 mmol) en solution dans du THF (200 mL) est ajouté. Le tout est laissé à 0°C pour 30 minutes. Suite à ce délai, une solution de trichloroaluminium (50 mg, 0.37 mmol) dans de l'éther (5 mL) est ajouté. Le tout est placé à la température de la pièce pour une heure. Par la suite, la suspension est filtrée, et le filtrat est concentrée. Le produit final est purifié via une distillation sous pression réduite pour obtenir le produit attendu **32** dans un rendement de 60 % (199 mg, 1.55 mmol).

Point d'ébullition théorique: 0,5 Torr 111°C ¹⁰¹

IR (KBr) (cm⁻¹): 1860, 1775, 1645

RMN¹H (CDCl₃): δ (ppm) 5.75 (s, 1H, H₁), 4.05 (s, 3H, CH₃)

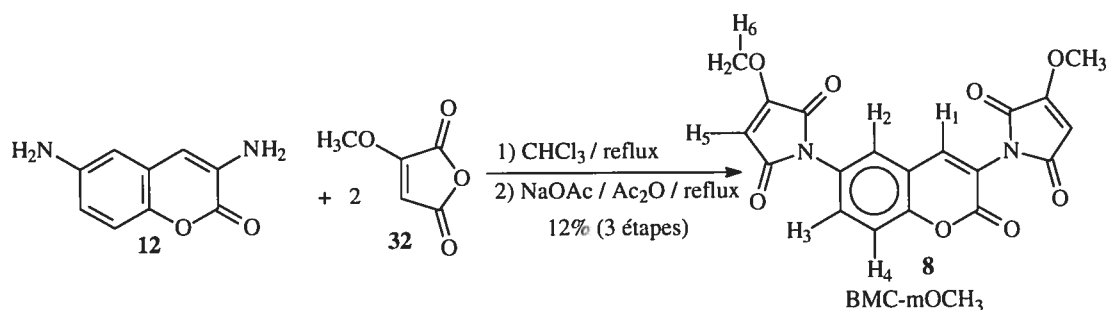
RMN¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 169.83, 166.24, 99.38, 47.61

Masse exacte attendu pour C₅H₄O₄: 128.010958 g/mol

masse trouvée : 128.010428 g/mol

3.6-Bis-[3-méthoxy-1H-pyrrole-2,5-dione]2H-1-benzopyran-2-one

8



Les conditions réactionnelles de synthèse et de purification utilisées ici sont les mêmes que pour le composé **1**. La seule différence est que la réaction a été réalisée avec de l'anhydride méthoxymaléique (584 mg, 4.56 mmol) et que le produit attendu **8** a été obtenu dans un rendement de 20 % (119 mg, 0.3 mmol).

Point de fusion: plus de 230°C

IR (KBr) (cm^{-1}): 3500 – 3300 (amide), 1720 (C-O-lactone), 1670 (C=C aromatique), 1260 (éther)

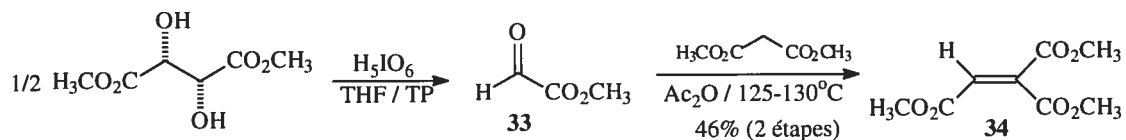
RMN¹H (DMSO-D₆): δ (ppm) 8.01 (s, 1H, H₁), 7.69 (d, $J = 2.27$ Hz, 1H, H₂), 7.25 (dd, $J = 9.23$ Hz, $J = 2.27$ Hz, 1H, H₃), 7.19 (d, $J = 9.08$ Hz, 1H, H₄), 6.02 (s, 2H, H₅), 3.24 (s, 3H, H₆), 3.12 (s, 3H, H₆)

RMN ¹³C (DMSO-D₆): δ (ppm) 170.03, 169.08, 164.32, 160.92, 146.22, 136.28, 125.83, 124.83, 120.91, 120.32, 119.81, 119.09, 99.74, 48.06, 47.98

Masse exacte attendue pour C₁₉H₁₂N₂O₈ : 396.059365 g/mol

masse trouvée : 396.059438 g/mol

triméthyléthène-1,1,2-tricarboxylate 34



À une solution de diméthyl-(L)-tartrate (4 g, 22.46 mmol) dans du THF (100 mL) anhydre, une solution d'acide périodique (5.12 g, 22.46 mmol) dans 40 mL de THF est ajoutée goutte à goutte. Le tout est laissé à la température de la pièce pour une heure. Suite à ce délai, la solution est filtrée sur célite en rinçant avec du THF sec. Le filtrat est concentré et transféré dans un ballon de 100 mL. Par la suite, le diméthylmalonate (2.57 mL, 22.46 mmol) et l'anhydride acétique (50 mL) sont ajoutés et chauffés à 130°C pour 31 heures. Par la suite, une distillation sous vide 100-110°C à 0.2 mm Hg est réalisée pour obtenir le produit attendu **34** dans un rendement de 46 % (pour les deux étapes) (2.10 g, 10.33 mmol).

Point d'ébullition: 100-110°C à 0.2 mm Hg

IR (KBr) (cm^{-1}): 3010, 2957, 1731, 1655, 1269

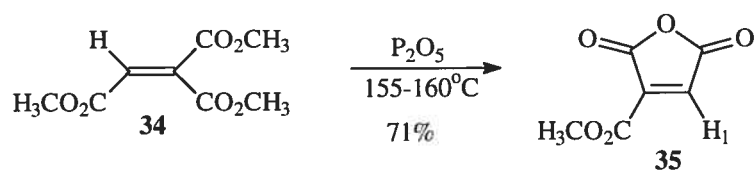
RMN¹H (DMSO-D₆): δ (ppm) 6.91 (s, 1H, H), 3.80 (s, 3H, CH₃), 3.78 (s, 3H, CH₃), 3.74 (s, 3H, CH₃)

RMN ¹³C (DMSO-D₆): δ (ppm) 162.34, 159.87, 139.83, 132.28, 50.08, 48.23, 48.03
(Le carbone manquant est dû à une superposition de pics et non à un problème de concentration qui empêcherait de voir tous les pics.)

Spectre de masse exacte attendue pour C₈H₁₀O₆ : 203.047738 g/mol

masse trouvée : 203.056104 g/mol

Anhydride α -carbométhoxymaléique 35



Le pentoxyde de phosphore (4.18 g, 20.66 mmol) est placé dans un ballon sec de 25 mL. Par la suite, le triméthyléthène-1,1,2-tricarboxylate (2.10 g, 10.33 mmol) est ajouté et le tout est chauffé à 160°C pour 5 heures. Le produit est alors purifié par distillation sous pompe à vide pour obtenir le produit **35** dans un rendement de 71 % (1.14 g, 7.33 mmol).

Point de fusion: 37-38°C (point de fusion théorique: 37-38°C¹⁰²)

IR (KBr) (cm⁻¹): 1840, 1770, 1725, 1640

RMN¹H (CDCl₃): δ (ppm) 7.5 (s, 1H, H₁), 4.0 (s, 3H, CH₃)

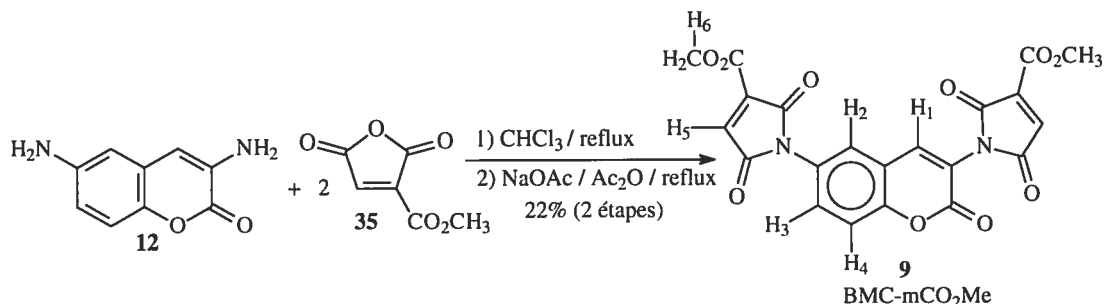
RMN¹³C (CDCl₃): δ (ppm) 169.37, 167.31, 165.04, 147.38, 143.24, 50.04

Spectre de exacte attendue pour C₆H₄O₅ : 156.005873 g/mol

masse trouvée : 156.012618 g/mol

3.6-Bis-[3-carbométhoxy-1H-pyrrole-2,5-dione]2H-1-benzopyran-

2-one 9



Il s'agit des mêmes conditions réactionnelles qui ont été utilisées pour la synthèse du composé **1**. La seule différence est que la réaction a été réalisée avec de l'anhydride α -carbométhoxymaléique (712 mg, 4.56 mmol). Les conditions quant à la purification sont également les mêmes et le produit attendu **9** a été obtenu dans un rendement de 22 % (151 mg, 0.33 mmol).

Point de fusion: plus de 230°C

IR (KBr) (cm⁻¹): 3500 – 3300 (amide), 1720 (C-O-lactone et ester), 1670 (C=C aromatique)

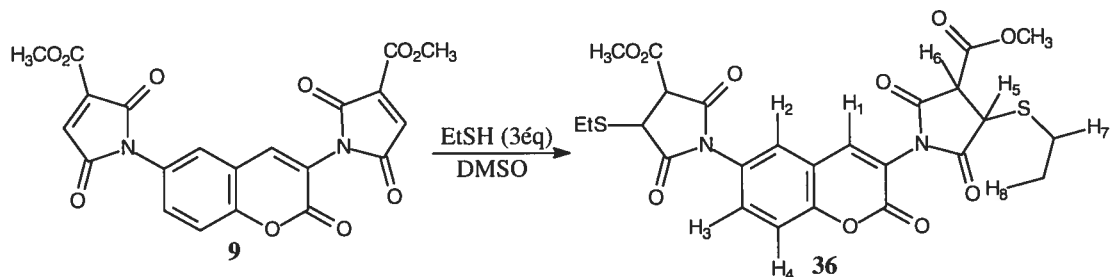
RMN¹H (DMSO-D₆): δ (ppm) 8.24 (s, 1H, H₁), 8.04 (s, 2H, H₅), 7.66 (dd, $J = 8.97$ Hz, $J = 2.43$ Hz, 1H, H₃), 7.42 (d, $J = 8.96$ Hz, 1H, H₄), 7.40 (d, $J = 2.42$ Hz, 1H, H₂), 4.04 (s, 3H, ester), 4.00 (s, 3H, ester)

RMN ¹³C (DMSO-D₆): δ (ppm) 171.02, 163.38, 162.09, 159.92, 145.83, 142.80, 142.31, 135.32, 128.06, 124.83, 120.92, 119.92, 119.27, 117.16, 48.83 (Le carbone manquant est dû à une superposition de pics et non à un problème de concentration qui empêcherait de voir tous les pics.)

Masse exacte attendue pour C₂₁H₁₂N₂O₁₀ : 452.049194 g/mol

Masse trouvée : 452.049086 g/mol

3.6-Bis-[3-carbométhoxy-1H-pyrrolidine-2,5-dione-3-thioéthyl]2H-1-benzopyran-2-one 36



Les conditions réactionnelles sont les mêmes que pour la synthèse du composé **28**. La seule différence est que la réaction a été réalisée avec du 3,6-bis[3-carbométhoxy-1H-pyrrole-2,5-dione]2H-1-benzopyran-2-one **9** (54 mg, 0.12 mmol). Malgré la présence de traces de DMSO (ce qui empêche de fournir le point de fusion et l'analyse élémentaire), le produit **36** est formé dans un rendement évalué à 83 % (58 mg, 0.1 mmol).

IR (KBr) (cm^{-1}): 3500 – 3000 (amide), 1727 (C-O-lactone et ester), 1622 (C=C aromatique), 600 (C-S)

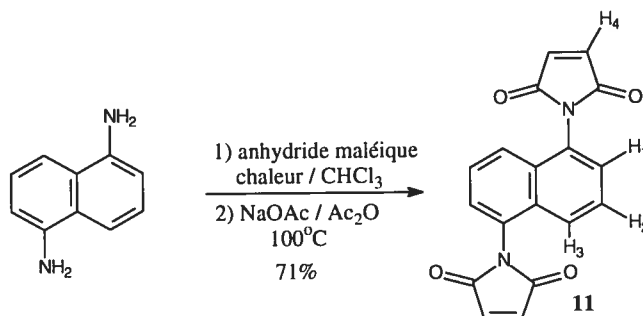
RMN¹H (DMSO-D₆): δ (ppm) 8.24 (s, 1H, H₁), 7.53 (d, $J = 2.63$ Hz, 1H, H₂), 7.36 (dd, $J = 9.24$ Hz, $J = 2.67$ Hz, 1H, H₃), 7.24 (d, $J = 9.24$ Hz, 1H, H₄), 4.38 (s, 1H, H₆), 4.32 (s, 1H, H₆), 4.00 (s, 3H, ester), 3.98 (s, 3H, ester), 3.92 (s, 1H, H₅), 3.87 (s, 1H, H₅), 2.80 (m, 4H, H₇), 1.30 (t, $J = 7.24$ Hz, 6H, H₈)

RMN ¹³C (DMSO-D₆): δ (ppm) 175.06, 172.67, 168.06, 158.44, 150.63, 137.28, 128.83, 128.32, 124.22, 119.69, 118.47, 117.21, 50.01, 46.23, 42.16, 39.12, 14.24, 12.03 (Les carbones manquants sont dus à une superposition de pics et non à un problème de concentration qui empêcherait de voir tous les pics. En effet, une pseudosymétrie des succinimides thiolés occasionne ce profil.)

Masse exacte attendue pour C₂₅H₂₄N₂O₁₀S₂ : 576.087238 g/mol

masse trouvée : 576.087413 g/mol

1,5-Bis [1H-pyrrole-2,5-dione]naphthalène 11



Les conditions réactionnelles de synthèse et de purification utilisées sont les mêmes que pour la synthèse du composé **1**. La seule différence est que la réaction a été réalisée avec du 1,5-diaminonaphtalène (300 mg, 1.90 mmol) et que le produit attendu **11** a été obtenu dans un rendement de 71 % (428 mg, 1.35 mmol).

Point de fusion: plus de 230°C (dégradation)

IR (KBr) (cm⁻¹): 3456 (amide), 3070 (C - H), 1705 (C=C aromatique)

RMN¹H (DMSO-D₆): δ (ppm) 7.87 (d, *J* = 7.80 Hz, 2H, H₃), 7.70 (t, *J* = 8.49Hz, 2H, H₂), 7.62 (d, *J* = 7.38 Hz, 2H, H₁), 7.32 (s, 4H, H₄)

RMN ¹³C (DMSO-D₆): δ (ppm) 170.03, 134.61, 130.70, 128.24, 127.62, 126.31, 123.83 (Les carbones manquants sont dus à une superposition de pics et non à un problème de concentration qui empêcherait de voir tous les pics)

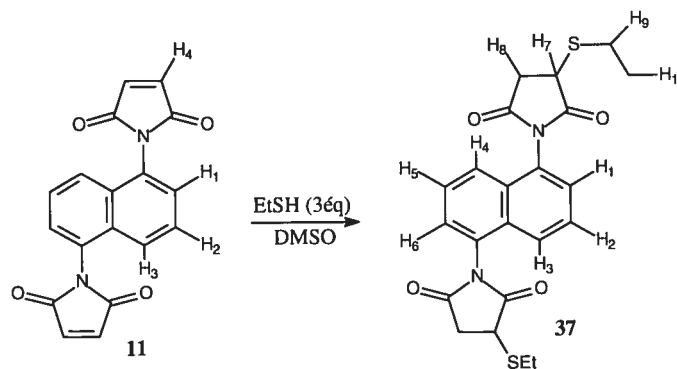
Masse exacte attendue : 318.064056 g/mol

masse trouvée : 318.064142 g/mol

Analyse élémentaire de C₁₈H₁₀N₂O₄ attendue : C, 67.93 ; H, 3.17 ; N, 8.80

trouvée : C, 67.05 ; H, 3.13 ; N, 8.62

1,5-Bis [1H-pyrrolidine-2,5-dione-3-thioéthyl]naphtalène 37



Les conditions réactionnelles sont les mêmes que pour la synthèse du composé **28**. La seule différence est que la réaction a été réalisée avec du 1,5-bis[1H-pyrrole-2,5-dione]naphtalène **11** (38 mg, 0.12 mmol). Malgré la présence de traces de DMSO (ce qui empêche de fournir le point de fusion et l'analyse élémentaire), le produit **37** est formé dans un rendement évalué à 87 % (46 mg, 0.10 mmol).

IR (KBr) (cm^{-1}): 3500 et 3000 (amide), 1620 (C=C, aromatique), 600 (C=S)

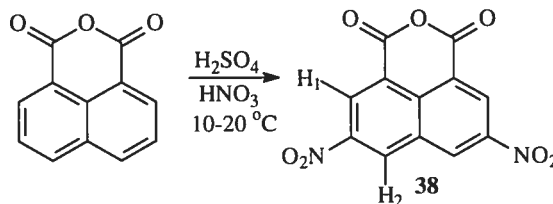
RMN¹H (DMSO-D₆): δ (ppm) 8.00 (d, $J = 8.16$ Hz, 1H, H₃), 7.78 (t, $J = 7.82$ Hz, 1H, H₂), 7.75 (m, 2H, H₄ et H₂), 7.57 (d, $J = 8.04$ Hz, 1H, H₁), 7.51 (d, $J = 8.02$ Hz, 1H, H₆), 4.42 (d, $J = 5.20$ Hz, 1H, H₇), 4.22 (d, $J = 5.00$ Hz, 1H, H₇), 3.64 (m, 1H, H₈), 3.42 (m, 1H, H₈), 3.34 (m, 6H, H₈ et H₉), 1.89 (t, $J = 7.32$ Hz, 6H, H₁₀)

RMN ¹³C (DMSO-D₆): δ (ppm) 175.95, 174.40, 162.92, 129.81, 129.56, 128.99, 128.84, 128.35, 127.06, 126.63, 126.31, 125.82, 124.01, 122.48, 36.43, 35.91, 24.70, 24.40, 13.86 (Les carbones manquants sont dus à une superposition de pics et non à un problème de concentration qui empêcherait de voir tous les pics.)

Masse exacte attendue pour C₂₂H₂₂N₂O₄S₂ : 442.102100 g/mol

masse trouvée : 442.101998 g/mol

5,8-Dinitro-benzo[de]isochromène-1,3-dione 38



L'acide sulfurique (40.0 mL) est placé dans un ballon de 100 mL auquel est ajouté l'anhydride 1,8-naphtalique (10.00 g, 50.5 mmol). La température de la solution est abaissée à 5°C à l'aide d'un bain de glace. L'acide nitrique (10 mL) est ajouté goutte à goutte en surveillant la température pour qu'elle n'excède pas 20°C. La solution est ensuite chauffée à 60°C pour 1.5h. Après ce temps, la solution est refroidie et le contenu du ballon est versé dans un béccher d'eau glacée. Le précipité obtenu est ensuite filtré, séché puis placé dans un ballon contenant de l'acide acétique glacial (100 mL). Cette nouvelle solution est refroidie à 4°C sur une période de 24 h. Le second précipité est ensuite filtré, lavé avec de l'acide acétique glacial froid et séché en coévaporation avec du toluène pour obtenir le produit attendu (10.31 g, 37.8 mmol) sous forme d'une poudre beige **38** dans un rendement de 72 %.

Point de fusion: 208-210°C (point de fusion théorique: 208-210°C ¹⁰³)

IR (KBr) (cm⁻¹): 3098; 2897; 1707; 1617; 1552; 1336; 1260

RMN ¹H (Acétone – D₆): δ (ppm) 9.80 (d, *J*=2.23 Hz, 2H, H₁), 9.05 (d, *J*=2.13 Hz, 2H, H₂)

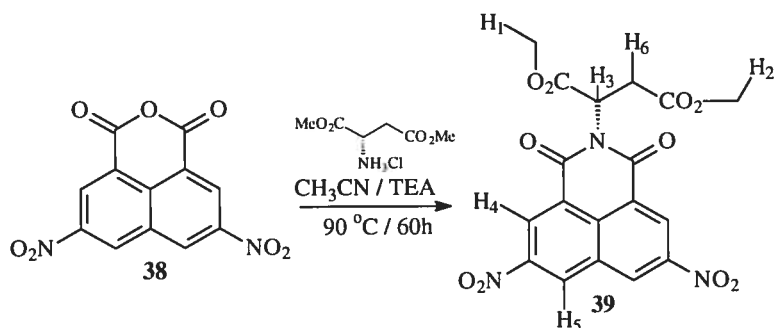
RMN ¹³C (DMSO – D₆): δ (ppm) 159.75; 148.14; 134.62; 133.28; 131.62; 128.06; 123.07

Masse exacte attendue: 288.00185 g/mol ; masse obtenue: 288.00144 g/mol

Analyse élémentaire de C₁₂H₄N₂O₇ : attendue : C 50,02; H 1,40; N 9,72; O 38,86

Trouvée : C 47.15; H 1.85; N 8.87; O 42.58

Acide 2-(5,8-dinitro-1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-succinique dimethyl ester 39



Le composé **38** (300 mg, 1.06mmol) et de l'acide L-aspartic dimethyl ester (217 mg, 1.06 mmol) sont ajoutés à un ballon de 25 mL contenant de l'acétonitrile (10 mL) anhydre. La triéthylamine (180 μ L, 1.27 mmol) est ensuite ajoutée goutte à goutte pour donner une solution violette. Le tout est chauffé à 90°C pendant 60 h. Après avoir refroidi la solution, le solvant est évaporé et le solide obtenu est purifié par chromatographie flash en utilisant un solvant composé de 70 % d'hexanes et de 30 % d'acétate d'éthyle. Le solvant est évaporé pour donner le produit attendu (229 mg, 0.53 mmol) sous forme de gomme beige **39** dans un rendement de 50 %.

Point de fusion trouvé: 128 – 129°C

IR (KBr) (cm^{-1}): 3083.21; 2954.22; 1740.4; 1678.3; 1535.6; 1318.6; 748.13

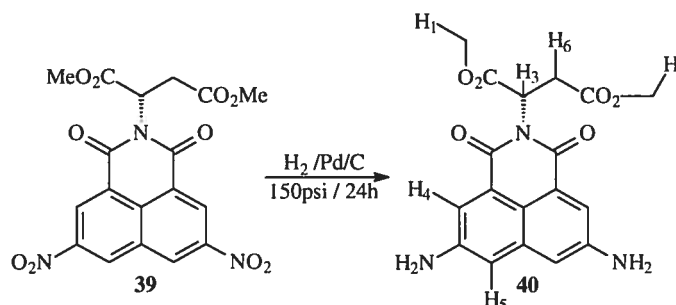
RMN ^1H (CDCl_3): δ (ppm) 9.44 (d, $J=2.08$ Hz, 2H, H_4), 9.39 (d, $J=2.07$ Hz, 2H, H_5), 6.17 (dd, $J=7.88$ Hz, $J=6.29$ Hz, 1H, H_3), 3.72 (s, 3H, H_2), 3.63 (s, 3H, H_1), 3.44 (dd, $J=16.84$ Hz, $J=6.26$ Hz, 1H, H_6), 3.01 (dd, $J=16.84$ Hz, $J=7.94$ Hz, 1H, H_6)

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ (ppm) 170.53; 168.37; 160.99; 147.46; 131.97; 130.90; 130.80; 127.58; 124.54; 52.98; 52.00; 50.12; 33.35

Masse exacte attendue: 431.060093 g/mol ; masse trouvée: 431.068765 g/mol

Analyse élémentaire de $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_{10}$: attendue : C 50.13; H 3.04; N 9,74; O 37,09
trouvée : C 46.60; H 2.82 ; N 8.56 ; O 42.02

Diester méthylique de l'acide 2-(5,8-Diamino-1,3-dioxo-1H,3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-succinique 40



Le composé **39** (220 mg, 0.51 mmol) est placé dans un ballon de 50 mL auquel le THF (20 mL) et le palladium 10 % sur charbon (22 mg) sont ajoutés. La solution est ensuite placée dans un réacteur à hydrogénation sous une pression de 150 psi de H₂ pour 24 h. Le catalyseur est ensuite filtré sur célite et lavé abondamment avec du THF. Le filtrat est évaporé et le solide obtenu est purifié par chromatographie flash en utilisant un solvant composé de 70 % acétate d'éthyle et de 30 % de chloroforme. Le solvant est ensuite évaporé pour obtenir le produit attendu **40** (92.5 mg, 0.25 mmol) sous forme d'une poudre orange dans un rendement de 49 %.

Point de fusion trouvé: 175-177°C

IR (KBr) (cm⁻¹): 3380.31; 1748.25; 1625.23; 1316.31; 797.43

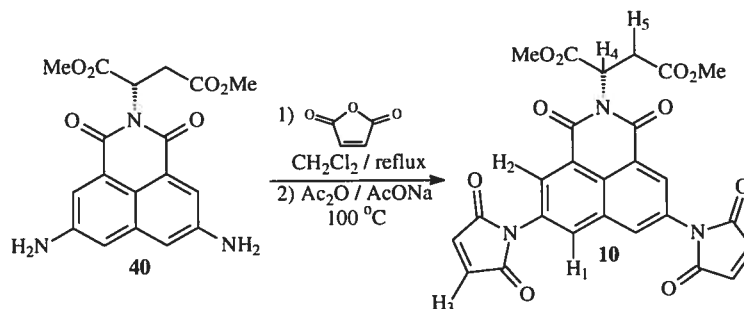
RMN ¹H (DMSO – D₆): δ (ppm) 7.59 (d, *J*=1.90 Hz, 2H, H₄), 6.97 (d, *J*=1.90 Hz, 2H, H₅), 6.02 (dd, *J*=8.00 Hz, *J*=5.43 Hz, 1H, H₃), 5.74 (s, 4H, NH₂), 3.61 (s, 6H, H₁ H₂), 3.28 (dd, *J*=16.49 Hz, *J*= 8.59 Hz, 1H, H₆), 2.85 (dd, *J*=16.53 Hz, *J*= 5.00 Hz, 1H, H₆)

RMN ¹³C (DMSO – D₆): δ (ppm) 171.81; 170.66; 164.56; 148.76; 136.60; 122.74; 118.43; 115.51; 111.18; 111.11; 53.50; 50.73; 49.52; 34.76 (Les carbones manquants sont dus à une superposition de pics et non à un problème de concentration qui empêcherait de voir tous les pics.)

Masse exacte attendue: 371.111735 g/mol ; masse trouvée: 371.113454 g/mol

Analyse élémentaire de C₁₈H₁₇N₃O₆: attendue : C 58.22; H 4.61; N 11.32; O 25.85
trouvée : C 56.95; H 4.65; N 10.79; O 27.61

Diméthyl ester de l'acide 2-[5,8-Bis-(1H-pyrrole-2,5-dione)-1,3-dioxo-1H,3H benzo[de]isoquinolin-2-yl]-succinique 10



Le composé **40** (200 mg, 0.54 mmol) et l'anhydride maléique (159 mg, 1.62 mmol) sont placés dans un ballon sec de 50 mL. Le chloroforme est ensuite ajouté et la solution est chauffée à reflux pour 24 h. Cette dernière est ensuite refroidie à la température de la pièce. Le solide brun est isolé par filtration et séché sous pression réduite. Le précipité est placé dans un ballon de 25 mL auquel l'acétate de sodium et l'anhydride acétique sont ajoutés. La solution est chauffée à 100°C pour 1 h. Le solvant est ensuite évaporé et le solide obtenu est dissous dans l'acétate d'éthyle. La solution est placée à 4°C pour 48h et le précipité est récupéré et lavé avec 25 mL d'une solution 20 % eau, 80 % DMSO. Le solide est lavé une seconde fois avec 25 mL d'eau et dissous dans l'acétone. Le solvant est ensuite évaporé et le solide obtenu est redissous dans un minimum d'acétate d'éthyle chaud et précipité dans un minimum d'hexane pour obtenir le produit attendu **10** (53 mg, 0.10 mmol) sous une forme de poudre jaune dans un rendement de 19 %.

Point de fusion trouvé: plus de 230°C

IR (KBr) (cm^{-1}): 3102.28; 1717.5; 1669.15; 1413.12

RMN ^1H (DMSO – D_6): δ (ppm) 8.60 (d, $J=1.83$ Hz, 2H, H_1), 8.58 (d, $J=1.86$ Hz, 2H, H_2), 7.32 (s, 4H, H_3), 6.12 (dd, $J=7.96$ Hz, $J=5.38$ Hz, 1H, H_4), 3.64 (s, 3H, H_6), 3.63 (s, 3H, H_6), 3.32 (dd, $J=16.52$ Hz, $J=8.60$ Hz, 1H, H_5), 2.97 (dd, $J=16.53$ Hz, $J=5.03$ Hz, 1H, H_5)

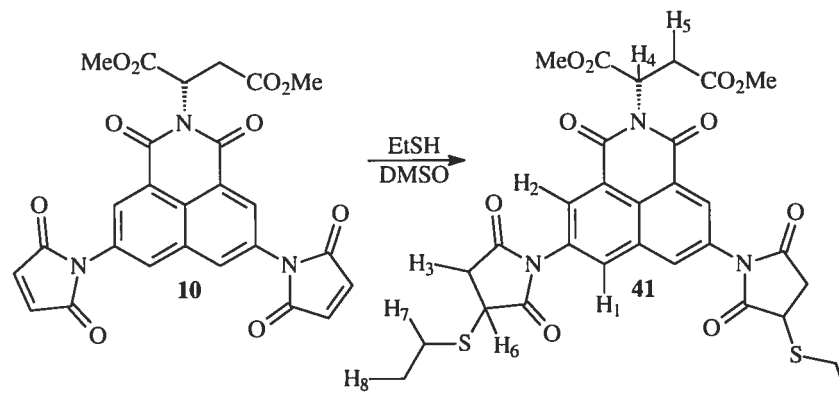
RMN ^{13}C (DMSO – D_6): δ (ppm) 171.77; 170.63; 170.33; 163.45; 136.08; 132.70; 132.35; 132.16; 130.80; 125.85; 123.47; 53.72; 52.83; 50.16; 34.46

Masse exacte attendue: 531.091394 g/mol ; masse trouvée: 531.098040 g/mol

Analyse élémentaire de $C_{26}H_{17}N_3O_{10}$:attendue : C 58.76; H 3.22; N 7.91; O 30.11

trouvée : C 51.59; H 3.22; N 6.71; O 38.48

Acide 2-[5,8-Bis-(1H-pyrrolidine-2,5-dione-3-thioéthyl)-1,3-dioxo-1H,3H benzo[de]isoquinolin-2-yl]-succinique dimethyl ester 41



Les conditions réactionnelles de synthèse utilisées ici sont les mêmes que pour le composé **28**. La seule différence est que la réaction a été réalisée avec du diester méthylique de l'acide 2- [5,8- bis- (2,5 -dihydro -pyrrol -1 -yl) -1,3- dioxo -1H, 3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl]-succinique **10** (26 mg, 0.49 mmol). Malgré la présence de traces de DMSO (ce qui empêche de fournir le point de fusion et l'analyse élémentaire), le produit **41** est formé dans un rendement évalué à 89 % (29 mg, 0.044 mmol).

IR (KBr) (cm^{-1}): 3104 (amide), 1715 (C-O lactone), 1671 (C=C aromatique), 756 (C-S)

RMN ^1H (DMSO- D_6) : δ (ppm) 8.59 (d, $J = 1.82$ Hz, 2H, H_2), 8.52 (d, $J = 1.78$ Hz, 2H, H_1), 6.08 (dd, $J = 7.86$ Hz, $J = 5.29$ Hz, 1H, H_4), 4.20 (q, $J = 8.66$ Hz, 2H, H_3), 3.61 (m, 10H, H_6 et Me), 3.41 (dd, $J = 16.46$ Hz, $J = 8.56$ Hz, 1H, H_5) 2.88 (m, 5H, H_5 et H_7), 1.25 (t, $J = 8.27$ Hz, 6H, H_8)

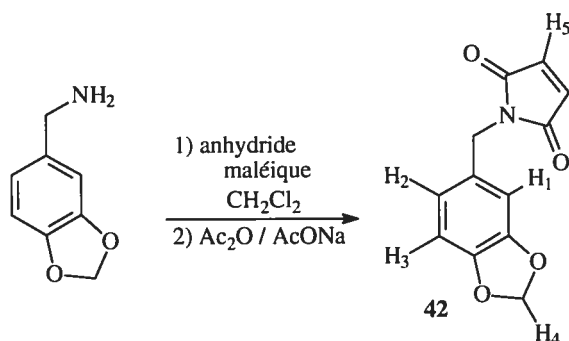
RMN ^{13}C (DMSO- D_6) : δ (ppm) 175.86, 173.73, 170.26, 169.15, 168.80, 161.87, 134.58, 131.96, 131.20, 130.68, 129.30, 127.72, 127.34, 126.98, 124.74, 124.46, 121.98, 121.73, 52.18, 51.32, 48.64, 32.93, 24.44, 18.98, 17.78, 13.84 (Les carbones manquants sont dus à une superposition de pics et non à un problème de

concentration qui empêcherait de voir tous les pics.)

Masse exacte attendue pour $C_{30}H_{29}O_{10}S_2$: 655.12943 g/mol

masse trouvée : 655.12902 g/mol

(1H-pyrrole-2,5-dione)-pipéronylamine 42



Les conditions réactionnelles de synthèse et de purification utilisées ici sont les mêmes que pour le composé **1**. La seule différence est que la réaction a été réalisée avec du pipéronylamine (47 mg, 0.31 mmol). et que le produit beige attendu **42** a été obtenu dans un rendement de 72 % (52 mg, 0.23 mmol).

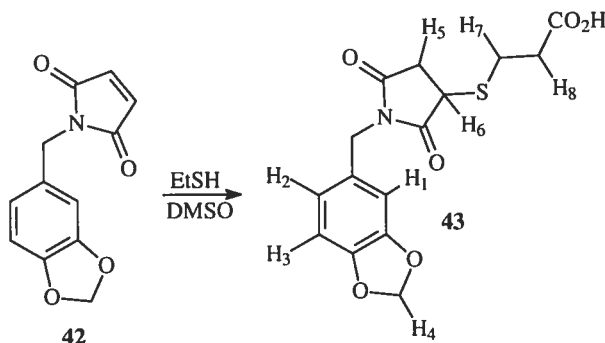
IR (KBr) (cm⁻¹): 3500-3300 (NH amide), 3200-3000 (C-H), 1650-1550 (C=C), 1250 (C-O éther)

RMN ¹H (D₂O) : δ (ppm) 6.83 (d, *J*=7.06 Hz, 1H, H₂), 6.82 (s, 1H, H₁), 6.66 (d, *J*=5.85 Hz, 1H, H₃), 5.93 (s, 2H, H₅), 4.35 (s, 2H, H₄) (note: le CH₂ espaceur est caché par le pics du solvant).

Masse exacte attendue pour C₁₂H₉NO₄ : 231.05316 g/mol

masse trouvée : 231.05621 g/mol

**(1H-pyrrolidine-3-(acide 3-mercaptopropionique)-2,5-dione)-
piperonylamine 43**



Les conditions réactionnelles sont les mêmes que pour la synthèse du composé **28**. La seule différence est que la réaction a été réalisée avec du pipéronylmaléimide **42** (14 mg, 0.059 mmol). Malgré la présence de traces de DMSO (ce qui empêche de fournir le point de fusion et l'analyse élémentaire), le produit thiolé **43** est formé dans un rendement évalué à 83 % (17 mg, 0.049 mmol).

IR (KBr) (cm^{-1}) : 3500-3300 (NH amide), 3200-3000 (C-H), 1650-1550 (C=C), 1250 (C-O éther), 600 (C-S)

RMN ^1H (D_2O) : δ (ppm) 9.34 (s, 1H, acide), 6.79 (d, $J=7.06$ Hz, 1H, H_2), 6.75 (s, 1H, H_1), 6.60 (d, $J=5.85$ Hz, 1H, H_3), 4.35 (s, 2H, H_4) 3.16 (d, $J=8.70$ Hz, 1H, H_6), 2.97 (t, $J=7.42$ Hz, 2H, H_8), 2.72 (d, $J=5.41$ Hz, 1H, H_5), 2.64 (d, $J=5.52$ Hz, 1H, H_5) 2.43 (t, $J=7.21$ Hz, 2H, H_7) (note: le CH_2 espaceur est caché par le pics du solvant).

Masse exacte attendue pour $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_6\text{S}$: 337.06201 g/mol

masse trouvée : 337.06232 g/mol

8.2. Biologie moléculaire

Les électroporations ont été réalisées grâce à un appareil de type Electroporator 2510 de la compagnie Eppendorf (Allemagne)

Les tests de Bradford et de Lowry ont été réalisés à partir des kits commercialisés par Bio-Rad Laboratories (Canada, Mississauga)

Les gels SDS-PAGE ont été migrés à l'aide d'un Power PAC 300 de Bio-Rad Laboratories (Canada, Mississauga)

Les séquençages furent réalisés à l'aide d'un dNA sequencer long reading 4200 de la compagnie Li-COR biosciences (USA, Nebraska)

Les gels d'agarose ont été migrés à l'aide d'un EC 250-90 de la compagnie EC Appartus Corporation

Les purifications d'ADN ont été faites à partir de kit Qiagen mini-prep et de kits Qiagen Extraction Gel de la compagnie Qiagen inc. (Canada, Mississauga)

Les PCR furent possibles à l'aide d'un appareil de type PTC-200 peltier Thermal Cycler de la compagnie MJ Research, Genetic Technologies, inc. (USA, Miami)

Toutes les photographies ont été prises grâce à un transilluminateur de la compagnie Bio-Rad Laboratories (Canada, Mississauga)

Les amorces ont été obtenues par la compagnie Alpha DNA (Canada, Montréal)

8.2.1. Transformation (choc thermique / électroporation)

La transformation est un processus qui permet d'incorporer le plasmide recombinant (pQE32-TRXC35A ou pQE32-diCysFos selon l'étude) à l'intérieur de bactéries pour des fins d'amplification¹⁵⁸. La transformation peut se réaliser de plusieurs manières, telles que le choc thermique et l'électroporation^{159,160}.

8.2.1.1. Transformation par choc thermique

Les bactéries utilisées furent BL21/pRep4 pour l'expérience avec TRXC35A et XL1-bleu pour la transformation des protéines Fos. Les caractéristiques de XL1-bleu sont: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]. Ainsi, 400 μL de bactéries compétentes (bactéries dont les parois membranaires ont été affaiblies afin de permettre une meilleure porosité¹⁶¹) ont été placées à 4°C et bien resuspendues. Les premiers 200 μL servent de blanc alors que les 200 μL restant ont été ajoutés à 20 μL de tampon TE pH 8 contenant le plasmide d'intérêt (20 ng). La solution fut alors mélangée doucement puis placée à 4°C pour 45 min. Par la suite, le mélange fut placé à 42°C pour 2 min et remis immédiatement sur glace pour 5 min. Suite à ce délai, 1 mL de milieu LB fut ajouté et une incubation de 45 min à 220 rpm fut réalisée. Ainsi, les cellules peuvent reprendre leur pleine capacité de reproduction (la prochaine étape après la transformation). La suspension est alors centrifugée à 14 000 rpm pour 30 secondes et 900 μL de surnageant sont jetés. Par la suite, le culot est resuspendu et le tout est étalé sur gélose puis placé à 37°C pour la nuit. Après ce délai, les colonies sont visibles à l'œil nu.

8.2.1.2. Transformation par électroporation

Une suspension de plasmide recombinant (10 μL, 4 ng d'ADN) et de bactéries compétentes (80 μL) sont placées dans une cuvette à électroporation. L'impulsion émise par l'appareil envoie alors un choc électrique de 1800 V qui traverse la cuvette.

Il s'ensuit une ouverture des pores cellulaires et le plasmide peut ainsi pénétrer la membrane. Le tout est alors placé dans 910 μL de milieu d'incubation (880 μL LB, 20 μL KCl 0.25 M / MgCl_2 1 M, 10 μL glucose 20 %) à 37°C pour 1 h. Par la suite, la suspension est centrifugée et étalée sur gélose tel que décrit pour la transformation par choc thermique.

Note: Lorsque les colonies qui ont poussé se sont avérées de vrais positifs (tel que discuté au chapitre 5), il est recommandé de faire un stock de bactéries afin de ne pas avoir à refaire constamment la transformation. Ainsi, un mélange du milieu de culture et de Glycérol 50 %, NaCl 1 % 1:1 est placé à -80°C. Ainsi, pour obtenir davantage de plasmides, il suffira de piquer un peu de cette suspension congelée et de la placer dans du milieu de culture sans avoir à réaliser toutes les étapes décrites précédemment.

8.2.2. Expression et purification de la protéine (Ni-NTA / Dialyse)

Un aliquot du stock de bactéries transformées (préalablement caractérisé par clivage enzymatique et par séquençage) est placé dans 50 mL de milieu de culture contenant un antibiotique (Ampicilline 100 mg/mL pour Fos et Kanamicyne 50 mg/mL pour TRXC35A) à 37°C pour la nuit. Le lendemain, 25 mL de cette suspension bactérienne sont mis dans un Erlenmeyer de 2 L stérile et 500 mL de milieu de culture/antibiotique y sont ajoutés. La suite des étapes consiste à remettre cette suspension à 37°C (220 rpm) et de surveiller la croissance bactérienne jusqu'à ce qu'elle atteigne une densité optique de 0.5-0.7 à une longueur d'onde de 600 nm. Cette étape prend entre 2 et 3 heures. Lorsque la D.O. désirée est atteinte, 500 mL d'IPTG 1 mM sont ajoutés (pour avoir 500 μL final) et une incubation à 37°C est à nouveau effectuée pour 3 h. Suite à ce délai, une centrifugation est réalisée à 3000 rpm pour 30 min.

Le surnageant peut alors être jeté et les bactéries sont mises en suspension dans 8 mL de tampon de lyse (9.4 mL K_2HPO_4 1 M, 600 μ L KH_2PO_4 1 M, 500 μ L imidazole 1 M amenée à 100 mL avec de l'eau) puis transférées dans un tube Falcon de 50 mL.

L'étape suivante consiste à faire une sonication sur glace (5 fois 30 secondes avec une minute de pause entre chacune) suivie d'une centrifugation à 4°C (30 min / 3000 rpm). On prélève alors 50 μ L (qui sera utilisé pour faire un SDS-PAGE) et mettre le reste du surnageant dans un tube Falcon de 15 mL ainsi que 1 mL de résine Ni-NTA conditionnée (3 lavages avec 3 fois 1 mL de tampon de lyse, centrifugation 3000 rpm / 1min / 4°C et jeter le surnageant). La suspension doit ainsi être agitée pour une période minimale de 1 h à 4°C. Suite à ce délai, la suspension doit être placée dans une colonne pour Ni-NTA et la suspension est éluée goutte à goutte jusqu'à ce que le niveau du liquide soit au niveau des billes de Ni-NTA (ne jamais les assécher). Le « flow through » est alors récupéré dans un tube Falcon de 15 mL et sera analysé sur gel dans une étape prochaine. Par la suite, une série de lavages est réalisée avec 6 mL de 1) tampon de lyse, 2) tampon de lavage 1 (100 μ L d'imidazole 1 M et 19.9 mL de tampon de lyse), 3) tampon de lavage 2 (300 μ L d'imidazole 1 M et 19.7 mL de tampon de lyse). Il faut évidemment changer de tube Falcon de récupération entre chacune des étapes de lavage afin de pouvoir récupérer la protéine si elle décroche plus tôt que ce qui est prévu. Finalement, la protéine est recueillie en ajoutant 4 mL de tampon d'éluion (800 μ L K_2HPO_4 1 M, 200 μ L KH_2PO_4 1 M, 2.5 mL imidazole 1 M et 6.5 mL d'eau).

Le tampon d'éluion n'est pas adéquat pour conserver une protéine ainsi, l'étape suivante consiste à faire une dialyse (dans le cas de TRXC35A) ou encore un changement de tampon par filtre de type « centrifugal filter devices » (pour Fos).

La dialyse utilise une membrane de Cellophane™ coupée en longueur de 10 cm et placée dans de l'eau millipore pour 10 min (permet le gonflement). La membrane est alors fermée à une extrémité à l'aide d'une pince conçue à cet effet et le filtrat du

tampon d'éluion est inséré dans la membrane. Une seconde pince permet alors de fermer le sac à dialyse. Par la suite, ce dernier est placé dans un cylindre gradué de 2 L contenant le même nombre de litres de MOPS 50 mM, pH 7.5 et le tout est agité avec un barreau aimanté pour 12h à 4°C. Cette dernière étape est faite une seconde fois avec une deuxième solution fraîche de MOPS 50 mM afin de recueillir la protéine purifiée et adéquate pour la conservation. Les protéines sont alors conservées à -80°C. Fait à noter, les protéines ne se dénaturent pas lorsque conservées à cette température. Toutefois, elles seront mises en présence de guanidine lors de l'étude de complexion avec le fluorophore, afin de les dénaturer et ainsi exposer les cystéines au solvant.

En ce qui concerne la technique de centrifugation de type « centrifugal filter devices », il suffit de placer le contenu du filtrat du tampon d'éluion (4 mL) dans le tube à centrifugation (membrane poreuse à 10 000 Da) et de faire une centrifugation à 4°C / 3000 rpm / 20 min. Par la suite, 4 mL de tampon MES 25 mM pH 6.0 sont ajoutés et une autre centrifugation est réalisée dans les mêmes conditions. Le temps alloué de 20 min est arbitraire puisqu'il s'agit simplement de centrifuger jusqu'à ce qu'il ne reste qu'environ 500 µL à 1 mL de tampon. Quatre autres étapes de centrifugation devront être réalisées afin de s'assurer que tout le tampon d'éluion ait bien été remplacé par du MES. Lorsque toutes les étapes ont été effectuées, il s'agit de bien resuspendre avec une pipette afin de s'assurer de bien décoller les protéines qui pourraient être déposées sur le filtre et de conserver la partie non filtré. Il faut spécifier que les protéines Fos sont tellement stables qu'elles ont pu être conservées à 4°C plutôt qu'à -80°C sans en altérer les structures tridimensionnelles.

8.2.3. SDS-PAGE

Les gels SDS-PAGE pour les protéines Fos sont de 15 % d'acrylamide pour le « running gel » et de 4 % pour le stacking gel. Ainsi, deux solutions doivent être réalisées:

Le « running gel » consiste à faire une solution de 3.5mL d'acrylamide, 2mL de bisacrylamide 2 %, 2.5 mL de Tris-Cl 1.5 M pH 8.8, 100 μ L de SDS 10 %, 1.75 mL d'eau et 100 μ L d'APS 10 %. Pour sa part, le « stacking gel » est une solution de 750 μ L d'acrylamide, 390 μ L de bisacrylamide 2 %, 960 μ L de Tris-Cl 0.5M pH 6.8, 75 μ L de SDS 10 %, 6.25 mL d'eau et 75 μ L d'APS 10 %.

Lorsque les deux solutions sont préparées, le « running gel » peut être placé dans le montage immédiatement après l'ajout de 10 μ L de TEMED. Il faut ensuite mettre de l'alcool isopropylique à la surface afin d'éviter les bulles d'acrylamide, puis attendre 30 min pour que la polymérisation soit complète. Par la suite, l'alcool peut être retiré et le « stacking gel » peut être placé après l'ajout de 7.5 μ L de TEMED. Trente minutes plus tard, le gel pourra être submergé par du tampon Tris-glycine 1X et les échantillons protéiques pourront être déposés. Suite à l'insertion des échantillons (voir la préparation à la section 8.2.5), un voltage initial de 80 V est ajusté pour la migration. Par contre, lorsque l'échantillon atteint le niveau supérieur du « running gel », ce dernier peut être augmenté à 120 V. Un indicateur coloré permet de suivre le front d'élution et ainsi permet de savoir quand arrêter le voltage (l'indicateur bleu sera alors arrivé complètement en bas du « running gel »).

Une coloration pourra ensuite être réalisée. Cette dernière sera expliquée un peu plus loin, car une mise en garde importante doit être faite sur ce point (section 8.2.5 Conditions expérimentales pour une étude d'apposition protéique).

En ce qui concerne les gels d'acrylamide pour la protéine TRXC35A, les mêmes étapes ont été réalisées, mais nous avons plutôt utilisé un gel de 10 % d'acrylamide (cela fait cependant très peu de différence).

8.2.4. Quantification protéique (tests de Bradford et de Lowry)

Une quantification protéique de TRXC35A a été réalisée par le test de Bradford alors que la protéine Fos fut quantifiée par la méthode de Lowry.

Le test de Bradford implique de faire une courbe étalon à l'aide d'une solution d'IgG de concentration connue. La solution-mère de 1.43 mg/mL fut diluée afin d'obtenir plusieurs concentrations entre 50 et 500 µg/mL. Le colorant réactif contenant du bleu brillant de Coomassie fut dilué 4 fois et placé avec les dilutions préparées précédemment de façon à obtenir 200 µL d'une solution contenant 195 µL du réactif dilué et 5 µL d'IgG dilué. Le tout est laissé à la température de la pièce pour 5 minutes et une absorbance à 595 nm est mesurée afin de connaître la quantité de protéine qui correspond à l'intensité d'absorbance.

Par la suite, une série de dilution est réalisée sur l'échantillon protéique de concentration inconnue. Les mêmes étapes que pour l'IgG sont alors effectuées et une corrélation peut être établie entre la coloration (absorbance) de l'échantillon protéique et la concentration de celui-ci grâce à la courbe d'étalonnage pré-établie.

En ce qui concerne le test de Lowry, il s'agit encore de faire une courbe étalon, mais cette fois avec du BSA (bovin serum albumine). Ainsi, une dilution est effectuée utilisant 5, 10, 15, 20 et 25 µL de solution initiale de 1,0 mg/mL. Par la suite, il faut ajouter de l'eau millipore afin d'obtenir un volume final de 25 µL. Finalement, 125 µL de solution A (Na_2CO_3 2 % dans du NaOH 0.1 M, sodium L-tartrate dihydraté 2 % dans l'eau et CuSO_4 1 % dans l'eau) et 1 mL de solution B (réactif Folin-Ciocalteu (phénol) 1 N) sont ajoutés. Les solutions résultantes sont laissées à la température de la pièce pour 15 min. Une absorbance peut alors être prise afin de tracer la courbe étalon. Les mêmes étapes sont reprises pour l'échantillon à quantifier en utilisant 10 et 15 µL. Une corrélation peut ici aussi être faite à l'aide de la courbe d'étalonnage afin de déterminer la concentration protéique de l'échantillon.

8.2.5. Conditions expérimentales pour une étude d'apposition protéique

Puisque les tests se font souvent dans un mélange H₂O/DMSO, il faut tout d'abord préparer une dilution dans le tampon protéique de la protéine désirée (MOPS pour TRXC35A ou MES pour Fos). Par contre, il faut prendre soin de faire en sorte que la concentration soit 1.11 fois plus concentrée dans l'eau que la concentration finale désirée (puisque le DMSO qui sera ajouté aura pour effet de diluer la protéine). Par analogie, le fluorogène sera solubilisé dans le DMSO 10 fois plus concentré que ce que doit être la concentration finale. Si ce dernier ne se solubilise pas (surtout pour le composé **2**, il faut chauffer très légèrement. Par la suite, la solution aqueuse tamponnée est lentement ajoutée au DMSO afin de le diluer graduellement. La réaction fluorogène-protéine peut alors avoir lieu. Cette réaction est laissée à la température de la pièce pour une durée variable de 3 h à 18 h (cela semble faire très peu de différence).

Lorsque la réaction est terminée, les échantillons (prélèvement en général de 15 µL) peuvent être analysés par SDS-PAGE. Toutefois, il ne faut pas ajouter de colorant bleu. Cette étape est extrêmement importante, car si elle n'est pas respectée, aucune fluorescence ne pourra être observée en U.V. Ainsi, seulement un mélange H₂O/glycérol 1:1 (7 µL) sera ajouté à la solution. Par contre, le marqueur possède du bleu et c'est ce dernier qui servira d'indicateur de migration. Afin de minimiser tout risque de contamination, un puits devra demeurer libre entre les échantillons et le marqueur.

Lorsque le gel est terminé, il ne faut pas faire immédiatement de coloration, mais plutôt prendre une photographie du gel sous U.V. Ce n'est qu'une fois cette étape terminée qu'une coloration au bleu de Coomassie peut être effectuée, puis décolorée avec une solution de MeOH/acide acétique.

8.2.6. Isolation d'un plasmide et préparation d'un gel d'agarose

Une fois l'amplification bactérienne réalisée (et donc du plasmide par la même occasion), la suite des étapes consiste à isoler ce plasmide. Pour ce faire, il existe deux méthodes¹⁰⁸, celle par « Q1 Aprep Spin Miniprep Kit Protocol » ou encore celle utilisant des solutions préparées en laboratoire.

8.2.6.1. Isolation d'un plasmide par kit Qiagen mini-prep.

Les étapes ont été suivies en tous points selon le protocole fourni par Qiagen : les 3 mL de bactéries amplifiées sont centrifugées à 14 000 rpm pour 30 secondes et le surnageant est alors jeté afin de ne conserver que le culot. Une solution P1 (250 mL) (Tampon de suspension, contient de la RNase) et une solution P2 (250 mL) (contient du NaOH) ont ensuite été ajoutées successivement et agitées doucement par inversion (6 fois). Par la suite, il faut ajouter 350 mL d'une solution N3 (contient de la guanidine HCl et de l'acide acétique) et agiter immédiatement (mais toujours doucement par 6 inversions). La suspension est alors centrifugée pendant 10 minutes à 14 000 rpm et le surnageant est placé dans une colonne Q1 Aprep. Il est à noter que seul le surnageant doit être gardé. Ainsi, s'il reste un peu de culot, une seconde centrifugation peut s'avérer nécessaire. Le surnageant est ainsi placé sur le filtre qui retiendra l'ADN après une centrifugation (14 000 rpm / 30 secondes). Le surnageant est jeté et un premier lavage avec 500 µL de tampon PB (contient de la guanidine HCl et de l'isopropanol) suivi d'un second avec 750 µL de tampon PE (tampon de lavage contenant de l'éthanol) peuvent ensuite être réalisés. Dans tous ces cas, une centrifugation (14000 rpm / 30 secondes) est requise. Par la suite, une dernière centrifugation est réalisée à vide afin de se débarrasser des traces de tampons résiduels. Ainsi, l'ADN purifié peut être récupéré en plaçant 50 µL de tampon LB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) et en faisant une centrifugation finale. Fait à noter, il est important de laisser une minute entre l'ajout de tampon LB et l'étape de centrifugation pour avoir de bons rendements. Le surnageant est alors conservé et

possède en moyenne 100 ng/ μ L.

8.2.6.2. Isolation d'un plasmide à l'aide de diverses solutions (méthode plus longue)

Les 3 mL de bactéries amplifiées sont centrifugées à 14 000 rpm pour 30 secondes et le surnageant est alors jeté afin de ne conserver que le culot. Par la suite, 200 μ L de solution 1 froide (4°C) (50 mM glucose, 25 mM tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA) est utilisé afin de resuspendre le culot et une incubation de 5 min. à la température de la pièce est alors réalisée. Après ce temps, 400 μ L de solution 2 (SDS 10 %, NaOH 0.2 N) sont ajoutés et mélangés par inversion, puis la solution résultante est placée sur glace pour 5 min. L'étape suivante consiste à ajouter 300 μ L de NaOAc 3 M (pH 4.8) en prenant soin de mélanger par inversion et de laisser sur glace pour 5 min. Une centrifugation est réalisée à 4°C (14 000 rpm) et le surnageant est conservé. À ce dernier, 290 μ L de PEG (8000) 40 % sont ajoutés, puis mélangés par inversion. Cette fois, une incubation de 10 min. est requise. Suite à ce délai, une autre centrifugation de 15min est réalisée (mêmes conditions) et le surnageant est jeté. Le culot est alors dissous dans 200 μ L d'eau (placé 5 min. à 37°C), puis 200 μ L de LiCl 5.5M à 4° C sont ajoutés. Le tout doit être placé sur glace pour 10 min. Une centrifugation de 15 min est ensuite effectuée (mêmes conditions) et le surnageant est conservé. Par la suite, 1 mL d'éthanol froid (-20°C) est ajouté au surnageant et le tout est placé 10 min à -20°C. Ensuite, une centrifugation est effectuée et le surnageant est jeté. Le culot peut alors être lavé (très délicatement par inversion) avec 500 μ L d'éthanol 70 % froid (-20°C). Le culot est ensuite séché et resuspendu dans 30 μ L d'eau ou de tampon (placé 5 min à 37°C).

8.2.7. PCR pour séquençage et pour la préparation du mégaprimer

La PCR est une technique d'amplification d'ADN. Elle permet ainsi d'amplifier un gène, pouvant être utilisé pour faire un sous-clonage ou une mutagenèse, mais également pour faire un séquençage. Ce dernier consiste à arrêter de manière aléatoire l'amplification d'ADN afin de connaître la séquence.

8.2.7.1. PCR pour séquençage

Le séquençage a été fait deux fois, une première avec l'amorce directe et une seconde fois avec l'amorce inverse. Ainsi, 2 μL d'ADN (résultat de la miniprep) ont été placés en présence de 1 μL d'amorce, de 1 μL de tampon de séquençage, de 0.5 μL de dNTP (2.5 mM), de 3 μL d'eau et de 1 μL de DNA polymérase (à ajouter en dernier). Par la suite, 2 μL de cette solution doivent être placés dans quatre tubes à séquençage identifiés respectivement A, C, G et T. À chacun de ces tubes est ajouté le didéoxynucléotide correspondant. Ainsi, dans le tube A, 1 μL de ddATP est ajouté. Dans le tube C est ajouté 1 μL de ddCTP etc. Lorsque cette étape est complétée, les tubes sont placés dans l'appareil à PCR (2 min à 92°C), puis 30 cycles (92°C pour 30 secondes, 56°C pour 1 min, 72°C pour 1 min) la dernière cyclisation se réalise avec 3 minutes supplémentaires à 72°C). La dernière étape avant de mettre l'échantillon sur gel d'acrylamide est de mettre 1.5 μL de stop afin d'arrêter la réaction. Par le fait même, un fluorophore sera fusionné aux fragments et permettra la visualisation des bandes.

8.2.7.2. PCR pour la préparation du mégaprimer

La PCR pour faire le mégaprimer et éventuellement l'ADN mutée qui code pour diCys-Fos implique de faire d'abord la solution suivante: 5 μL de DMSO, 2 μL de dNTP (10mM), 3 μL de MgSO_4 (1 mM / μL), 2 μL (1 nmol) de chacune des

amorces, soit celle du début de gène (5'-CACACAGGATCCACGGTCGTGCGCA-3') ainsi que l'amorce centrale portant la mutation (5'-GGTTTCCGCCTG GAGGGTGTCTGGTACATTACG ACGGCAGT-3'), 1.5 µL d'ADN (résultat de la miniprep) du gène initial, 0.5 µL de Vent polymérase, 10 µL de tampon thermopol (10x) ainsi que 74 µL d'eau. Le tout est placé dans l'appareil à PCR à différentes températures. (les conditions sont les mêmes que celles décrites pour le séquençage, mais un gradient de température est utilisé (à la place d'une température fixe à 56°C) passant de 50°C à 60°C).

Suite à la préparation du mégaprimé, celui-ci pourra être identifié sur gel d'agarose, puis purifié tel que décrit plus haut. Par la suite, la deuxième et dernière étape de la mutagenèse peut être réalisée grâce à une deuxième PCR impliquant le mégaprimé (la totalité recueillie) soit 36 µL. Elle implique également une dernière amorce de fin de gène soit l'amorce 5'-CACACAAAGCTTGTTAACCCAGGTC-3'.

8.2.8. Sous-clonage de mCysFos-pDS56 à mCysFos-pQE32

Tel que décrit au chapitre 5, le sous-clonage se réalise en plusieurs étapes c'est-à-dire une digestion enzymatique, une purification sur gel d'agarose et une ligation de l'insert et du nouveau plasmide.

8.2.8.1. Digestion enzymatique

Une digestion enzymatique se réalise par la mise en commun de 10 µL d'ADN (résultat de la miniprep), d'un tampon adéquat pour les deux enzymes (ici, le tampon NEB2) ainsi que des deux enzymes de restriction (ici, BamH1 et HindIII). Cette solution doit être laissée pour une heure à 37°C puis 0.5 µL de chacune des enzymes est alors ajoutée à toutes les heures pour une durée totale de 3 h. La digestion est alors terminée et une purification du brin d'ADN peut être réalisée. Fait à noter, la même digestion devra être réalisée sur le plasmide d'intérêt afin de pouvoir créer le

plasmide recombinant.

8.2.8.2. Purification d'ADN par gel d'agarose

Une fois la migration sur gel d'agarose réalisée, ce dernier sera coupé à l'endroit spécifique où l'ADN de l'insert est présent (et du plasmide d'intérêt). Pour chaque 100 mg d'agarose, 300 μL de tampon QX1 (Tampon de solubilisation contenant un indicateur de pH) sont ajoutés. Une fois cette étape terminée, 10 μL de billes de type QIAEXII préalablement vortexées sont ajoutés, suivi d'une incubation à 50°C pour 10 min (avec trois inversions à chaque deux minutes). Par la suite, une centrifugation de 30 secondes est réalisée à 4000 rpm et le surnageant est jeté. Les billes sont ensuite lavées avec 500 μL de tampon QX1 puis deux fois avec du tampon PE (Tampon de lavage contenant de l'éthanol). Le lavage est constitué d'une resuspension dans le tampon en question, d'une centrifugation (30 secondes, 4000 rpm) puis de l'isolation des billes en jetant le surnageant. Lorsque les lavages sont terminés, les billes sont mises à sécher à 50°C, puis 20 μL de tampon 10 mM Tris-Cl pH 8.5 sont ajoutés. La solution résultante est placée à 37°C pour 10 min après une resuspension. Une centrifugation est ensuite réalisée et le surnageant est récupéré. Un autre 20 μL de tampon Tris-Cl sont ajoutés et les dernières étapes sont refaites pour obtenir un volume total de 40 μL d'insert (et de plasmide puisque les mêmes étapes devront être faites sur le plasmide d'intérêt).

8.2.8.3. Ligation

La ligation consiste à mettre 15 μL d'ADN digéré et de plasmide dans 3 μL de tampon pour ligase. Par la suite, 1.5 μL de ligase peuvent être ajoutés et le tout est laissé à la température de la pièce pour une durée totale de 1 h 30. Ainsi, cette solution pourra être directement mise en présence de cellules compétentes et subir un choc thermique afin de créer des cellules capables d'exprimer le plasmide recombinant.

8.2.9. Séquençage (préparation du gel d'acrylamide) et PCR

Les gels d'acrylamide pour le séquençage sont composés d'acrylamide (30 mL, 5.5 %), de TEMED (20 μ L) et d'APS (200 μ L). Il est à noter que l'APS doit être ajouté seulement avant de placer la solution dans les vitres utilisées à cet effet.

Le séquençage à ensuite été réalisé selon la même technique que pour la PCR et les amorces utilisées ont été:

- 1- pQE-1: CGGATAACAATTTACACAG
- 2- pQE32-inverse: GTTCTGAGGTCATTACTGG

Annexe

La figure ci-bas nous démontre l'opérateur constitutif O ($lac-O$), le site accepteur du répresseur. Ce dernier, une fois lié, est capable de bloquer la production de trois gènes soit le gène codant pour la β -galactosidase, celui codant pour la galactoside perméase et celui pour la thiogalactoside transacétylase. Tous ces gènes sont sous le contrôle d'un même promoteur et forment l'opéron lac . Dans la nature, l'opéron est utilisé pour dégrader le lactose. Lorsque le sucre est présent dans le milieu, les trois enzymes doivent être exprimées afin de pouvoir le dégrader et donc l'utiliser comme nutriment. Il va de soi que l'expression des trois enzymes serait inutile sans la présence du lactose. Ainsi, l'opéron demeure toujours inhibé en absence de galactose afin de minimiser les efforts d'expression fortuite. Cette série de gènes est finalement précédée du gène $lac-i$ (inductibilité) qui code pour une protéine répressive du gène lac . En absence de l'inducteur, le répresseur du gène lac est lié à l'opérateur $lac-O$ de façon à bloquer la transcription par l'ARN polymérase (voir figure 5.3). Par opposition, la présence du lactose ou d'un analogue structural (IPTG) peut se lier au répresseur et ainsi libérer l'opérateur pour permettre la transcription.

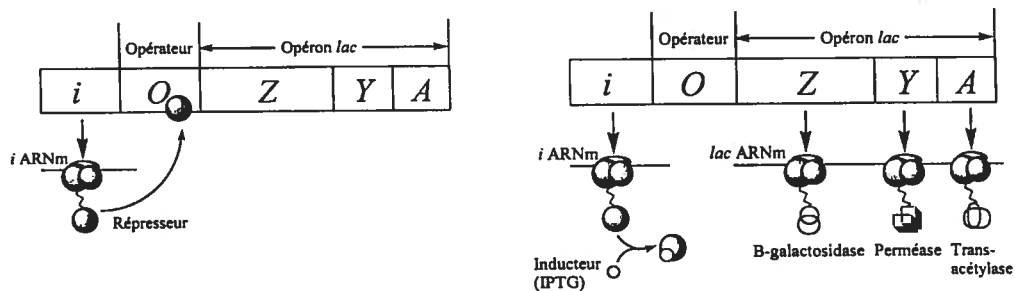


Schéma de l'induction de l'expression de l'opéron lac par l'IPTG.

Gavroche: Survol de la civilisation française

Politique - La Guerre de 100 Ans

Projet semestriel I, de Jennifer Labowski

(FRE 6450 -- Hiver 1999)

La Peste Noire: Les Effets Sur La Société Européenne

<u>L'Origine</u>	<u>Médecine- Remèdes</u>	<u>Effets: Art/Culture</u>	<u>Effets: Education</u>
<u>Effets: Religion</u>	<u>Effets: Economie</u>	<u>Effets: Société</u>	*****

Au quatorzième siècle, un des plus grands bouleversements de la vie de l'homme est arrivé en Europe caché dans le sang des rats. Personne ne s'y attendait; personne ne pouvait l'imaginer. Mais devant leurs yeux terrifiés, la peste noire s'est réalisée. Une société n'est pas une entité simple, au contraire, elle est complexe et comprise de plusieurs parties, comme, par exemple, la culture, l'éducation, l'économie, la religion et la vie quotidienne. La peste noire s'est infiltrée dans chaque division de la vie à l'époque.

L'Origine

Les premiers rapports de la peste noire sont venus de Messina, un port en Italie. Les bateaux ont emporté la maladie d'autres pays aux grandes villes en Europe. Les grandes villes ont été ravagées parce qu'elles ont directement reçu les produits emportés par ces marins infectés. Avec ces produits venaient des rats avec les puces qui portaient la peste noire. Les puces ont mordu les rats et les ont infectés. Les rats transportaient les puces partout dans les villes, et comme il n'y avait pas de poubelles à l'époque et le garbage était partout dans les rues, les rats et les puces aussi étaient partout. Les puces ont mordu les gens, et, c'est dans l'endroit exact de la morsure que la personne a développé un furoncle douloureux. C'est de ce furoncle qui s'appellait un «bubons» qu'on trouve l'origine du mot «bubonique». Ceux qui ont attrapé cette maladie ont perdu très vite leurs vies. Avant cinq jours la victime était morte.

Au moment de l'arrivée, l'Europe n'était pas dans un état normal. La Guerre de Cent Ans a commencé en 1337, à peu près 10 ans avant le début de son cette maladie effrayante. Cela veut dire que déjà quelques pays, comme la France et l'Angleterre, n'étaient pas du tout préparés pour une dévasation complète comme la peste noire. Il n'y avait pas de nourriture et certains endroits étaient déjà en train de mourir de faim. Les gens n'avaient pas un moyen de fuir quand la maladie est arrivée et, donc, ils sont restés et sont morts. En plus, la plupart de la population de ces villes était composé des gens pauvres. Or, il est juste que la peste noire n'a pas discriminé entre les riches et les pauvres, mais, comme les gens riches avait de l'argent pour «échapper» en Provence, ils en ont profité, mais les gens pauvres n'avait rien et ceux qui sont restés dans les villes ont souffert le plus. Mais, comme la peste s'étendait si vite, mêmes les riches, qui se croyaient hors de danger, emportaient avec eux la maladie responsable pour la mort d'un tier de la population.

Dans seulement cinq ans, la peste noire a pris 25 millions de vies. La peste a tué vite, mais elle est restée longtemps parce que vraiment elle n'est pas complètement partie. Elle venait et revenait plusieurs fois. Il est dit qu'il y avait un «niño» au début de la peste, et à cause de cet hiver doux, la bactérie qui causait la

peste n'a pas été tuée. Donc, après deux ou trois fois les gens ont commencé à croire que la fin du monde était proche. Ils croyaient que Dieu l'a renvoyée encore et encore pour tuer les gens qu'il a oublié. Les gens ont décidé de ne plus fuir et c'est peut-être pourquoi la peste noire a cessé de s'étendre.

[Top](#)

La Médecine Et Les Remèdes

La peste noire n'est jamais vraiment partie. Elle existe toujours, surtout dans les endroits isolés, mais, aujourd'hui les antibiotiques nécessaires pour guérir la bactérie existent aussi si la personne infectée a le temps de trouver l'aide. Après une fois guérie de la peste, la personne devient immunisé contre la maladie. Malheureusement, à l'époque, la science de la médecine n'était pas aussi développée. Mais, cela n'était pas le seul problème, les médecins qui sont restés pour aider les malades ont eux-mêmes succombé à la mort de la peste noire. Dans la ville de Perpignan au sud de la France près de l'Espagne, de neuf médecins, seulement un a survécu. Ils n'ont pas compris d'où venait cette maladie (en fait, l'origine n'a pas été découverte jusqu'à 1890, presque 550 ans après la peste noire a commencé en Europe). Surtout, ils ne savaient pas comment la combattre. Il y avait des médecins qui ont utilisé la médecine homéopathique, croyant que la peste s'étendait à travers l'odeur. Ils ont fait des petits bouquets des herbes médicinales comme la menthe (qui avait une odeur forte) et les portaient au-dessous de leurs nez. Cela n'a pas marché. Il y avait des autres qui s'appelaient des «flagellants» que se torturaient en public, essayant de montrer à Dieu qu'ils ont déjà assez souffert et ne méritaient pas être punis davantage avec la peste noire. Ils n'étaient pas tellement aimés comme ils tuaient tous ceux qui étaient en opposition à leurs méthodes. Ce groupe de presque 10,000 personnes ont traversé l'Europe pour montrer aux autres qu'ils devaient exprimer leur fidélité à Dieu, mais cela n'a pas marché non plus. Le pape est resté isolé entre deux cheminées allumées même dans la chaleur de l'été. Il a survécu, mais cela peut aussi être parce qu'il était isolé des malades et de la peste noire.

[Top](#)

Effets Sur L'Art et La Culture

Comme la peste noire était responsable de la mort d'un tiers de la population, toutes les professions étaient touchées. Les artistes ont transmis leurs sentiments à travers leurs oeuvres et un nouveau style de peinture a développé: la danse macabre. Il y avait des éléments pleins de répétitions dans ces exemples: les squelettes parmi les hommes, la tristesse dans les couleurs, les personnages et partout, la mort. Quelques exemples des images sont Heures de Rohan et Momento Mori, deux peintures qui montrent l'image du conflit entre la vie et la mort de la danse macabre.

Les écrivains qui ont commencé leurs livres avant l'arrivée de la peste noire les ont laissés incomplets, les livres sans fin. Cette maladie aussi a marqué effectivement la fin des livres écrits en latin.

[Top](#)

L'Education

L'éducation aussi a beaucoup souffert. La plupart des professeurs aussi sont morts de la peste noire. Pendant l'épidémie, les étudiants et les professeurs ont fui et abandonné les écoles et les universités. Après l'épidémie, quand ils ont commencé à voir la réalité des effets de la peste noire, ils ont trouvé qu'il n'y avait presque personne pour enseigner les étudiants. Donc, ils ont choisi des gens non-qualifiés et leur ont demandé d'enseigner dans les écoles primaires. Les professeurs des écoles primaires

enseignaient aux universités. L'effet était que quand les étudiants arrivaient au niveau universitaire, ils n'étaient pas préparés. Ils ne savent pas lire ou parler latin, la langue de l'académie. Les professeurs ont du enseigner leurs cours en français, la langue du peuple.

Top

La Religion

La religion aussi était infectée de la peste noire dans le sens que les gens ont commencé à croire que Dieu ne les aimait plus. Les prêtres ont commencé à mourir quand ils restaient avec les malades pour les aider. Il n'y avait plus de messes, plus de confessions. Dans quelques cas, le peuple n'avait plus d'église comme le clergé, essayant de se sauver la vie, ont fermé les portes de l'église, refusant d'aider les malades et de les permettre entrer. Même le pape a refusé à voir son peuple.

Top

L'Économie

Un autre aspect de la vie qui a été touché par la peste noire était l'économie. Personne ne voulait sortir de leur maison. Beaucoup de gens qui avait le moyen de le faire ont fui de la ville et sont allés en campagne, loin de la calamité. Les marchands n'avaient plus personne pour acheter ce qu'ils avait toujours dans leurs magasins. Un autre problème était que les bateaux qui ont emporté la maladie ont été refusés aux ports et il n'y avait pas beaucoup de choses à vendre. Les prix étaient énormes. Il y avait si peu de gens qui restaient qu'il fallait un contrat dans la ville de Paris pour forcer les gens qui demandaient trop d'argent pour travailler. Les gens ont révolté. La société civile n'existait plus.

Top

L'Effet Sur La Société

Comme on peut voir, il n'y a pas une seule partie de la société européenne qui n'a pas été touchée. L'Europe n'a pas réussi à atteindre la population "peste noire" jusqu'au 17e siècle. Il est difficile d'imaginer la peur du peuple qui a survécu ce qu'il croyait la fin du monde et de regarder avec horreur le destin de leurs familles, leurs amis et même leurs ennemis. Personne ne savait ce qui l'a causée jusqu'au 19e siècle. L'effet sur la société était si grand qu'elle avait changé la vie des européens pour toujours. À la fin de cette épidémie une sur trois personnes est morte.

Top

Return

Peste noire

Un article de Wikipédia, l'encyclopédie libre.

La **peste noire** est une pandémie de peste bubonique qui a affecté toute l'Europe entre 1346 et 1350.

Beaucoup de détails restent inconnus sur cette épidémie. On estime qu'elle est la cause de la mort d'un tiers de la population européenne.

Sommaire

- 1 Histoire
- 2 Voir aussi
 - 2.1 Articles connexes
 - 2.2 Sur le Web

Histoire

La peste noire vient de l'Asie Centrale. Cette région était alors dominée par les Mongols. Ces derniers attaquent en 1346 la ville de Caffa (actuellement située en Ukraine) et établissent son siège. On dit que les Mongols auraient catapulté les corps de leurs soldats morts de la peste, ce qui aurait contaminé les habitants de la ville.

A la fin du siècle, en 1347, les bateaux quittant la ville transmettent la peste à tous les ports où ils s'arrêtent. Constantinople, plusieurs villes italiennes et Marseille sont les premières villes touchées. En un an, tout le pourtour méditerranéen est touché.

L'infection s'étend ensuite à toute l'Europe en quelques années.

La peste cause d'importants troubles sociaux, économiques et religieux :



Des danses macabres sont organisées, où la mort est représentée.

Les tableaux retranscrivent cet univers morbide où la mort est omniprésente sous la forme des faucheuses.

Des groupes de flagellants se forment et tentent d'expié leurs péchés avant l'Apocalypse, car ils pensent que la peste n'est qu'un signe annonciateur.

Les juifs, les gitans, « gens du voyage » et une autre population généralement connue sous le nom de cagots, rendus coupables par la population qui pense qu'ils empoisonnent les puits, seront persécutés malgré la protection du Pape Clément VI. À titre d'exemple, 900 juifs seront brûlés vivants à Strasbourg le 14 février 1349, d'autres seront jetés dans la Vienne à Chinon.

Les villes se désertifient les unes après les autres, la médecine de l'époque n'ayant ni les connaissances ni les capacités de juguler les épidémies.

La main d'oeuvre vient à manquer et son coût augmente, en particulier dans l'agriculture. De nombreuses cultures sont abandonnées et la forêt se

Médecin en 1656 avec son masque caractéristique de l'époque de la peste. Le long bec renfermait des épices pour atténuer l'odeur des cadavres.

développe.

La peste s'établit durablement en Europe et elle ressurgira plusieurs fois au cours de l'Histoire, jusqu'à la dernière épidémie de grande ampleur à Marseille durant les années 1720 à 1722.

Voir aussi

Articles connexes

- Grippe espagnole
- Choléra
- Liste des épidémies de peste
- La Faucheuse

Sur le Web

- L'Europe du Moyen Age : la peste (<http://perso.club-internet.fr/mboullic/peste.htm>)
- La peste de 1348 sur le site histgeo.com (<http://www.histgeo.com/medievale/peste.html>)



Portail Médecine - Accédez à la série des articles de Wikipédia concernant la médecine.

Récupérée de « http://fr.wikipedia.org/wiki/Peste_noire »

Catégories: Maladie bactérienne

- Dernière modification de cette page le 28 août 2005 à 19:30.
- Contenu disponible sous GNU Free Documentation License.



My Cart | Quick Order | My Account | Log In

Search

[Home](#) [Applications](#) [Products & Services](#) [Order](#) [Support](#) [About/Jobs](#)

Search

Enter a search term

Enter a search term	<input type="text" value="pQE-32"/>	Search
Pick a web site section	<input type="text" value="Entire Site"/>	
Results per page	<input type="text" value="10"/>	

For help, see our [Search Tips](#). You can also view our product list or return to the [homepage](#).

Refine your search

- Entire Site**
- Product Guide (**
- [Applications \(0\)](#)
- [Investor Relations](#)
- [FAQs \(0\)](#)
- [MSDS \(0\)](#)
- Literature (22)**
- Citations (2)**
- QIAGEN News (**

Search results

Results 1-10 of ap

1. [\[PDF\] pQE-30, pQE-31, and pQE-32 Vectors Positions of elements in bases ...](#)
 ... t 0 GGATCCGCATGCGAGCTCGGTACCCCGGGTTCGACCTGCAGCCAAGCTT.AATTAGCTGAG G Eco RI/RBS 6x
 ATG AGAGGATCT RGS·His epitope pQE-30, pQE-31, and **pQE-32** Vectors Positions ...
<http://www1.qiagen.com/literature/pqesequences/pqe3x.pdf>

2. [QIAGEN - N-Terminus pQE Vector Set - For high-level expression of ...](#)
 ... Vectors included: pQE-9, pQE-30, pQE-31, **pQE-32**, and pQE-40. ... N-Terminus pQE Vector
 Set, 25 ug each: pQE-9, pQE-30, pQE-31, **pQE-32**, pQE-40, 32915, N/A*. ...
<http://www1.qiagen.com/Products/Protein/Expression/QIAexpressExpressionSystem/N-terminuspQEVectorSet.aspx?ShowInfo=1>

3. [\[PDF\] QIAexpress The Complete System for 6xHis Technology](#)
 ... Buffers, Collection Tubes, 31314 1 µg Control Expression Plasmid QIAexpress Kits
 QIAexpress Type IV Kit 5 µg each: pQE-30, pQE-31, **pQE-32** (N-terminal 6xHis ...
http://www1.qiagen.com/literature/brochures/1011169_QXP_BRO_062000/1011169_QXP_BRO_062000p27_30-31.pdf

4. [\[PDF\] QIAexpress The Complete System for 6xHis Technology](#)
 ... The pQE-30 series (pQE-30, pQE-31, and **pQE-32**) provides the multiple cloning site
 in all three reading frames, while pQE-9 has an alternative, shorter multiple ...
http://www1.qiagen.com/literature/brochures/1011169_QXP_BRO_062000/1011169_QXP_BRO_062000.pdf

5. [\[PDF\] QIAexpress The 6xHis Tag One Tag for All Protein ...](#)
 ... Buffers, Collection Tubes, 31314 1 µg Control Expression Plasmid QIAexpress Kits
 QIAexpress Type IV Kit 5 µg each: pQE-30, pQE-31, **pQE-32** (N-terminal 6xHis ...
http://www1.qiagen.com/literature/brochures/qxp/1011171_QXP_BRO_6xHis_0301.pdf

6. [\[PDF\] QIAexpress Ni-NTA Technology for Reliable 6xHis-tagged Protein ...](#)
 ... 24 TurboFilter 96 Plates, 1 x 100 ml and 2 x 25 ml Ni-NTA Superflow QIAexpress Kits
 QIAexpress Type IV Kit 5 µg each: pQE-30, pQE-31, **pQE-32** (N-terminal 6xHis ...
http://www1.qiagen.com/literature/brochures/qxp/1011170_QXP_BRO_IDA_0301.pdf

- 7. [QIAGEN - Literature](#)
 ... TAGZyme pQE-1. TAGZyme pQE-2. pQE-9. pQE-16. pQE-30. pQE-30 UA. pQE-30 Xa. pQE-31. **pQE-32**. pQE-40. pQE-60. pQE-70. pQE-80L. pQE-81L. pQE-82L. pQE-100DoubleTag. pQE-TriSystem. ...
http://www1.qiagen.com/literature/vectors_pqe.aspx

- 8. [QIAGEN - N-Terminus pQE Vector Set - For high-level expression of ...](#)
 ... Add to Cart? Name, Details, Cat. No. List Price, Your Price. N-Terminus pQE Vector Set, 25 ug each: pQE-9, pQE-30, pQE-31, **pQE-32**, pQE-40, 32915, N/A*. ...
<http://www1.qiagen.com/Products/Protein/Expression/QIAexpressExpressionSystem/N-terminuspQEVectorSet.aspx>

- 9. [QIAGEN - QIAexpress Type IV Kit - For high-level expression and ...](#)
 ... No. List Price, Your Price. QIAexpress Type IV Kit, 5 ug each: pQE-30, pQE-31, **pQE-32** (N-terminal 6xHis); 10 ml Ni-NTA Agarose, 32149, N/A*. ...
<http://www1.qiagen.com/Products/Protein/Expression/QIAexpressExpressionSystem/QIAexpressTypeIVKit.aspx>

- 10. [QIAGEN Citations - Display Citation](#)
 ... The cDNA for human dihydroorotate dehydrogenase was cloned into **pQE-32**, and the resultant recombinant protein was expressed in E. coli M15 [pREP4], and ...
http://www1.qiagen.com/RefDB/result_single.asp?guid=b8268488-ae40-11d4-91f5-00600842e2d2

N



Canada (QIAGEN Inc.) Ordering: 800-572-9613 | Technical: 800-DNA-PREP (800-362-7737)

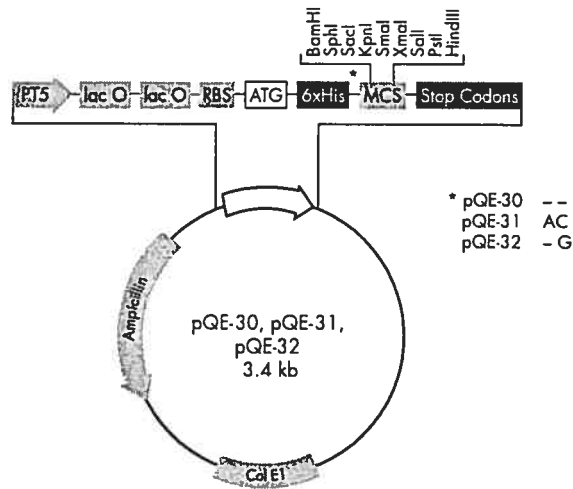
Sub News

© QIAGEN 2003 - 2005. All ri

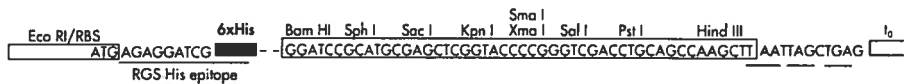
[Site Map](#) | [Contact Webmaster](#) | [Trademarks & Disclaimers](#) | [Privacy Policy](#) | [Change Country](#) | [日本語で](#)

pQE-30, pQE-31, and pQE-32 Vectors

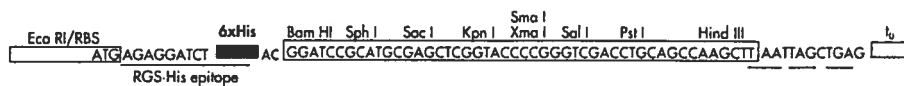
Positions of elements in bases	pQE-30	pQE-31	pQE-32
Vector size (bp)	3461	3463	3462
Start of numbering at <i>Xho</i> I (CTCGAG)	1-6	1-6	1-6
T5 promoter/lac operator element	7-87	7-87	7-87
T5 transcription start	61	61	61
6xHis-tag coding sequence	127-144	127-144	127-144
Multiple cloning site	145-192	147-194	146-193
Lambda <i>t_o</i> transcriptional termination region	208-302	210-304	209-303
<i>rnnB</i> T1 transcriptional termination region	1064-1162	1066-1164	1065-1163
ColE1 origin of replication	1638	1640	1639
β -lactamase coding sequence	3256-2396	3258-2398	3257-2397



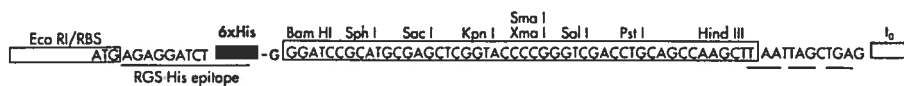
pQE-30



pQE-31



pQE-32



WELCOME TO PBIL LYON-GERLAND !

The PBIL-IBCP Lyon-Gerland is the protein part of the Pôle BioInformatique Lyonnais. The PBIL was created in January 1998 in collaboration with Dr. M.Gouy's team. The PBIL Lyon-Gerland, located at the Institute of Biology and Chemistry of Proteins (IBCP UMR 5086), is developing :

- Several methods dedicated to protein secondary structure prediction
- Detection of fuzzy motifs in protein sequences
- Automatic molecular modeling tools (Geno3D)
- Protein sequence analysis software (ANTHEPROT, MPSA)
- Hepatitis C virus database (HCVDB)
- Integrated Webware (NPS@)
- Search Algorithm for searching similar 3D sites in protein structures (SuMo)
- "GRIDification" of bioinformatics tools

The bioinformatics activities in Région-Rhône Alpes has been funded by a contractual plan ("Plan Etat-Région" or CPER). This CPER associates 3 laboratories:

- Equipe de Bioinformatique et Génomique Evolutive resp. M. Gouy [PBIL-BBE] (UMR 5558 Dir. C. GAUTIER)
- Equipe de Bioinformatique et RMN structurales resp. G. Deléage [PBIL-IBCP] (UMR 5086 Dir. AJ COZZONE)
- Equipe Helix resp. F. Reichenman (INRIA Rhône-Alpes)

The main goal of this CPER was to create a "centre" able to play a significant role at both the national and international levels. Two building expansions were planned for the PBIL (Pôle Bioinformatique Lyonnais).

For PBIL-IBCP (representing the upper floor of the IBCP new status, the expansion has been achieved in october 2003.

METHODS

- [ASCE] : Automatic Structural Core Extraction
- [CAAM3D] Conservation of AA in Alignment and 3D interaction
- [IMAPSS] Improving Multiple Alignment by using Prediction of Secondary Structure
- [SuMo] Search for similar 3D sites in protein structures Collaboration with [CERMAV] Grenoble ⁴
- [Geno3D] Suite for molecular modeling of proteins
- [PROCSS] A method to validate homology relationships at low identity level.
- [NPS@] Integration of bioinformatics tools into [PBIL]
- [MLRC] Multivariate Linear Regression Combination Collaboration with [LIP6]
- [PROSCAN] Scan a sequence versus the PROSITE dictionary
- [PATTINPROT] PATterns IN PROTEins
- [SOPMA] Self optimised Prediction Method
- [SOPM] Self optimised Prediction Method
- [DPM] Double prediction Method

Médiagraphie

-
- ¹ Prescott, Harley, Klein. *Microbiologie*, De Boeck Université, **1995**
- ² Quersin-Thir, L. *Rev. Med. Brux.* **1953**, 33, 2599
- ³ Blanc, G.; Martin, M. A. *Rev. Hyg. Med. Soc.* **1953**, 1, 607
- ⁴ Lassen, H. C. *Presse Med.* **1953**, 61, 1667
- ⁵ Dantinger, F.; Loyer, B. *Égypte M. A.* Éditions, Paris **1989**
- ⁶ Erman, A.; Ranke, H. *La civilisation égyptienne*, imprimé en France, **1990**
- ⁷ Castagnoli, F. *Orthogonal town planning in antiquity* Cambridge Mass, MIT Press **1971**
- ⁸ Siegel, R. E. *Bull. His. Med.* **1959**, 33, 145
- ⁹ Tourney, G. *Bull. His. Med.* **1956**, 30, 109
- ¹⁰ Nill, M. *Morality and self-interest in Protagoras, Antiphon and Democritus* Leiden: E. J. Brill, **1985**
- ¹¹ Ponnier, J. *Différence de la philosophie de la nature chez Démocrite et Épicure* Bordeaux: Edition Ducros, **1970**
- ¹² Nizan, P. *Les matérialistes de l'antiquité* Paris. Maspero. **1968**
- ¹³ Robert, P. *Le petit Robert 1* 107, avenue Parmentier, Paris **1991**
- ¹⁴ Grasset, H. *Étude historique et critique sur les générations spontanées et l'hétérogénie* Paris, J.-Rousset, **1912**
- ¹⁵ Leduc, S. *Théorie physico-chimique de la vie et des générations spontanées* Paris, Poinat, **1912**
- ¹⁶ Bruylants, A. *Bull. Cl, Lett. Sci. Morales Polit.* **1979**, 65, 52
- ¹⁷ Gysel, C. *Rev. Bel. Med. Dent.* **1979**, 34, 397
- ¹⁸ Haas, L. F. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **1997**, 63, 428
- ¹⁹ Ziegler, P. *The black Death* London, Collins, **1969**
- ²⁰ www.langlab.wayne.edu/gavroche/PesteNoire.html (site visité jeudi le 27 janvier 2005, voir l'annexe)
- ²¹ http://fr.wikipedia.org/wiki/Peste_noire (site visité jeudi le 27 janvier 2005, voir l'annexe)
- ²² Suzuki, S.; Chikasato, Y.; Hotta, S. *Bull. World Health Organ.* **1974**, 51, 237

-
- ²³ Smith, P. B.; Montie, T. C.; *J. Bacteriol.* **1975**, *122*, 1045
- ²⁴ Faber, J. F.; Rench, M. *Dev. Biol. Stand.* **1974**, *24*, 213
- ²⁵ Chakravorty, R. C. *His. Med.* **1975**, *6*, 65
- ²⁶ Thyresson, N. *Int. J. Dermatol.* **1995**, *34*, 735
- ²⁷ Morton, R. S.; Hudson, M. M. *J. Med. Biography* **1999**, *7*, 182
- ²⁸ Rodriguez-Castellon, J. A. *Am. J. Pathol.* **1980**, *101*, 62
- ²⁹ Castellani, P.; Console, R. *Pharm. Hist.* **2004**, *34*, 2
- ³⁰ Hawgood, B. J. *J. Med. Biogr.* **2003**, *11*, 28
- ³¹ Tongiorgi, T. L. *Arch. Nat. Hist.* **2001**, *28*, 179
- ³² Gacto, M. *Int. Microbiol.* **1999**, *2*, 273
- ³³ Capanna, E. *J. Exp. Zoolog.* **1999**, *285*, 178
- ³⁴ Doetsch, R. N. *Bacteriol. Rev.* **1976**, *40*, 270
- ³⁵ Aszmann, O. C. *J. Reconstr. Microsurg.* **2000**, *16*, 291
- ³⁶ Hoas, L. F. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1999**, *66*, 103
- ³⁷ Florkin, M. *Rev. Med. Liege.* **1960**, *15*, 79
- ³⁸ Bordenave, G. *Microbes Infect.* **2003**, *5*, 553
- ³⁹ Greenblatt, C. L.; Lavabre-Bertrand, T. *Microsc.* **2001**, *49*, 89
- ⁴⁰ Barnett, J. A. *Yeast* **2000**, *16*, 755
- ⁴¹ Fournier, J. *Actual. Chim.* **2003**, *10*, 60
- ⁴² Giordan, A.; Raichvarg, D.; Drouin J.-M.; Gagliardi, R.; Canay A. M. *Histoire de la biologie, Tome I*, Technique et Documentation-Lavoisier, Paris, **1987**.
- ⁴³ Voelker, R. *J. Am. Med. Assoc.* **2005**, *293*, 281
- ⁴⁴ Agbottah, E.; de la Fuente, C.; Nekhai, S.; Barnett, A.; Gianella-Borradori, A.; Pumfery, A.; Kashanchi, F. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 3029
- ⁴⁵ Meyer, D. *AIDS* **2004**, *89*
- ⁴⁶ Gianinazzi, S.; Scalla, R.; Rigaud, J. *C.R. Acad. Sci.* **1970**, *270*, 2882
- ⁴⁷ Russell, P. J. *Genetics*, 3^{ème} édition, Harper Collins, USA, **1992**
- ⁴⁸ Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*, Wiley J, **1990**
- ⁴⁹ Hunter, R. *Cell* **2000**, *100*, 113
- ⁵⁰ Gingras, A.C.; Raught, B.; Sonenberg, N. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 913

-
- ⁵¹ Myers, L.C.; Kornberg, R. D. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 729
- ⁵² Waga, S.; Stillman, B. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 721
- ⁵³ Grandori, C.; Cowley, S. M.; James, L. P.; Eisenman, R. N. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **2000**, *16*, 653
- ⁵⁴ Strasser, A.; O'Connor, L.; Dixit, V. M. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 217
- ⁵⁵ Adam, G.C.; Burbaum, J.; Kozarich, J.W.; Patricelli, M.P.; Cravatt, B.F. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1368
- ⁵⁶ Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*, 2^e édition, Kluwer Academic / Plenum Publishers, **1999**
- ⁵⁷ Gygi, S.P.; Rist, B.; Gerber S.A.; Turecek F.; Gelb M.; Aebersold R. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 994
- ⁵⁸ Kim, J.-S.; Raines, R. T. *Anal. Biochem.* **1995**, *225*, 174
- ⁵⁹ Loo, T. W.; Calrke, D. M. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 39272
- ⁶⁰ Bonet, A.; Audemard, E.; Mornet, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *152*, 1
- ⁶¹ Kihira, Y.; Majima, E.; Shinohara, Y.; Terada, H. *Biochemistry* **2005**, *44*, 184
- ⁶² Tsuruta, Y.; Tomida, H.; Kohashi, K. *Anal. Sci.* **1988**, *4*, 531
- ⁶³ Zhang, J.; Campbell, R. E.; Ting, A. Y.; Tsien, R. Y. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 906
- ⁶⁴ Huh, W.-K.; Falvo, J. V.; Gerke, L. C.; Carroll, A. S.; Howson, R. W.; Weissman, J. S.; O'Shea, E. K. *Nature* **2003**, *425*, 686
- ⁶⁵ Griffin, B. A.; Adams, R. S.; Tsien, Y. R. *Science* **1998**, *281*, 269
- ⁶⁶ Hess, S. T.; Heikal, A. A.; Webb, W. W. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 10138
- ⁶⁷ Negro, A.; Grassato, L.; De Laureto, P.P.; Skaper, S. D. *Protein Eng.* **1997**, *10*, 1077
- ⁶⁸ Hart, R. C.; Matthews, J. C.; Hori, K.; Cormier, M. J. *Biochemistry* **1979**, *18*, 2204
- ⁶⁹ Patterson, G. H.; Piston, D. W.; Barisas, B. G. *Anal. Biochem.* **2000**, *284*, 438
- ⁷⁰ Whittaker, V. P. *J. Biochem.* **1947**, 41
- ⁷¹ Griffin, B. A.; Adams, R. S.; Tsien, Y. R. *Methods Enzymol.* **2000**, *327*, 565

-
- ⁷² Adams, S. R.; Campbell, R. E.; Gross, L. A.; Martin, B. R.; Walkup, G. K.; Yao, Y.; Llopis, J.; Tsien, R. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6063
- ⁷³ Merutka, G.; Shalongo, W.; Stellwagen, E. *Biochemistry* **1991**, *30*, 4245
- ⁷⁴ Kalef, E.; Gilter, C. *Methods Enzymol.* **1994**, 233
- ⁷⁵ Lowe, W. G.; Hamilton, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57*, 1081
- ⁷⁶ Spang, C.; Edelman, F. T.; Noltemeyer, M.; Roesky, H. W. *Chem. Ber.* **1989**, *122*, 1247
- ⁷⁷ Davidson, R. S.; Hilchenbach, M. H. *Photochem. Photobiol.* **1990**, *52*, 431
- ⁷⁸ Langmuir, M. E.; Yang, J.-R.; Moussa, A. M.; Laura, R.; LeCompte, K. A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3989
- ⁷⁹ Yang, J.-R.; Langmuir, M. E. *J. Heterocycl. Chem.* **1991**, *28*, 1177
- ⁸⁰ Girouard, S. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, **2000**
- ⁸¹ Houle, M.-H. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, **2002**
- ⁸² Atkins P. *Physical Chemistry, fifth Edition.* W.H. Freeman and Company, N.-Y. **1994**
- ⁸³ Cherek, H. *J. Luminescence* **1980**, *22*, 103
- ⁸⁴ Szalay, L. *Phys. Chem. Acta* **1970**, *16*, 81
- ⁸⁵ Zander, C.; Drexhage, K. H. *Adv. Photochem.*, **1995**, *20*, 59
- ⁸⁶ Nitsche, L. C.; Nguyen, A.; Evans, G. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *397*, 417
- ⁸⁷ Cohen, B. E.; Pralle, A.; Yao, X.; Swaminath, G.; Gandhi, C. S.; Jan, Y. N.; Kobilka, B. K.; Isacoff, E. Y.; Jan, L. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 965
- ⁸⁸ Bojarski, C.; Dudkiewicz, J.; Pruszko, H. *Phys. Chem. Acta* **1972**, *18*, 3
- ⁸⁹ Carey, F. A.; Sundberg, R. J. *Advanced organic chemistry*, 3^e édition, Partie B. Plenum Press, N.-Y., **1990**
- ⁹⁰ Kanaoka, Y.; Machida, M.; Kokubun, H.; Sekine, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1968**, *16* (9), 1747
- ⁹¹ Kanaoka, Y.; Machida, M.; Ando, K.; Sekine, T. *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, *207*, 269
- ⁹² Wu, C.-W.; Yarbrough, L. R.; Wu, F. Y.-H. *Biochemistry* **1976**, *15*, 2863

-
- ⁹³ Burdette, S. C.; Walkup, G. K.; Spingler, B.; Tsien, R. Y.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7831
- ⁹⁴ Trivedi, K.; Sethna, S. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 1817
- ⁹⁵ Kokotos, G.; Tzougraki, C. *J. Heterocycl. Chem.* **1986**, *23*, 87
- ⁹⁶ ElAmin, B.; Anantharamaiah, G. M.; Royer G. P.; Means, G. E. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3442
- ⁹⁷ Rajagopal, R.; Srinivasan, K. V. *Synthetic commun.* **2003**, *33*, 961
- ⁹⁸ Pantoleon, V.; Marakos, P.; Pouli, N.; Mikros, E.; Andreadou, I. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 522
- ⁹⁹ Eiden, F.; Leister, H. P.; Mayer, D. *Arzneimittelforschung* **1983**, *33*, 101
- ¹⁰⁰ Casiraghi, G.; Casnati, G.; Puglia, G.; Sartori, G.; Terenghi, G. *J. Am. Chem. Soc. Perkin I* **1980**, 1862
- ¹⁰¹ Kayser, M. M.; Breau, L.; Eliev, S.; Morand, P.; Ip, H. S. *Can. J. Chem.* **1986**, *64*, 104
- ¹⁰² Evans, B. S.; Abdelkader, M.; Buyle Padia, A.; Hall, H. K. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2848
- ¹⁰³ Braña, M. F.; Castellano, J. M.; Morán, M.; Pérez de Vega, M. J.; Romerdahl, C. R.; Qian, X.-D.; Bousquet, P.; Emiling, F.; Schlick, E.; Keilhauer, G. *Anticancer Drug Des.* **1993**, *8*, 257
- ¹⁰⁴ Drexhage, K. H., *Dye Lasers*, Schafer, F. P., Ed., Springer, Berlin. 1977, 2^e édition
- ¹⁰⁵ Rusalov, M. V.; Druzhinin, S. I.; Uzhinov, B. M. *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 193
- ¹⁰⁶ Barouki, R.; Morel, Y. *J. Soc. Biol.* **2001**, *195*, 377
- ¹⁰⁷ Hedderich, R.; Koch, J.; Linder, D.; Thauer, R. K. *Eur. J. Biochem.*, **1994**, *225*, 253
- ¹⁰⁸ <http://www.qiagen.com> (site visité mardi le 22 février 2005)
- ¹⁰⁹ Inoue, H.; Nojima, H.; Okayama, H. *Gene* **1990**, *96*, 23
- ¹¹⁰ <http://www.stratagene.com> (site visité vendredi le 28 janvier 2005)
- ¹¹¹ Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2^e édition, Volume 1,2,3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**
- ¹¹² Johnson, D. L.; Martin, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2018

-
- ¹¹³ Das, D.; Allen, T. M.; Suresh, M. R. *Protein Expr. Purif.* **2005**, *39*, 199
- ¹¹⁴ Ishmukhametov, R. R.; Galkin, M. A.; Vik, S. B. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1706*, 110
- ¹¹⁵ Mac Rae, A. F.; Preiszner, J.; Ng, S.; Bolla, R. I. *J. Biotechnol.* **2004**, *112*, 247
- ¹¹⁶ Kruger, N. J. *Protein Protocols Handbook*, 2^d edition, **2002**
- ¹¹⁷ Bio-Rad Protein Assay Instruction Manual, *Bio-Rad Laboratories*, 1-800-424-6723
- ¹¹⁸ Morioka, K.; Tanaka, K.; Ono, T. *J. Biochem.* **1981**, *89*, 1633
- ¹¹⁹ Pollard, H. B.; Menard, R.; Brandt, H. A.; Pazoles, C. J.; Creutz, C. E.; Ramu, A. *Anal. Biochem.* **1978**, *86*, 761
- ¹²⁰ Maniatis, T.; Goodbourn, S.; Fisher, J. A. *Science* **1987**, *236*, 1237
- ¹²¹ Leonardo, M. J.; Baltimore, D. *Cell* **1989**, *58*, 227
- ¹²² Curran, T.; Franza, B. R., II *Cell* **1988**, *55*, 395
- ¹²³ Curran, T. *The Oncogene Handbook*, Reddy, E. P.; Skalka, A.M.; Curran, T. Edition (Elsevier, Amsterdam, **1988**)
- ¹²⁴ O'Shea, E. K.; Rutkowski, R.; Kim, P. S. *Cell*, **1992**, *68*, 699
- ¹²⁵ Rauscher III, F. J.; Voulalas, P. J.; Franza Jr., B. R.; Curran, T. *Genes Dev.* **1988**, *2*, 1687
- ¹²⁶ <http://pbil.ibcp.fr/html/index.php> (site visité mardi le 22 février 2005)
- ¹²⁷ Martin, P.; Muruke, M.; Hosea, K.; Kivaisi, A.; Zerwas, N.; Bauerle, C. *Biochim. Mol. Biol.* **2004**, *32*, 390
- ¹²⁸ Wei, D.; Li, M.; Zhang, X.; Xing, L. *Anal. Biochem.* **2004**, *331*, 401
- ¹²⁹ Abate, C.; Luk, D.; Gentz, R.; Rauscher, F. J., III; Curran, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 1032
- ¹³⁰ Greenfield, N.; Fasman, G. D. *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108
- ¹³¹ Miller, L. W.; Cornish, V. W. *Curr. Opin Chem. Biol.* **2005**, *9*, 56
- ¹³² Rawn, D. J. *Traité de biochimie*, DeBoeck-Wesmael, Bruxelles, **1990**
- ¹³³ Tannapfel, A.; Vomschloss, S.; Karhoff, D.; Markwarth, A.; Hengge, V. R.; Wittekind, C.; Arnold, R.; Horsch, D. *Am. J. Clin. Pathol.* **2005**, *123*, 256

-
- ¹³⁴ Bommer, G. T.; Jaeger, C.; Duerr, E.-M.; Baehs, S.; Eichhorst, S. T.; Brabletz, T.; Hu, G.; Froehlich, T.; Arnold, G.; Kress, D. C.; Goetze, B.; Fearon, E. R.; Kolligs, F. *T. J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7962
- ¹³⁵ Price, R.D.; Yamaji, T.; Yamamoto, H.; Higashi, Y.; Hanaoka, K.; Yamazaki, S.; Ishiye, M.; Aramori, I.; Matsuoka, N.; Mutoh, S.; Yanagihara, T.; Gold, B. G. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *509*, 11
- ¹³⁶ Hancock, J.J. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 373
- ¹³⁷ Campbell, S.L.; Khosravi-Far, R.; Rossman, K. L.; Clark, G. J.; Der, C. J. *Oncogene* **1998**, *17*, 1395
- ¹³⁸ Chiu, V.K.; Biovna, T.; Hach, A.; Sajous, J.B.; Silletti, J.; Wiener, H.; Johnson, R.L.; Cox, A.D.; Philips, M.R. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, 343
- ¹³⁹ Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55
- ¹⁴⁰ Green, L.M. *J. Immunol. Methods* **1984**, *70*, 257
- ¹⁴¹ Fujioka, T. *World J. Surgery*, **2000**, *24*, 1205
- ¹⁴² Kumita, J. R.; Flint, D. G.; Smart, O. S.; Woolley, G. A. *Protein Eng.* **2002**, *15*, 561
- ¹⁴³ Marqusee S.; Robbins, V. H.; Baldwin R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 5286
- ¹⁴⁴ Merutka G.; Stellwagen E. *Biochemistry* **1990**, *29*, 894
- ¹⁴⁵ Penel, S.; Morrison, G. R.; Motishire-Smith R. J.; Doig A. J. *J. Mol. Biol.* **1999**, *293*, 1211
- ¹⁴⁶ disponible au <http://www.emblheidelberg.de/Service/serrano/agadir/agadir-start.html>.
- ¹⁴⁷ Munoz, V.; Serrano, L. *Biopolymers* **1997**, *41*, 495
- ¹⁴⁸ Reddy, P. Y.; Kondo, S.; Fujita, S.; Toru, T. *Synthesis* **1998**, 999
- ¹⁴⁹ Chernick, E. T.; Ahrens, M. J.; Scheidt, K. A.; Wasielewski, M. R. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1486
- ¹⁵⁰ Selvin, P. R. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 730
- ¹⁵¹ Mahajan, N. P.; Linder, K.; Berry, G.; Gordon, G. W.; Heim, R.; Herman, B. *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 547

-
- ¹⁵² Ullmann, A.; Jacob, F.; Monod, J. *J. Mol. Biol.* **1967**, *24*, 339
- ¹⁵³ Ladurner, A. G.; Itzhaki, L. S.; de Prat Gay, G.; Fersht, A. R. *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 329
- ¹⁵⁴ de Prat Gay, G.; Ruiz-Sanz, J.; Fersht, A. R. *Biochemistry* **1994**, *33*, 7963
- ¹⁵⁵ Shiba, K.; Schimmel, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 1880
- ¹⁵⁶ Jacinto, E.; Loewith, R.; Schmidt, A.; Lin, S.; Rugg, M. A.; Hall, A.; Hall, M. N. *Nat. Cell Biol.* **2004**, *6*, 1122
- ¹⁵⁷ Jacinto, E.; Hall, M. N. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2003**, *4*, 117
- ¹⁵⁸ dos Santos, A. B.; Cervantes, F. J.; Vanlier, J. B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 62
- ¹⁵⁹ Cabanillas, J. A.; Pacheco-Castro, A.; Zapata, D. A.; Torres, P. S.; Martin-Fernandez, J. M.; Millan, R.; Regueiro, J. R. *Res. Dev. Immunol.* **2002**, 381
- ¹⁶⁰ Arulanandam, R.; Vultur, A.; Raptis, L. *Anal. Biochem.* **2005**, *338*, 83
- ¹⁶¹ Kataoka, T. R.; Komazawa, N.; Morii, E.; Oboki, K.; Nakano, T. *Blood* **2005**, *105*, 1016

