

2m11.2866.4

Université de Montréal

**Élaboration d'un fluorophore
permettant une étude d'apposition protéique.**

Par

Stéphane Girouard

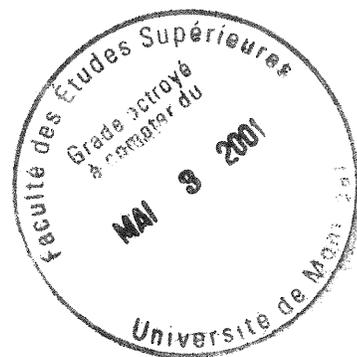
Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)

décembre 2000

© Stéphane Girouard, 2000



QD

3

U54

2001

10.017

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures
Ce mémoire est intitulé

Élaboration d'un fluorophore permettant une étude d'apposition protéique.

Présenté par :
Stéphane Girouard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

| | |
|-----------------------|------------------------|
| Richard Giasson | Président-rapporteur |
| Joelle N. Pelletier | Membre du jury |
| Jeffrey Wayne Keillor | Directeur de recherche |

Mémoire accepté le : _____

Sommaire

Le projet consiste à synthétiser une molécule fluorogène possédant deux sites réactionnels de fixation pour des composés soufrés. Une fois lié à ces composés, la molécule devient fluorescente. La molécule synthétisée pourra ainsi se lier aux soufres des cystéines contenues dans deux protéines préalablement exprimées. S'il n'y a pas d'interaction entre les deux protéines, les cystéines se voient suffisamment éloignées pour ne pas réagir toutes les deux avec la molécule. La fluorescence sera donc faible. Par opposition, une interaction protéine-protéine crée une modification structurale qui place les cystéines dans une orientation parfaite pour réagir toutes deux avec la molécule induisant ainsi une forte fluorescence.

Ce travail permettra de démontrer qu'il a été possible de construire deux molécules fluorogènes qui ne sont pas fluorescentes lorsque non liées à des soufres et fluorescentes lorsqu'elles le sont. Il sera aussi possible de faire la preuve que la liaison d'un seul soufre n'induit pas de fluorescence. Ces données nous permettront de conclure qu'une étude d'apposition protéique pourra bel et bien être réalisée.

De plus, ce travail permettra de mettre en évidence toutes les étapes à suivre pour créer un fluorophore permettant de faire une étude d'apposition protéique.

Table des matières :

| | |
|--|------|
| SOMMAIRE | iii |
| TABLE DES MATIÈRES | iv |
| LISTE DES FIGURES | vii |
| LISTE DES TABLEAUX | xii |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | xiii |
| DÉDICACE | xiv |
| REMERCIEMENTS | xv |
| | |
| 1 Introduction | 1 |
| 1.1 Association protéique | 1 |
| 1.2 Choix des protéines d'apposition | 6 |
| 1.3 Choix de la molécule fluorogène | 8 |
| 1.4 Objectif | 10 |
| | |
| 2 Étude de synthèse | 13 |
| 2.1 Voie de synthèse du fluorophore (1) | 13 |
| 2.2 Voie de synthèse du fluorophore (2) | 18 |
| 2.3 Voie de synthèse du dithiol (3) pour le fluorophore (1) | 20 |
| 2.4 Voie de synthèse du dithiol (4) pour le fluorophore (1) | 22 |
| | |
| 3 Partie expérimentale | 23 |
| | |
| 4 Étude fluorimétrique pour le fluorophore (1) | 43 |
| 4.1 Quelques notions de fluorescence | 43 |
| 4.1.1 Définition de la fluorescence | 43 |
| 4.1.2 Déplacement de Stokes | 44 |
| 4.1.3 Effet d'extinction de fluorescence | 45 |
| 4.2 Tests menés sur le fluorophore (1) non lié à des soufres | 48 |
| 4.3 Étude fluorométrique de la bis-maléimidocoumarine liée à des composés soufrés | 51 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.3.1 | Test de saturation avec un thiol | 51 |
| 4.3.2 | Caractérisation du produit final | 56 |
| 4.3.3 | Cinétique de fluorescence du fluorophore en réaction avec l'éthanethiol | 57 |
| 4.3.4 | Test de croissance de fluorescence avec un thiol | 58 |
| 4.3.5 | Étude du produit monothiolé | 63 |
| 4.3.5.1 | Principe de l'électrophorèse capillaire | 63 |
| 4.3.5.2 | Expérience envisagée | 64 |
| 4.3.5.3 | Résultats de l'expérience | 67 |
| 4.3.5.4 | Discussion des résultats obtenus par électrophorèse capillaire | 70 |
| 4.4 | Étude fluorométrique de la 3,6-bis-maléimidocoumarine avec un dithiol | 73 |
| 4.4.1 | Test de saturation avec un dithiol | 73 |
| 4.4.2 | Caractérisation du composé 14 | 76 |
| 4.4.3 | Cinétique de fluorescence | 77 |
| 4.4.4 | Test de croissance de fluorescence avec un dithiol | 78 |
| 4.5 | Comportement du fluorophore dans des solvants polaires et étude de dilution | 80 |
| 5 | Étude fluorimétrique pour le fluorophore (2) | 85 |
| 5.1 | Tests mené sur le fluorophore (2) non lié à des soufres | 85 |
| 5.2 | Étude fluorométrique de la molécule (2) | 87 |
| 5.2.1 | Test de saturation avec un thiol | 87 |
| 5.2.2 | Caractérisation du composé 16 | 90 |
| 5.2.3 | Cinétique de fluorescence pour le fluorophore (2) | 91 |
| 5.2.4 | Tests de croissance de fluorescence pour le fluorophore (2) en réaction avec des thiols | 92 |
| 5.2.5 | Étude du produit monothiolé du fluorophore (2) | 94 |
| 5.3 | Étude fluorométrique de la bis-maléimidocoumarine avec le dithiol | 97 |

| | | |
|---------------|---|------------|
| 5.3.1 | Test de fluorescence avec un dithiol | 97 |
| 5.3.2 | Caractérisation du macrocycle (17) | 100 |
| 5.3.3 | Test de croissance de fluorescence avec un dithiol (4) | 101 |
| 5.3.4 | Test de fluorescence avec le BMMB | 102 |
| 5.4 | Comportement du fluorophore (2) dans des solvant polaires et étude de dilution | 104 |
| 6 | Conclusion générale | 105 |
| 7 | Autres expériences à envisager | 106 |
| 8 | Bibliographie | 108 |
| Annexe | Équations pour déterminer les rendements de réaction | xvi |

Liste des figures

- Figure 1.1 : Principe du PCA (Protein Complementation Assay).
- Figure 1.2 : Principe du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).
- Figure 1.3 : a) Voie de synthèse du FLASH-EDT₂. b) Insertion du FLASH-EDT₂ dans le domaine protéique CCXXCC de l'hélice α .
- Figure 1.4 : a) Structure d'une Leucine-Zipper. b) Complexe protéine-protéine.
- Figure 1.5 : a) Association protéique du Leucine-Zipper GCN4 de type sauvage. b) Association protéique du Leucine-Zipper GCN4 tronqué.
- Figure 1.6 : Structure et comportement fluorométrique de la 9-[1H-Pyrrole-2,5-dione]-3H-naptho[2,1-b]pyran-3-one.
- Figure 1.7 : a) Association protéique de GCN4 tronqué et muté. b) Association protéique de GCN4 tronqué et muté avec des protéines d'apposition.
- Figure 1.8 : Structure proposée pour la synthèse des fluorogènes.
- Figure 1.9 : a) Structure de la 3,6-bismaléimidocoumarine. b) minimisation stérique de la 3,6-bismaléimidocoumarine. c) Structure de la 3-(*p*-phényl-maléimido)-6-maléimidocoumarine. d) Minimisation stérique de la 3-(*p*-phényl-maléimido)-6-maléimidocoumarine.
- Figure 1.10 : Visualisation des tests à effectuer sur les fluorophores.
- Figure 1.11 : a) Structure du BMMB. b) Minimisation stérique du BMMB. c) Structure du 2,7-Bis(3-mercaptopropionate) de naphthalène. d) Minimisation stérique du 2,7-Bis(3-mercaptopropionate) de naphthalène.
- Figure 2.1 : Voie de synthèse du 3,6-bis[1H-Pyrrole-2,5-dione]2H-1-Benzopyran-2-one.
- Figure 2.2 : Mécanisme de synthèse du 3-acetamido-6-nitro[2H-1-Benzopyran-2-one].
- Figure 2.3 : Représentation de la stabilité de la lactone par l'aromaticité de la molécule.
- Figure 2.4 : Mécanisme de synthèse des maléimides.

Figure 2.5 : Voie de synthèse de la 3(*p*-maléimidophényle)6-maleimidocoumarine.

Figure 2.6 : Voie de synthèse du 4,4'-bis(mercaptométhyle)benzophénone (**3**).

Figure 2.7 : Étapes de synthèse du 2,7-bis-(3-mercapto-1-hydroxy) naphtalène (**4**).

Figure 4.1 : Professeur Alexander Jablonski (1898-1980). Tiré de *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (page 4).

Figure 4.2 : Diagramme de Jablonski, tiré de *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, (page 5).

Figure 4.3 : Sir George Gabriel Stokes (1819-1903). Tiré de *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, (page 7).

Figure 4.4 : Configuration électronique à l'état fondamental des orbitales frontières des fluorophores. a) non substituées à des soufres. b) disubstituées.

Figure 4.5 : a) Spectre d'excitation du fluorophore (**1**) non substitué.
b) Spectre d'émission du fluorophore (**1**) non substitué à $\lambda_{exc} = 481\text{nm}$.

Figure 4.6 : Spectre d'émission du fluorophore (**1**) non substitué à des molécules soufrées à $\lambda_{exc} = 481\text{nm}$ et à des concentrations de a) 10^{-6}M , b) 10^{-7}M , c) 10^{-8}M , d) 10^{-9}M .

Figure 4.7 : Réaction de la bismaléimidocoumarine avec l'éthanethiol pour des fins de détection de fluorescence.

Figure 4.8 : a) Spectre d'excitation du fluorophore (**1**) disubstitué à l'éthanethiol.
b) Spectre d'émission correspondant, à $\lambda_{exc} = 367\text{nm}$ (fente = 2,5nm).

Figures 4.9 : Hypothèse permettant de prévoir un déplacement de stoke important par un phénomène de délocalisation.

Figure 4.10 : Représentation de la résonance interne du fluorophore (**1**).

Figure 4.11 : a) Spectre d'excitation de la molécule (**7**). b) Spectre d'émission de la même longueur d'onde à $\lambda_{exc} = 408\text{nm}$, fente = 5nm.

Figure 4.12 : Spectre d'émission du produit caractérisé (après réaction avec l'éthanethiol), fente = 5nm.

Figure 4.13 : Cinétique de fluorescence ; intensité de fluorescence en fonction du temps par la réaction du fluorophore (**1**) avec l'éthanethiol.

- Figure 4.14 : Représentation du ou des intermédiaire(s) réactionnel(s) de la réaction fluorophore (1) avec l' éthanethiol.
- Figure 4.15 : Profils hypothétiques de la fluorescence du produit monothiolé.
- Figure 4.16 : Profil expérimental de la fluorescence du produit monothiolé.
- Figure 4.17 : a) Représentation de l'electroosmose. b) Représentation du flux hydrodynamique. Tiré de D.C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis* p.917.
- Figure 4.18 : a) Spectre d'excitation de la molécule 13, à 10^{-3} M. fente = 0nm
b) Spectre d'excitation de la molécule 12, à 10^{-3} M, fente=0nm.
- Figure 4.19 : Étapes à suivre pour pouvoir faire l'analyse par électrophorèse capillaire.
- Figure 4.20 : Migration des produits finaux sur EC. a) Solvant seul. b) Produit disubstitué avec deux éthanethiols. c) Produit disubstitué avec deux fonctions thioacides.
- Figure 4.21 : Spectre de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre d'équivalents d'acide 3-mercaptopropionique.
- Figure 4.22 : Allure de la fluorescence du produit de réaction en fonction du nombre d'unités du produit diacide (bleu).
- Figure 4.23 : Droite théorique de la détermination de fluorescence du produit portant une seule fonction acide (rouge) et portant deux fonctions acides (bleu).
- Figure 4.24 : Réaction du fluorophore (1) avec un équivalent de BMMB pour des fins de détection de fluorescence.
- Figure 4.25 : a) Spectre d'excitation de la molécule (14) b) Spectre d'émission de la molécule (14) à 384nm.
- Figure 4.26 : a) Représentation de la molécule (14). b) Minimisation stérique de la molécule (14).
- Figure 4.27 : Spectre d'émission de la molécule (14) caractérisée.
- Figure 4.28 : Cinétique de fluorescence ; intensité de fluorescence en fonction du temps pour la réaction du fluorophore (1) avec le BMMB.
- Figure 4.29 : Représentation des intermédiaires réactionnels de la réaction fluorophore (1) avec BMMB.

- Figure 4.30 : Allure théorique d'une étude nb d'éq de fluorescence en fonction de I_F au cours de la réaction fluorophore-BMMB.
- Figure 4.31 : Étude de l'augmentation de fluorescence au cours de la réaction fluorophore-BMMB en fonction du nb d'équivalents de BMMB.
- Figure 5.1 : a) Spectre d'excitation du fluorophore (2) non substitué.
b) Spectre d'émission du fluorophore (2) non substitué à $\lambda_{exc}=484\text{nm}$.
- Figure 5.2 : Réaction du deuxième fluorophore (2) avec l'éthanethiol (a) ou l'acide 3-mercaptopropionique (b) pour des fins de détection de fluorescence.
- Figure 5.3 : a) Spectre d'excitation du fluorophore (2) disubstitué à l'éthanethiol, fente=0 nm. b) Spectre d'émission du fluorophore (2) disubstitué à l'éthanethiol, $\lambda_{exc} = 383\text{nm}$ et fente=0 nm. c) Spectre d'excitation du fluorophore (2) disubstitué à l'acide 3-mercaptopropionique, fente=0 nm. d) Spectre d'émission du fluorophore (2) disubstitué à l'acide 3-mercaptopropionique, $\lambda_{exc} = 384\text{nm}$ et fente=0 nm.
- Figure 5.4 : Spectre d'émission du produit caractérisé du fluorophore (2) après réaction avec l'acide 3-mercaptopropionique, fente=2,5 nm.
- Figure 5.5 : Cinétique de fluorescence; intensité de fluorescence en fonction du temps pour la réaction du fluorophore (2) avec, l'éthanethiol (bleu) et l'acide 3-mercaptopropionique (rouge).
- Figure 5.6 : Profil expérimental de l'intensité de fluorescence du fluorophore 2 en réaction avec des quantités variables d'acide 3-mercaptopropioniques.
- Figure 5.7 : Étapes à suivre pour faire l'EC pour le fluorophore (2).
- Figure 5.8 : Migration du produit disubstitué avec deux fonctions thiocacides sur EC.
- Figure 5.9 : Intensité de fluorescence du fluorophore (2) en fonction du nombre d'unités de diacide.
- Figure 5.10 : Réaction du fluorophore (2) avec le dithiol (4) pour des fins de détection de fluorescence.
- Figure 5.11 : a) Spectre d'absorbance de la molécule (17). b) Spectre d'émission de la même molécule (λ excitation = 459,1 nm) avec des fentes de 2,5 nm.

- Figure 5.12 : a) Structure de la molécule (17). b) Minimisation stérique de la molécule (17).
- Figure 5.13 : Spectre d'émission du produit caractérisé du fluorophore (2) après réaction avec le dithiol (4), fente = 2,5 nm.
- Figure 5.14 : Étude de l'augmentation de l'intensité de fluorescence au cours de la réaction fluorophore (2) en fonction du nombre d'équivalents de dithiol (4).
- Figure 5.15 : Réaction du fluorophore (2) en réaction avec le BMMB et menant à la plus petite unité fluorescente possible.
- Figure 5.16 : a) Spectre d'absorbance et b) spectre d'émission du fluorophore (2) en réaction avec le BMMB.
- Figure 7.1 : Expérience future dans le but d'augmenter la solubilité des fluorophores.
- Figure 7.2 : Groupement espaceur localisé sur les deux fonctions maléimides des fluorophores.

Liste des tableaux

- Tableau IV.1 : Effet de la variation de la λ sur la 2^{ième} harmonique.
- Tableau IV.2 : Résultats de l'électrophorèse capillaire et des tests de fluorescence pour le fluorophore (1).
- Tableau IV.3 : Rapport des produits mono et diacide.
- Tableau IV.4 : Étude de fluorescence (à 10^{-3} M et à 380 nm) d'une réaction du fluorophore (1) avec l'éthanethiol.
- Tableau IV.5 : Fluorescence (à 10^{-3} M et à 390 nm) d'une réaction du fluorophore (1) avec l'éthanethiol en utilisant du tampon phosphate, pH = 7,2.
- Tableau IV.6 : Fluorescence (à 10^{-3} M et à 333 nm) d'une réaction du fluorophore (1) avec l'éthanethiol.
- Tableau IV.7 : Fluorescence (à 10^{-5} M et à 315 nm) d'une réaction du fluorophore (1) avec l'éthanethiol.
- Tableau IV.8 : Fluorescence (à 10^{-6} M et à 315 nm) d'une réaction du fluorophore (1) avec l'éthanethiol.
- Tableau V.1 : Résultats de l'électrophorèse capillaire et des tests de fluorescence pour le fluorophore (2).
- Tableau V.2 : Étude de solubilité du fluorophore (2) dans les solvants DMSO-tampon phosphate, pH=7,2.

Liste des abréviations

| | |
|----------------------|--|
| Å : | Ångstrom |
| Ac : | acétyle |
| BCMB : | 4,4'-bis(chlorométhyl)benzophénone |
| BMB : | 4,4'-bisméthylbenzophénone |
| BMMB : | 4,4'-bismercaptopméthylbenzophénone |
| BRET : | Bioluminescence Resonance Energy Transfer |
| CHES : | acide 2-[N-cyclohexylamino]éthane sulfonique |
| conc. : | concentré |
| Cys : | cystéine |
| DMF : | N,N-diméthylformamide |
| DMSO : | diméthylsulfoxyde |
| EC : | électrophorèse capillaire |
| éq : | équivalent |
| Et : | éthyle |
| FKBP : | FK506 Binding Protein |
| Glu : | acide glutamique |
| GSH : | glutathion |
| I _F : | intensité de fluorescence mesurée |
| I _{F max} : | intensité de fluorescence de fluorescence maximale |
| I _{F obs} : | intensité de fluorescence de fluorescence observée |
| IR | infrarouge |
| λ : | longueur d'onde (lambda) |
| λ _{abs} : | longueur d'onde d'absorption |
| λ _{exc} : | longueur d'onde d'excitation |
| LDA : | Lithium diisopropylamine |
| Lys : | lysine |
| M : | molaire |
| Me : | méthyle |
| nb : | nombre |
| RMN | résonance magnétique nucléaire |
| rxn : | réaction |
| S _{N2} : | substitution nucléophile de deuxième ordre |
| TOR2 : | target of rapamycin-2 |

À mon père, ma mère, ma sœur
et à la douce mémoire de Maya.

Remerciements

Je voudrais remercier mes directeurs de stages d'été (Pr. James D. Wuest et Pr. Yvan Guindon) et aux membres de leurs équipes (en particulier Dr. Mohamed Bencheqroun) pour m'avoir préparé à surmonter les obstacles en synthèse organique.

Je désire également remercier le professeur S. Michnick et toute son équipe de recherche (en particulier F.-X. Campbell Valois et A. Galarneau) pour leur contribution au niveau de la synthèse protéique.

Je ne pourrais passer sous silence l'aide de tous les membres du groupe du Pr. J.W. Keillor, constitué de Paul Gagnon, Claudio Marrano, Christian Lherbet, Pierre De Macedo, Judith Labelle, Danielle Lapierre, Roselyne Castonguay, Christian Gravel et Caroline Rivard. Merci pour l'esprit d'équipe et d'amitié que nous avons su créer. Je tiens à souligner le travail de Roselyne Castonguay pour avoir lu ce mémoire ainsi que Christian Gravel pour son aide en matière d'électrophorèse capillaire.

J'adresse un merci tout spécial au Pr. Jeffrey Wayne Keillor qui fut un patron exemplaire. Sa disponibilité, son aide et son amitié me furent d'un grand secours. J'espère, un jour, devenir un aussi bon professeur que lui.

Merci aux innombrables personnes qui ont contribué à faire de ma maîtrise une expérience enrichissante. Travailler avec vous tous fut un honneur.

1 Introduction

1.1 Association protéique

Les protéines sont des polymères d'acides aminés de longueur très variable. Le rôle biologique qu'elles occupent est fondamental à l'homéostasie. Qu'il s'agisse d'enzymes, de protéines structurales (tel que les fibres musculaires) ou autres (tel que l'hémoglobine)¹, les protéines sont omniprésentes chez les organismes.

Elles peuvent être actives en soi ou peuvent impliquer une association protéique pour former un complexe actif. Ces mêmes associations protéiques sont impliquées dans une grande variété de processus biologiques tel que la dimérisation de récepteurs², les interactions protéiques conduisant à la stimulation ou l'inhibition de la transmission de signaux³, la traduction⁴, la transcription⁵, la réplication⁶, la différenciation cellulaire⁷, la mort et la survie cellulaire⁸. Elles peuvent également être très spécialisées tel que dans les processus de sécrétion, d'activité électrique ou de motilité chimiotactique. Chez les mammifères, elles modulent l'activité de la plupart des voies biochimiques menant à l'activation des gènes⁹. De plus, lorsque le contrôle des voies de signalisation est défaillant, plusieurs maladies peuvent survenir tel le cancer et les maladies dégénératives³.

Dû à la grande biodiversité de ce mode d'action, il est très important de posséder les outils nécessaires à l'étude des appositions protéiques. Il existe plusieurs méthodes pour y parvenir tel que le système de recrutement SOS¹⁰, la complémentation de la β -galactosidase^{11,12}, le système du double-hybride chez la levure^{13,14,15}, le Split Ubiquitin^{16,17,18}, le BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)^{19,20}. De plus, ces dernières années, deux nouvelles techniques ont vu le jour, soit le PCA (Protein Fragment Complementation Assay) et le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).

Le PCA est un procédé qui permet d'étudier des interactions protéines-protéines avec une grande sensibilité et spécificité chez les bactéries^{21,22,23} ou les cellules de mammifères^{24,25}. Il est aussi possible de réaliser des études cinétiques permettant de quantifier les interactions étudiées²⁵.

Le PCA est une technique qui vise à fusionner, à la surface des protéines d'association, des fragments d'enzyme (voir figure 1.1). Lorsque les protéines ne sont pas apposées, l'enzyme n'est pas complète et par conséquent ne peut transformer son substrat en produit. Par contre, si l'association a lieu, les deux fragments d'enzyme s'unissent pour reformer une enzyme active qui peut alors transformer le substrat en produit. La présence de ce dernier est donc représentatif d'une association protéique.

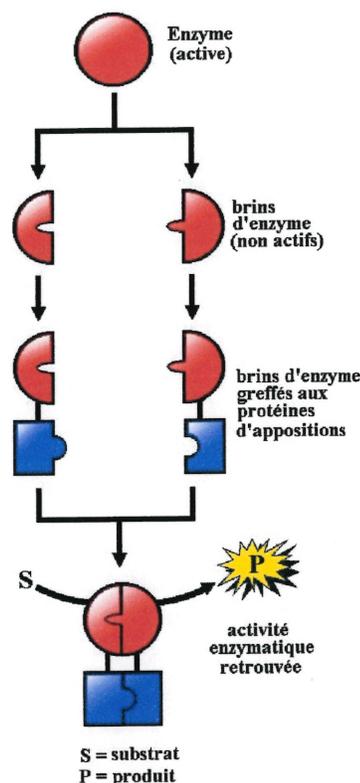


Figure 1.1 : Principe du PCA (Protein Complementation Assay).

Ce système est utilisé dans plusieurs domaines de la recherche, allant de la biologie cellulaire à l'étude fondamentale du repliement protéique.

Pour sa part, le FRET est une technique qui fait appel à un transfert d'énergie de fluorescence par la résonance²⁶. 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 transférée 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 1.2).

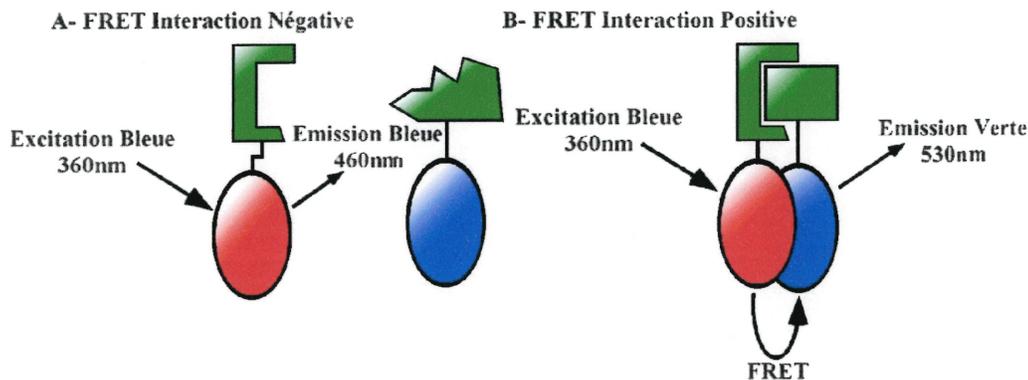


Figure 1.2 : Principe du FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*).

En FRET, lorsque l'on excite la EBFP en absence d'interaction protéique, celle-ci ne peut transmettre son énergie d'émission à la GFP, on note alors une fluorescence bleue d'une longueur d'onde de 460nm. Par contre, lors d'une interaction positive, il y a transfert d'énergie de la EBFP à la GFP qui émet maintenant une fluorescence verte à 530nm.

Le pouvoir de localiser l'interaction directement au niveau cellulaire procaryotique ou mammifère ainsi que la capacité de mesurer directement l'interaction sans la présence d'un intermédiaire sont les principaux avantages de ce système. Les contraintes structurales imposées par le système constituent cependant la limite de cette technique. 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.

Toutefois, un groupe de recherche²⁷ a pu étudier 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.

Grâce à ce genre de technique, étudiant les associations de fragments protéiques, plusieurs questions fondamentales sur la structure des gènes²⁸, sur les repliements protéiques^{29,30}, et sur le rôle de la structure tridimensionnelle des protéines lors de la catalyse enzymatique³¹ ont pu être résolues.

La limite de la plupart de ces techniques est qu'elles signalent une conséquence de l'apposition (par exemple la concentration de protéines transcrites) plutôt que l'apposition elle-même. De plus, il est important de signaler que jusqu'à aujourd'hui, il était difficile et laborieux d'étudier ces appositions puisque les techniques impliquaient des voies de synthèse protéique laborieuses et des changements de propriété intrinsèque minime (en terme de fluorescence, d'absorbance et autres).

Les études du Dr. Roger Tsien³² repose sur la fluorescence de composés fluorogènes au sein d'une protéine. Leur approche exploite une liaison covalente entre un organoarsénique et deux paires de thiols (provenant de cystéine dans une protéine).

Ce type de liaisons est responsable de la plupart des causes de toxicité des composés à base d'arsénique et est complètement réversible par un petit dithiol vicinal comme le 2,3-dimercaptopropanol ou comme le 1,2-éthanedithiol (EDT), lequel forme un complexe avec l'organoarsénique^{33,34}.

Ici, un grand nombre de cystéines est impliqué dans la liaison au composé fluorogène afin d'éviter les affinités fortuites. En effet, le système implique quatre cystéines contenues dans la portion hélice α d'une protéine CCXXCC (la protéine utilisée est acétyl-WEAAAREACCRECCARA-amide³⁵, une protéine mutée basée sur les études d'une autre protéine, la acétyl-W(EAAAR)_n A-amide³⁶ reconnue pour faire des hélices α).

Le composé fluorogène choisi est appelé FLASH-EDT₂ (pour "fluorescein arsenical helix finder, bis-EDT") a été préparé par transmétallation^{37,38} à partir d'une fluorescein contenant deux acétates de mercure suivie de l'addition de EDT (pour faciliter la purification) tel que présenté à la figure 1.3. 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 (selon l'auteur) par la petite taille du EDT qui permet la rotation du lien aryl-arsenique et l'état excité est atténué par une désactivation vibrationnelle ou par une photoinduction de transfert d'électrons. 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), il semble que la forme FLASH-peptide soit très largement favorisée en condition diluée.

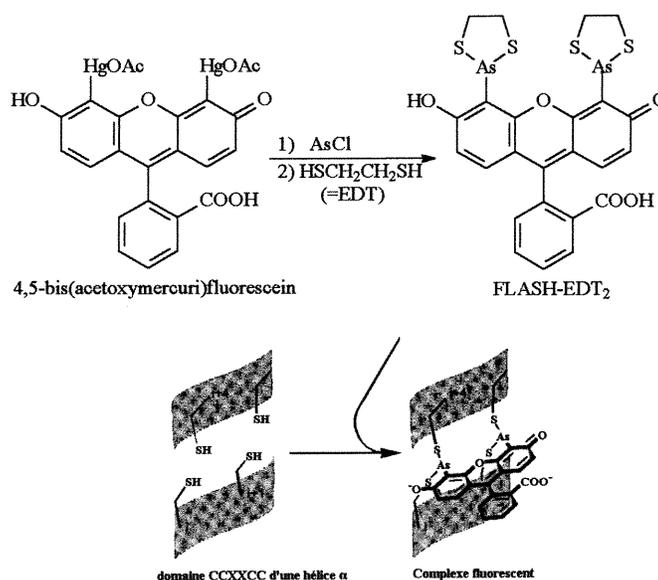


Figure 1.3 : a) Voie de synthèse du FLASH-EDT₂.
b) Insertion du FLASH-EDT₂ dans le domaine protéique CCXXCC de l'hélice α .

Le concept de cette étude constitue un grand pas en avant pour l'étude fluorométrique des protéines et servira de fil conducteur à nos recherches.

Le système parfait pour l'étude d'apposition protéique consisterait donc en une molécule capable de ne pas changer la structure des protéines d'apposition mais

plutôt de s'y lier de manière irréversible. Cette liaison devrait alors induire une modification de propriétés physiques du système. Le Docteur Roger Tsien a fait des études dans ce sens en élaborant une molécule fluorogène (tel que décrit plus haut) mais celui-ci étudie la conformation d'une protéine unique. Nous nous proposons donc d'établir une molécule fluorogène capable de détecter uniquement et spécifiquement l'apposition protéique.

1.2 Choix des protéines d'apposition

Dans toutes les protéines du corps humain, certaines ont pour rôle de s'associer pour former des homodimères (deux protéines identiques ensembles) ou des hétérodimères (deux protéines différentes ensembles). Par exemple, les protéines à domaines Leucine-Zipper entrent dans cette catégorie. Elles ont pour rôle de se lier, sous forme de dimères, à une région précise de l'ADN, initiant ainsi la transcription de l'ADN en ARN messager.

La structure primaire du Leucine-Zipper est très variable, mais possède toujours certaines caractéristiques conservées. Le Leucine-Zipper est un domaine d'une protéine, et adopte une hélice α comme structure secondaire. Certains acides aminés reconnus pour aider à former ce genre de structure s'y retrouvent³⁹. La chaîne primaire s'enroule tel que démontré à la

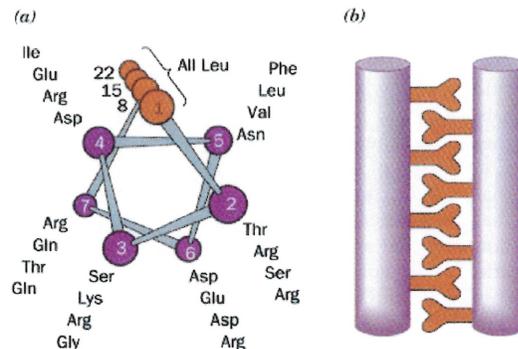


Figure 1.4 : a) Structure d'une Leucine-Zipper.
b) Complexe protéine-protéine.

figure 1.4a de telle sorte qu'un alignement est observable à tous les sept acides aminés. Une série de leucines est habituellement présente sur l'une de ses faces. Dans des solutions aqueuses, il s'en suit une région hydrophobe très désavantageuse d'un

point de vue énergétique. L'association des régions hydrophobes de deux domaines de ce type a pour effet de stabiliser chacune des protéines. L'association est faite grâce aux leucines qui s'intercallent les une entre les autres, d'où le nom de Leucine-Zipper (voir figure 1.4b).

Une étude traitant du passage de la structure primaire à la structure tertiaire du Leucine-Zipper monomérique de type GCN4 a été publié récemment⁴⁰. Il semble qu'une hélice α spontanée se crée dans la portion C-terminale. Par la suite, les deux petites hélices α peuvent s'apposer, tel que représenté à la figure 1.5a. L'alignement parallèle des deux monomères induit ensuite le reste de l'enroulement; c'est-à-dire la structure tertiaire sous forme d'hélice α dans sa totalité.

Le même article a permis de démontrer qu'en l'absence de la portion C-terminale dans chacune des protéines, aucune formation autonome d'hélice α ne peut se produire. Par conséquent, l'alignement parallèle ne se réalise pas, de telle sorte qu'aucune structure tertiaire de type hélicoïdal ne peut être observée (voir figure 1.5b).

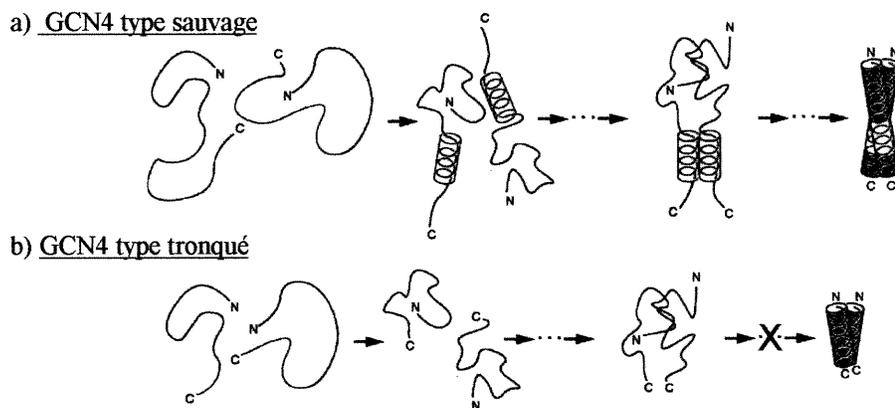


Figure 1.5 : a) Association protéique du Leucine-Zipper GCN4 de type sauvage. b) Association protéique du Leucine-Zipper GCN4 tronqué.

1.3 Choix de la molécule fluorogène

D'autres articles, portant sur la fluorométrie furent d'un grand intérêt^{41,42}. On y rapportait des fluorophores de type naphtopyranone inter-reliés à des groupements maléimides (voir figure 1.6). Ces structures ont la particularité d'être relativement peu fluorescentes. Par contre, lorsque le maléimide réagit avec un atome de soufre (de manière très sélective), la fluorescence devient alors beaucoup plus importante. Ce phénomène sera détaillé à la section 5.1.

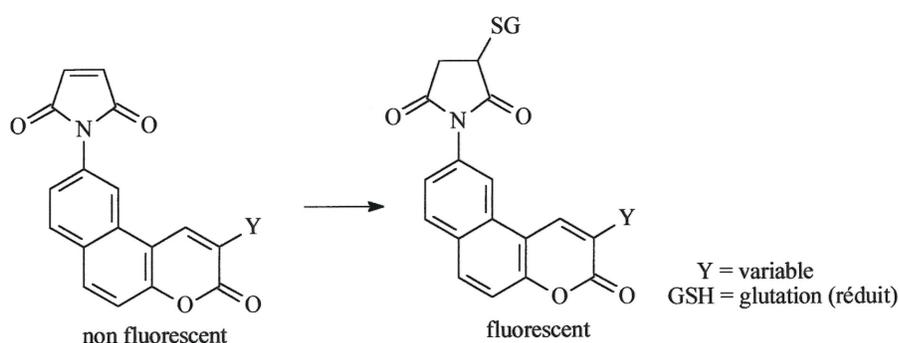


Figure 1.6 : Structure et comportement fluorométrique de la 9-[1H-Pyrrole-2,5-dione]-3H-naphtho[2,1-b]pyran-3-one.

La combinaison des résultats de ces deux groupes de recherche a permis de constater qu'il serait possible de visualiser l'apposition protéique par fluorométrie. En effet, il a été noté que GCN4 tronqué ne pouvait conduire à l'hélice α . Il semble donc logique de croire que GCN4 tronqué et muté aurait le même effet (voir figure 1.7a).

a) GCN4 muté



b) GCN4 avec protéine d'apposition

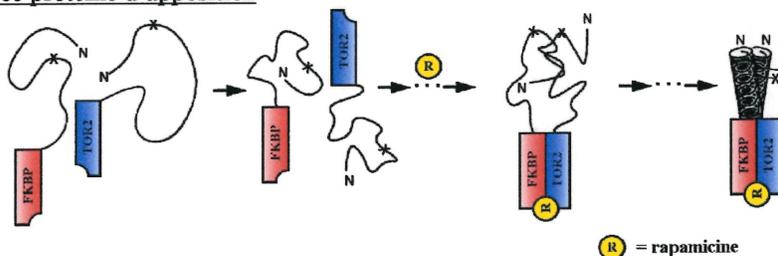


Figure 1.7 : a) Association protéique de GCN4 tronqué et muté.

b) Association protéique de GCN4 tronqué et muté avec des protéines d'apposition.

Ici, la mutation d'un acide aminé par un autre au niveau de la séquence primaire est symbolisée par un x. Une substitution d'un acide aminé dans la portion N-terminale ne peut avoir à elle seule le pouvoir de générer une hélice α spontanée. Ainsi, toute la cascade d'événements devrait demeurer inchangée. La mutation désirée implique la substitution d'un acide aminé sur chacune des protéines. En effet, elle doit se réaliser sur des acides aminés différents soit la lysine 08 pour l'un des fragments et l'acide glutamique 10 pour l'autre, tous deux transformés en cystéine. Ils ont été sélectionnés puisqu'ils sont orientés vers le solvant et ne nuisent pas à l'enroulement du Leucine-Zipper.

Dans le cas où la portion C-terminale demeurerait entière (avec pour seul changement la mutation dans la portion N-terminale), il serait impossible de contrôler l'association. Par conséquent, certaines Leucine-Zipper auraient une association Cys 08 – Cys 10 (hétérodimérisation), mais d'autres seraient sous la forme Cys 08 – Cys 08 ou encore Cys 10 – Cys 10 (homodimérisation).

Une façon de remédier à ce problème est de tronquer la portion C-terminale et de la substituer par deux protéines d'apposition hétérodimérique. Pour réaliser ce travail, FKBP et TOR2 semblent un choix judicieux puisqu'ils se reconnaissent spécifiquement et exclusivement en présence de la rapamicine³⁹. Par cette méthode, une seule association serait possible. Ceci aurait pour effet de rapprocher les Leucines-Zipper suffisamment près pour que la formation de l'hélice α puisse se réaliser (voir figure 1.7b). Fait à noter, FKBP porte la queue du Leucine-Zipper avec la mutation Cys 08 et TOR2 porte la queue du Leucine-Zipper avec la mutation Cys 10.

Les mutations de Lys 08 et Glu 10 en cystéines sont importantes puisqu'une fois l'hélice α complétée, les deux fonctions thiol des cystéines se trouvent à 10,4 Å l'une de l'autre. Ces données furent modélisées à partir de la structure cristalline des protéines natives.

Dans le cas où il n'y a pas d'apposition protéique, le fluorophore ne devrait pas agir en tant que réactif bivalent qui ancrerait les deux monomères ensemble. Un contrôle important à faire est donc de vérifier s'il y a de la fluorescence lors des tests, en absence de rapamycine.

1.4 Objectif

La stratégie est alors de synthétiser un fluorophore qui contient deux maléimides (groupements réactionnels spécifiques aux sulfures) inter-reliés par des

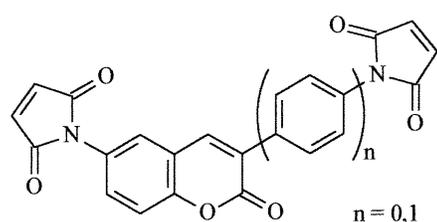


Figure 1.8 : Structure proposée pour la synthèse des fluorogènes.

fonctions aromatiques et distants d'une dizaine d'Ångstroms (voir figure 1.8). Lorsque non lié à des cystéines, celui-ci doit être non fluorescent. De plus, la substitution avec les cystéines doit induire une forte fluorescence.

Les mutations Lys08Cys et Glu10Cys se trouvant à mi-chemin de la portion N-terminale du Leucine-Zipper, il semble peu probable qu'une hausse de fluorescence soit due à l'association fluorophore-protéines d'apposition sous sa forme non hélicoïdale puisqu'il y aurait un fort encombrement stérique.

Les fluorophores proposés ne peuvent être des naphthopyranones, comme ceux présentés précédemment, puisque la distance entre les maléimides serait inappropriée. Par contre, la 3,6-bismaléimidocoumarine (lorsque $n=0$) offre une distance tout à fait acceptable de 10,8 Å, une distance calculée par la minimisation stérique du composé sur le logiciel HyperChem (voir figures 1.9a et 1.9b). Par prévention, il serait sage de construire une molécule de distance trop élevée dans le but de confirmer l'absence d'apposition. La structure 3-(*p*-phénylmaléimido)-6-maléimidocoumarine (lorsque $n=1$) offre une distance de 15,4 Å, une distance trop grande pour une telle apposition protéique (voir figures 1.9c et 1.9d).

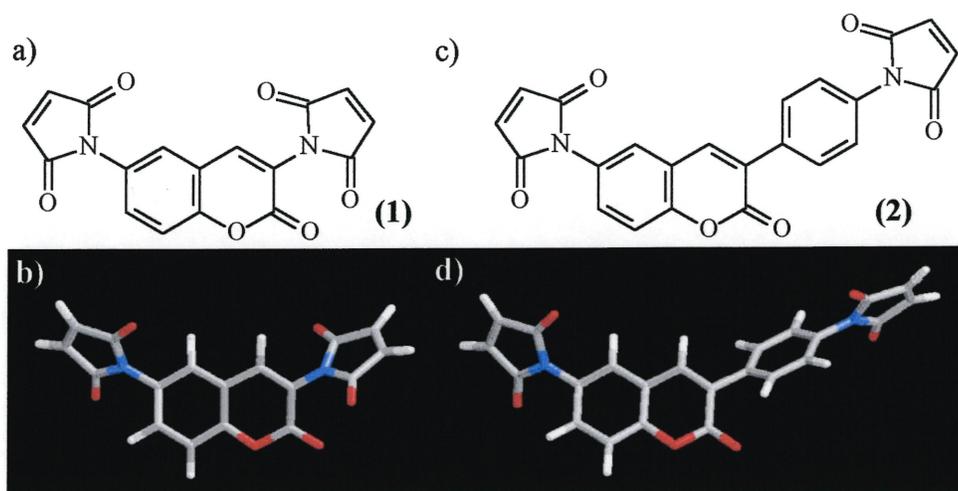


Figure 1.9 : a) Structure de la 3,6-bis(maléimidocoumarine). b) minimisation stérique de la 3,6-bis(maléimidocoumarine). c) Structure de la 3-(p-phényl-maléimido)-6-maléimidocoumarine. d) Minimisation stérique de la 3-(p-phényl-maléimido)-6-maléimidocoumarine.

Il serait peu raisonnable de se lancer dans la synthèse des protéines et des fluorophores sans leur faire passer une série de tests préalables. En effet, pour s'assurer que les fluorophores répondent bien aux attentes, ils devront subir deux tests (voir figure 1.10). Dans un premier temps, ils devront tous deux réagir avec deux équivalents d'une molécule portant un thiol. La réponse devra être une hausse significative de fluorescence. Dans un deuxième temps, ils devront être en mesure de se lier à une molécule portant un dithiol et une fois de plus, voir une hausse marquée de fluorescence.

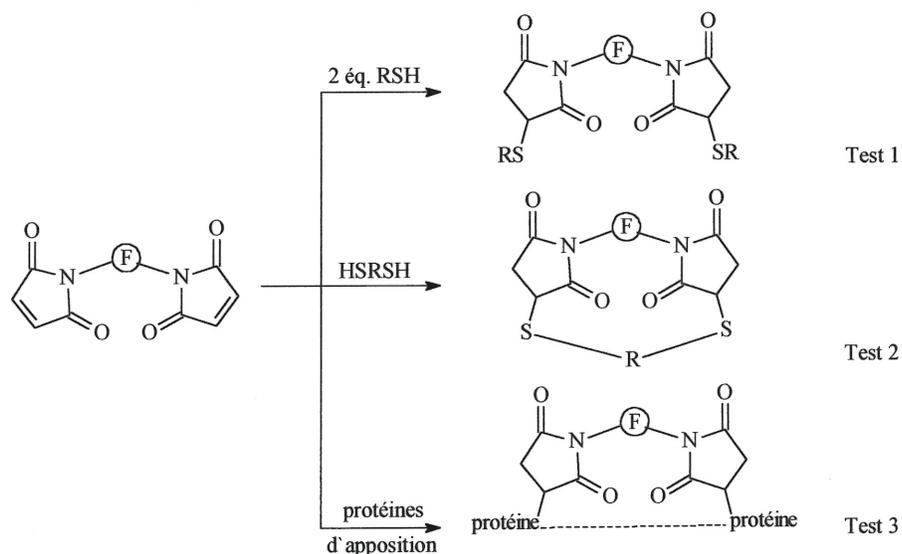


Figure 1.10 : Visualisation des tests à effectuer sur les fluorophores.

Le choix des dithiols, quant à eux, ne doit pas être négligé. Plusieurs molécules ont été suggérées, mais par souci de commodité de synthèse, le choix final s'est porté sur le BMMB (4,4'-bismercaptométhylbenzophénone) qui offre deux soufres distants de 10,6 Å et qui, par le fait même, mime très bien les soufres de la protéine (voir figures 1.11a et 1.11b) par l'orientation des groupes SH. De plus, si un test négatif est effectué sur une molécule de distance inappropriée, il faut toutefois s'assurer qu'une apposition adéquate induit bel et bien de la fluorescence. Ainsi, un second dithiol d'une distance entre les soufres de 15,8 Å doit être réalisé (voir figures 1.11c et 1.11d). La synthèse de ces nombreuses molécules et le comportement de celles-ci seront décrits plus loin.

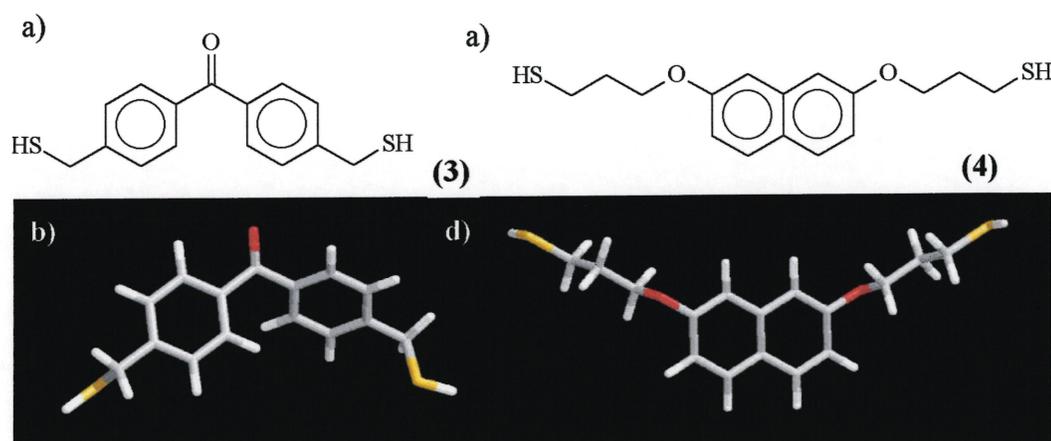


Figure 1.11 : a) Structure du BMMB. b) Minimisation stérique du BMMB. c) Structure du 2,7-Bis(3-mercaptopropionate) de naphthalène. d) Minimisation stérique du 2,7-Bis(3-mercaptopropionate) de naphthalène.

Lorsque toutes ces molécules seront réalisées et testées, les protéines pourront être synthétisées pour le test final, soit une étude d'apposition protéique mesurée à l'aide de la fluorescence.

2 Étude de synthèse

2.1 Voie de synthèse du fluorophore (1)

Une étude bibliographique a permis de constater que la synthèse de la 3,6-bismaléimidocoumarine était partiellement connue, soit jusqu'à la synthèse du 3,6-diamino[2H-1-Benzopyran-2-one]^{43,44}. Par soucis de commodité, l'élaboration du fluorophore s'inspire donc des travaux publiés, suivi de l'adaptation d'une autre publication⁴² en ce qui concerne les dernières étapes de synthèse (voir figure 2.1).

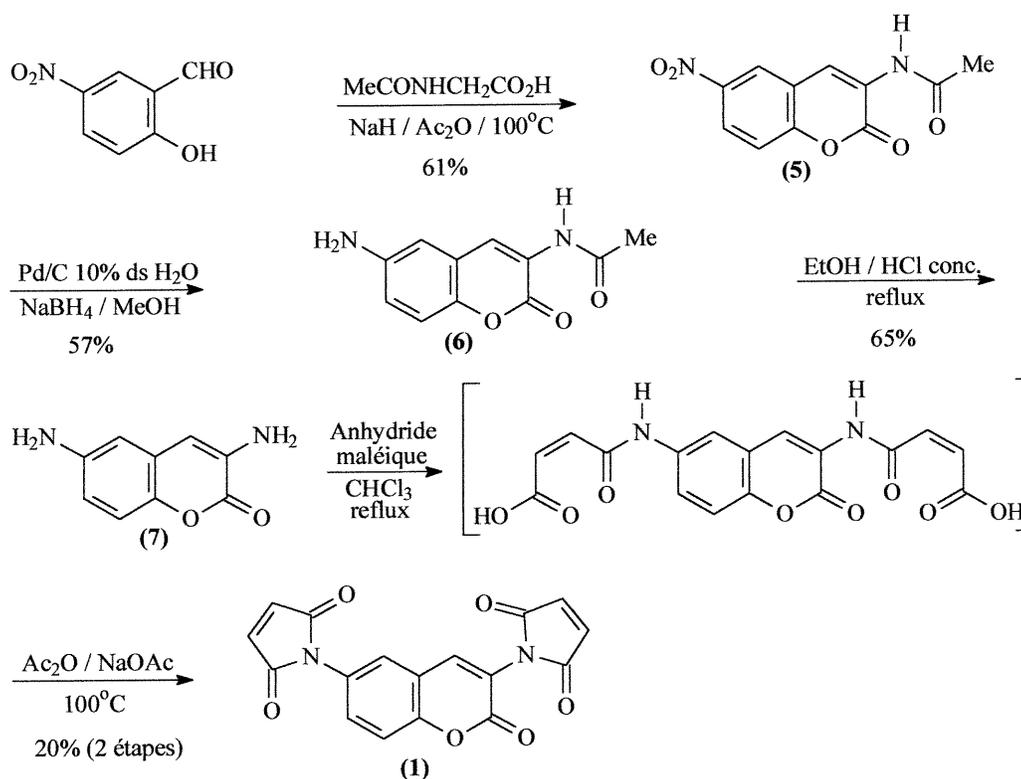


Figure 2.1 : Voie de synthèse du 3,6-bis[1H-pyrrole-2,5-dione]2H-1-benzopyran-2-one.

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, l'alcool déprotoné du 2-hydroxy-5-nitrobenzaldéhyde doit attaquer la fonction acide de la N-acétylglycine. Puisque cette dernière est beaucoup plus acide qu'un phénol ($\text{pK}_a = 4,8$ pour l'acide versus $7,2$ pour

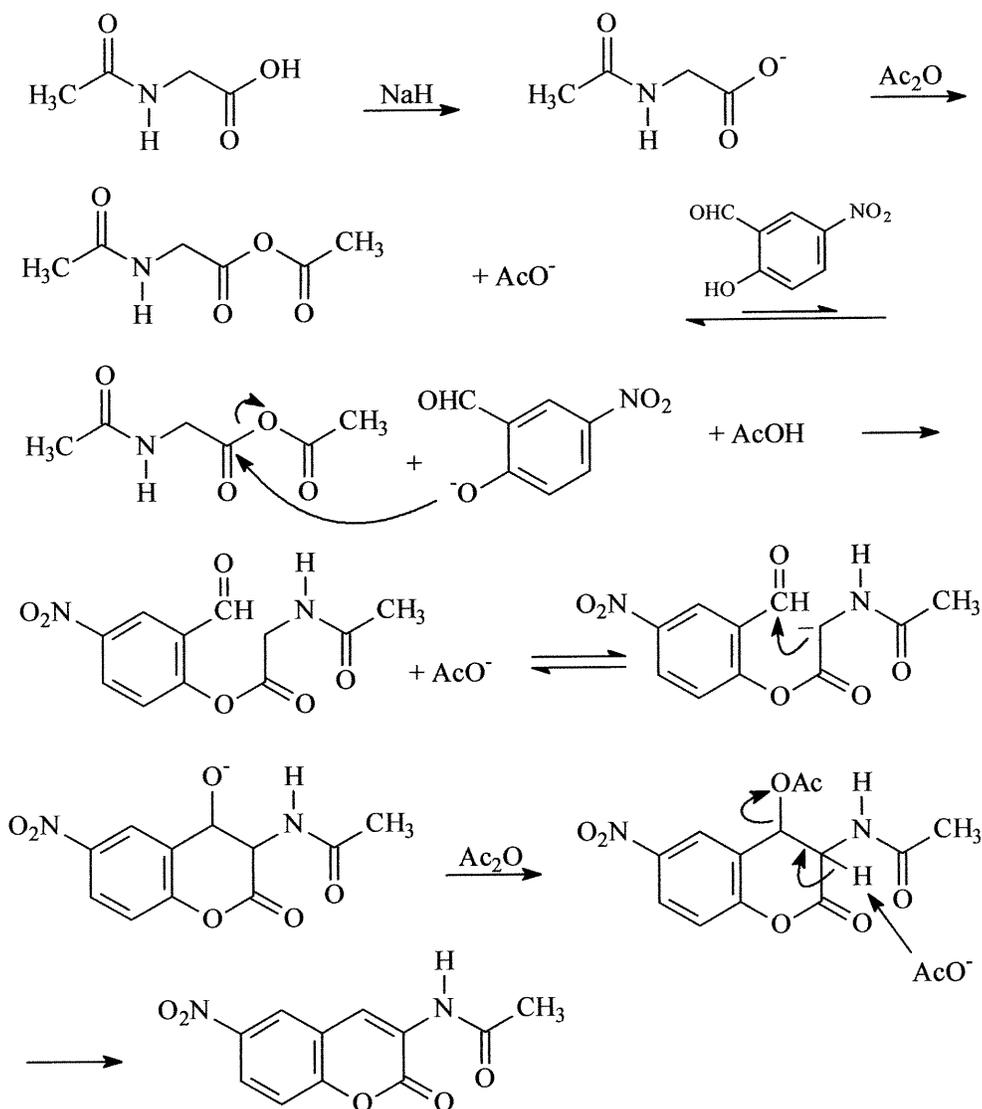


Figure 2.2 : Mécanisme de synthèse du 3-acétamido-6-nitro[2H-1-benzopyran-2-one].

un *p*-nitrophénol), l'équilibre est déplacé vers la gauche et la réaction est donc lente et difficile (voir le mécanisme à la figure 2.2). De plus, la nucléophilie du phénolate est diminuée par la présence de la fonction nitro en para (un groupement électroattracteur). Cette étape est donc lente et requiert un chauffage prolongé afin d'optimiser le rendement. En effet, un reflux d'une heure offre un rendement de 38%. Si le reflux est maintenu pour deux heures, celui-ci passe à 44%, alors qu'un reflux pour la nuit optimise la réaction à 61%.

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 (5) est ainsi obtenue.

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'hydrogène. 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 diméthylformamide, il est préférable d'utiliser le méthanol puisque le DMF semble solubiliser partiellement le charbon (présent avec le palladium) et ce, même après de multiples filtrations sur une couche de célite. Par le fait même, les tests subséquents utilisant des produits soufrés seraient inefficaces, car les soufres se lient aux atomes de carbone plutôt qu'aux maléimides du fluorophore. 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 (6) à l'aide d'acide 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 2.3).

Ainsi, l'éthanol attaque uniquement le carbonyle de la fonction amide pour former la fonction amine libre de la molécule (7) et de l'acétate d'éthyle. Le rendement de cette réaction est ainsi évalué à 65%.

La quatrième étape consiste en l'attaque du doublet de chacune des fonctions amines sur un carbonyle de l'anhydride maléique. Suite au départ d'un hydrogène porté par l'azote, 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 a une configuration *cis*, ce qui est essentiel pour l'étape suivante. Puisqu'aucune attaque n'est faite sur les carbones portant la double liaison, cette configuration est conservée au cours du mécanisme.

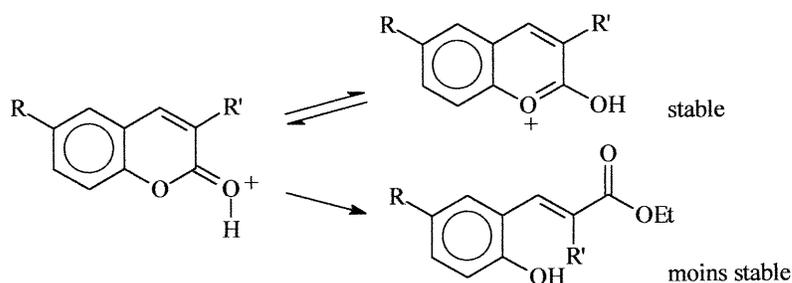


Figure 2.3 : Représentation de la stabilité de la lactone par l'aromaticité de la molécule.

Toutes ces étapes de réaction doivent se réaliser 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 offre 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. Celles-ci sont possible après l'attaque du doublet de l'amide sur le carbonyle de la fonction acide (voir le schéma 2.4). 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.

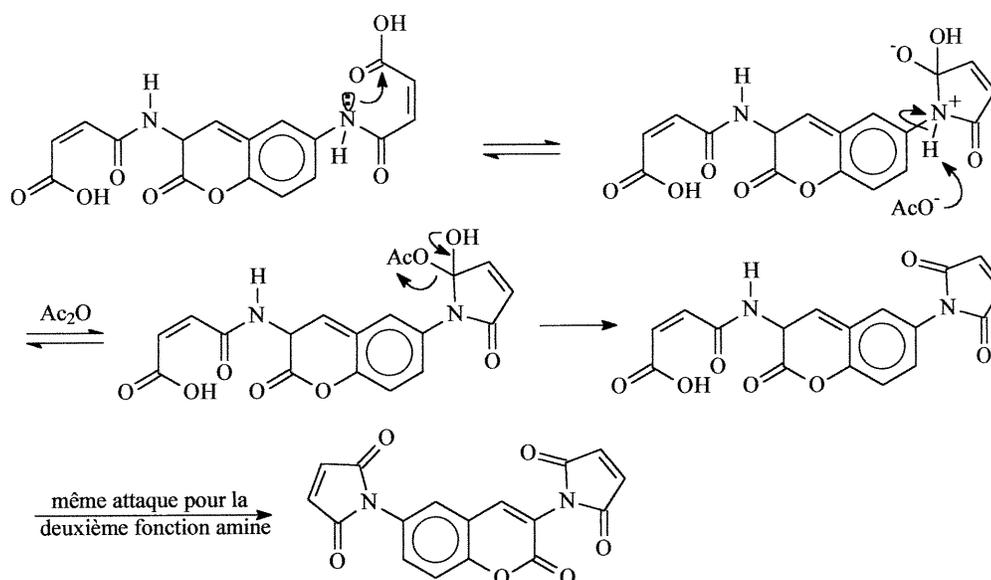


Figure 2.4 : Mécanisme de synthèse des maléimides.

La molécule finale est complétée après la cyclisation des deux fragments de la molécule dans un rendement de 20%. 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%).

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

2.2 Voie de synthèse du fluorophore (2)

La synthèse de cette molécule a été inspirée des réactions décrites à la section 2.1. En effet, le seul changement majeur est la présence d'un espaceur de type phényle. Par conséquent, la réactivité des groupes fonctionnels demeure sensiblement les mêmes. La voie de synthèse est décrite à la figure 2.5.

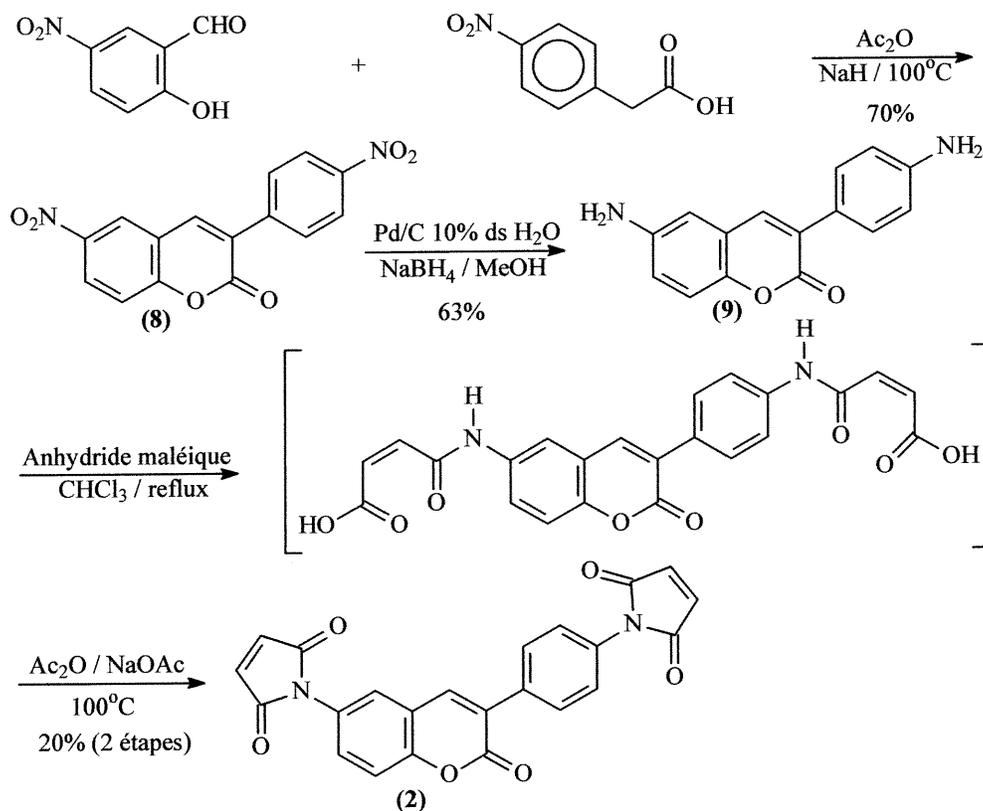


Figure 2.5 : Voie de synthèse de la 3-(p-maléimidophényl)6-maléimidocoumarine.

La première étape de réaction est très semblable à celle du fluorophore (1). Le 2-hydroxy-5-nitrobenzaldéhyde est une fois de plus utilisé, mais cette fois, en présence de l'acide 4-nitrophénylacétique. Le mécanisme est donc identique à celui présenté à la figure 2.2. La seule véritable différence réside dans la portion amide. Dans une publication⁴², la piperidine est utilisée pour faire ce genre de réaction. Toutefois, de telles conditions pour ce cas particulier ne permet pas d'obtenir le produit attendu. En effet, une base beaucoup plus forte doit être utilisée, d'où la présence d'hydrure de

sodium. La réaction se comporte de la même manière que celle pour le fluorophore (1) mais offre, cette fois, un rendement de 70%.

La deuxième étape de synthèse est une hydrogénation utilisant le NaBH_4 tel que décrit à la section 2.1. L'avantage de cette réaction est la réduction des deux fonctions nitro en fonction amine. La double liaison en position trois de la coumarine n'est pas réduite lors de l'hydrogénation puisqu'elle est contenue dans un cycle aromatique. L'hydrogénation réduit donc spécifiquement les groupements fonctionnels amino. Le rendement de cette réaction s'élève à 63%.

Les dernières étapes de synthèse sont l'attaque de ces mêmes groupements amino sur l'anhydride maléique, suivie de la formation des maléimides à la suite d'une deuxième attaque par le même azote. Les mécanismes de réaction sont identiques à ceux présentés à la section précédente. Les conditions et le rendement de la réaction sont identiques à la réaction impliquant le fluorophore (1), soit un chauffage à 100°C pour une durée totale de 30 minutes offrant un rendement (2 étapes) de 20%.

Cette synthèse a donc été effectuée avec un rendement global de 9%.

2.3 Voie de synthèse du dithiol (3) pour le fluorophore (1)

Une fois de plus, une étude bibliographique a permis de constater que cette synthèse était connue^{46,47} (voir figure 2.6). Tel que décrit dans l'introduction, les thiols du BMMB (4,4'-bis(mercaptométhyle)benzophénone) sont distants de 10,6 Å l'un de l'autre. Ainsi, une apposition devrait être possible entre ce dithiol et le fluorophore (1) qui possède ses deux portions réactives (les maléimides) espacés de 10,8 Å.

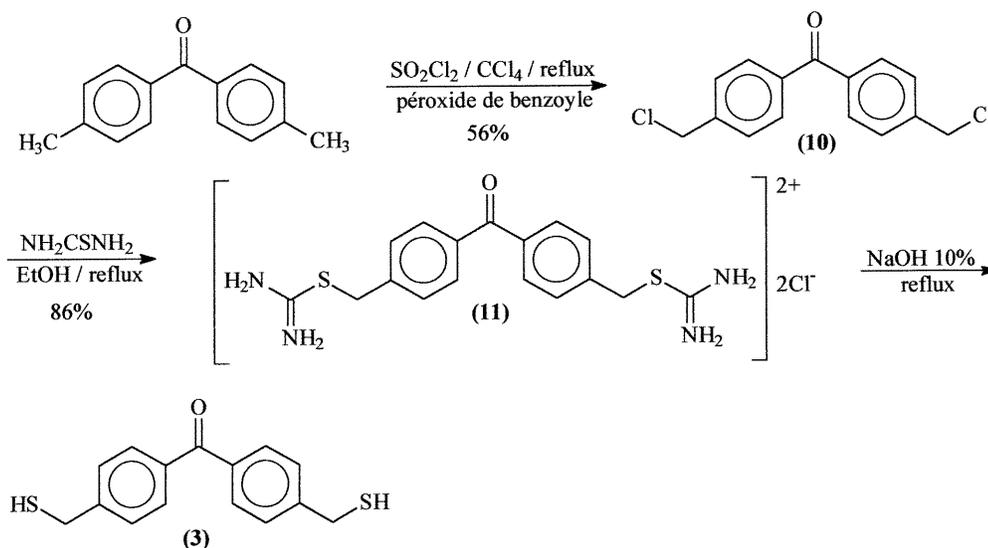


Figure 2.6 : Voie de synthèse du 4,4'-bis(mercaptométhyle)benzophénone (3).

Les étapes de synthèse d'une telle molécule sont relativement simples. La première d'entre elles consiste à halogéner les deux groupements méthyles du 4,4'-diméthylbenzophénone (BMB). Il s'agit d'une adaptation de la réaction de Connerade⁴⁹ qui utilisait de l'acétate d'argent comme activateur. Ce procédé conduisait à un produit brut très difficile à purifier, ce qui n'est pas le cas ici. Ce type de réaction implique la formation d'espèces radicalaires qui se déclarent lorsque le peroxyde de benzoyle se scinde en deux molécules de benzoyloxy. Par la suite, la phase d'initialisation (amorce) peut se réaliser. Cette étape consiste à arracher un hydrogène en position 4 du BMB par voie radicalaire. Ainsi, l'acide benzoïque et le BMB radicalaire sont générés. Cette réaction est possible puisque le radical ainsi formé est stabilisé grâce à une grande délocalisation par résonance dans le cycle aromatique.

Dans un deuxième temps vient l'étape de propagation. Elle implique le radical du BMB et un lien Cl-S du chlorure de sulfuryle. Une fois le chlore transféré sur le BMB, une espèce instable est générée. Le résultat net est la libération de dioxyde de soufre (un gaz) et d'un radical chloré. Celui-ci peut à son tour initialiser la réaction.

Dans un troisième temps, la phase de terminaison est formée de la mise en commun de deux espèces radicalaires (quel que soit leur nature), ce qui forme un produit final non radicalaire. Afin d'optimiser la réaction, le peroxyde de benzoyle doit être ajouté sur une période d'une heure (le rendement est de 53%).

La deuxième étape est la synthèse du chlorure de 4,4'-bis(méthylisothiuronium)benzophénone. Il s'agit d'une substitution nucléophile de deuxième ordre. Ici, le soufre attaque le carbone en α du chlore à la suite d'une activation par le doublet de l'azote du thiourée. Pour se réaliser, la réaction doit être mise à reflux pour une période minimale d'une heure offrant un rendement de 86%.

La dernière étape mène au dithiol désiré, le 4,4'-bis(mercaptométhylbenzophénone) (BMMB). Il s'agit ici de faire attaquer l'hydroxyde de sodium (10% dans l'eau) sur le sel de l'étape précédente. À la suite de son attaque, un doublet de l'oxygène peut expulser le soufre. Ainsi, après neutralisation, le BMMB et l'urée sont générés. Le rendement de cette réaction est de 67%.

Toutes les étapes de cette synthèse étaient déjà connues^{46,47} et par conséquent déjà optimisées. De plus, les rendements obtenus sont concordants avec les résultats décrits en littérature, soit un rendement global de 32%.

2.4 Voie de synthèse du dithiol (4) pour le fluorophore (1)

Le dithiol en question est le 2,7-bis-(3-mercapto-1-hydroxy)naphtalène. Sa synthèse est présentée à la figure 2.7. Elle consiste en une réaction de substitution nucléophile de deuxième ordre suite à la déprotonation des fonctions alcool du 2,7-dihydroxynaphtalène.

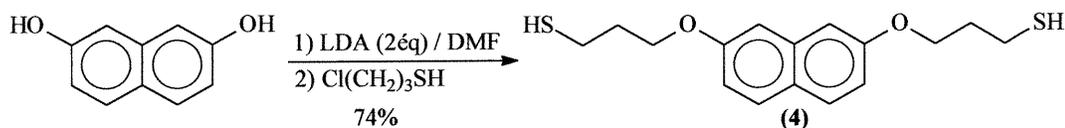


Figure 2.7 : Étapes de synthèse du 2,7-bis-(3-mercapto-1-hydroxy) naphtalène (4).

L'étape de déprotonation est délicate puisqu'une base telle que l'hydrure de sodium n'est pas suffisamment forte pour déprotoner les deux fonctions alcool (deux charges sur un même naphthalène). Ainsi, il faut utiliser un lithien (le LDA) pour remédier à ce problème. De plus, la réaction S_N2 ne se réalise pas dans le tétrahydrofurane comme solvant. Le diméthylformamide doit donc être utilisé afin de permettre la réaction.

En ce qui concerne le thiol, le choix s'est porté sur le 3-chloro-1-propanethiol puisqu'une fois les substitutions réalisées, ils seront distant de 15,8 Å (calculé avec le logiciel HyperChem), ce qui devrait permettre la macrocyclisation sur le fluorophore (2).

Contrairement au dithiol (3), le composé (4) présente le désavantage d'être relativement flexible. Ainsi, il pourra se lier à des fluorophores de taille plus petite que 15,8 Å. Par contre, il faut garder à l'esprit que le fluorophore (2) est distant de 15,5 Å et que cette valeur est la distance minimale pour la liaison. Une macrocyclisation implique donc une élongation maximale du dithiol et une rétention maximale du fluorophore (2). Le rendement de cette réaction s'élève à 74%.

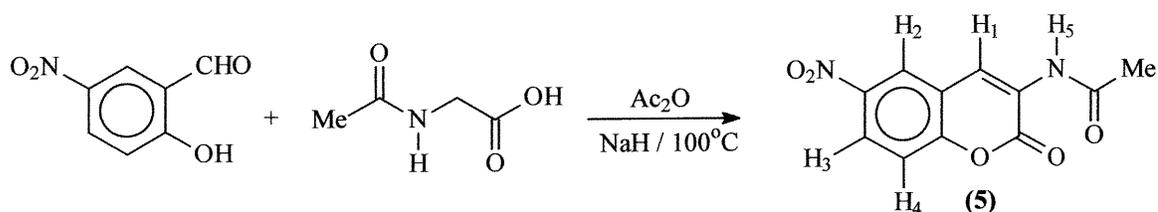
Des tests plus approfondis ont été effectués et seront expliqués à la section 5.3.

3 Partie expérimentale

Matériel utilisé

- Les points de fusions ont été obtenus réalisés sur un appareil de type Uni-melt 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 (300MHz) ou sur un Bruker AMXR400 (400MHz).
- Les spectres de masse ont été faits par la méthode AutoSpecQ FAB + Magnet, grace au centre régional de spectrométrie de masse de l'Université de Montréal.
- Tous les spectres de fluorescence proviennent d'un Perkin-Elmer (Luminescence Spectrometer LS 50B).
- Les analyses d'électrophorèse capillaire ont été faites sur un Thermo Separation Products TM (Spectra PHORESIS [®] 100).

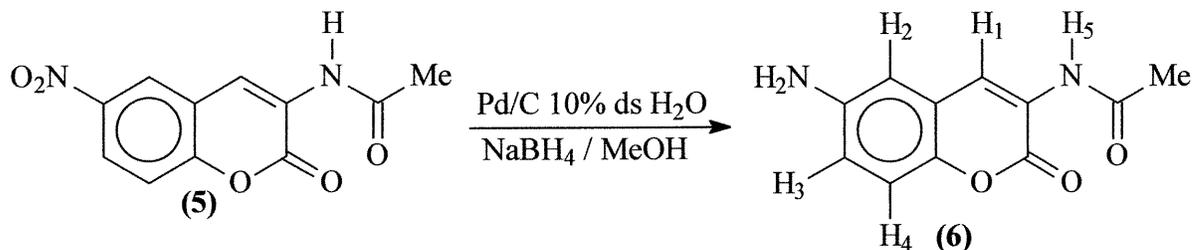
3-Acétamido-6-nitro [2H-1-benzopyran-2-one] (5)



Le 2-hydroxy-5-nitrobenzaldéhyde (7.11 g, 42.5 mmol) est placé dans un ballon sec de 100 mL. Par la suite sont ajoutés la N-acétylglycine (4.98 g, 42.5 mmol) et l'anhydride acétique (40.10 mL). Petit à petit, l'hydrure de sodium (NaH 60% dans l'huile) (1.71 g, 42.5 mmol) est mise dans le ballon. Une solubilisation est alors présente, suivie d'une précipitation importante. Le tout est chauffé à 100°C pendant 20 h. Suite à ce délai, il faut refroidir et ajouter de l'eau (7.11 mL). Ensuite, de l'acide acétique (43 mL) est ajouté et est placé à 4°C pendant 4 h. Le précipité est filtré 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 (5) sous forme d'une poudre beige (6.40 g, 25.8 mmol) dans un rendement de 61%.

- Point de fusion attendu¹³ : 278 °C, point de fusion trouvé 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 du 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

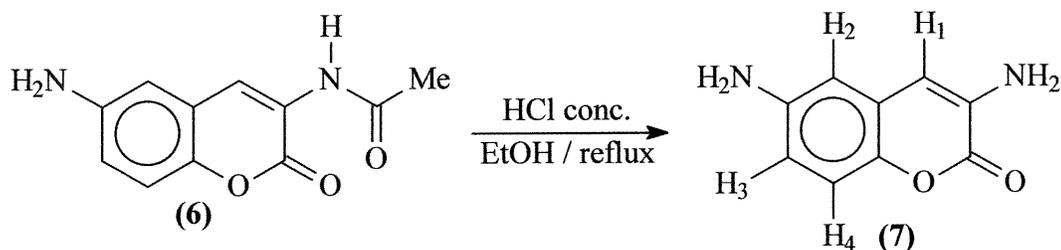
3-Acétamido-6-amino [2H-1-benzopyran-2-one] (6)



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 (1.21g, 32.9 mmol) dans l'eau (22.6 mL) est ajoutée goutte à goutte. Par la suite, une suspension du composé (5) (3.20 g, 12.9 mmol) dans du méthanol (775 mL) est ajoutée sur une période de deux heures laissée à la température de la pièce pour trente minutes puis concentrée et séchée. Il faut ensuite ajouter de l'eau (750 mL) et refroidir à 4°C pendant 20 h. Le précipité est ensuite filtré et rincé avec de l'eau distillée froide. Le solide est recristallisé dans l'éthanol pour obtenir un composé jaune (6) (1.59 g, 7.3 mmol) dans un rendement de 57%.

- Point de fusion attendu¹⁴ : 252 – 253 °C, point de fusion trouvé : 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 Hz, J=2.7 Hz, 1H, H₃), 6.73 (d, J=9.1 Hz, 1H, H₄), 6.68 (d, J=2.7 Hz, 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.
référence¹⁶ : C, 60.27 ; H, 4.59 ; N, 12.81

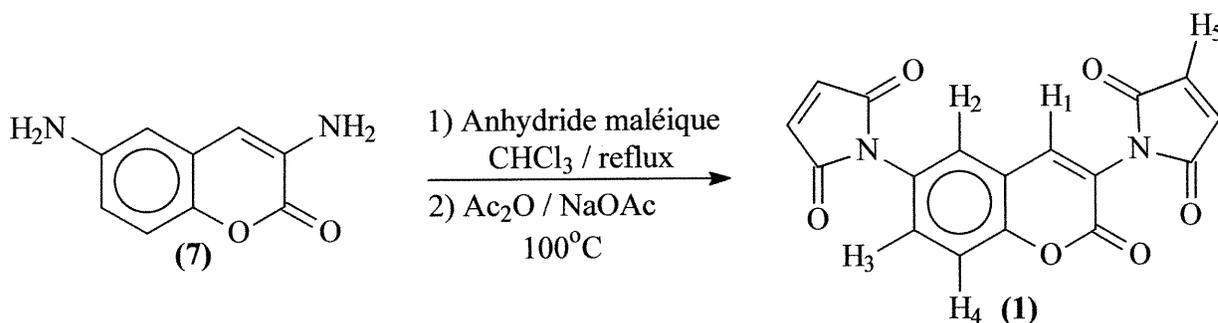
3,6-Diamino [2H-1-benzopyran-2-one] (7)



À une solution d'éthanol (6,32 mL) et d'acide chlorhydrique (12 M) (12,63 mL), le composé (6) (0,919 g, 4,2 mmol) est ajouté. Un reflux est fait pendant trente minutes puis refroidi à 4 °C pour la nuit. Le précipité est filtré, puis redissout dans un minimum d'eau distillée. La solution est neutralisée avec de l'hydroxyde d'ammonium 25%. Par la suite, il faut mettre à 4 °C pour trois heures. Le précipité est filtré et recristallisé dans l'eau et un composé jaune (7) (0,484 g, 2,7 mmol) est obtenu dans un rendement de 65%..

- Point de fusion attendu¹⁴ : 183 - 184°C, point de fusion trouvé 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 Hz, 1H, H₄), 6.56 (s, 1H, H₁), 6.49 (d, *J*=2.4 Hz, 1H, H₂), 6.46 (dd, *J*=10.0 Hz, *J*=2.6 Hz, 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.

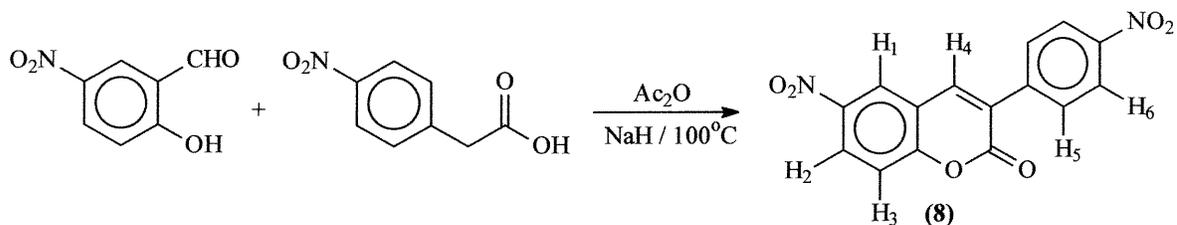
3,6-Bis [1H-pyrrole-2,5-dione] 2H-1-benzopyran-2-one (1)



À une suspension de composé (7) (0.200 g, 1.14 mmol) dans du chloroforme sec (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 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 1h30. Le ballon est ensuite refroidi et de l'eau distillée froide (30 mL) est ajoutée puis, il faut agiter vigoureusement 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

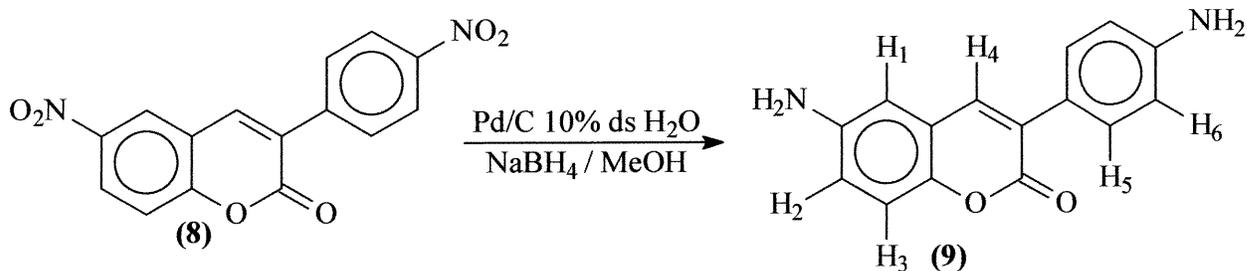
3-(*p*-Nitrophényl)-6-nitro[1-benzopyran-2-one] (8)



Le 2-hydroxy-5-nitrobenzaldéhyde (250 mg, 1,50 mmol) est placé avec l'acide 4-nitrophénylacétique (271 mg, 1,50 mmol) dans un ballon sec de 25 mL. Par la suite, l'anhydride acétique (2,8 mL, 30 mmol) est ajouté puis le tout est agité. À cette suspension, le NaH 60% dans l'huile (60 mg, 1,50 mmol) est ajouté petit à petit puis le milieu réactionnel est chauffé à 100°C pour trois heures. Ensuite, 100 µL d'eau et 3 mL d'acide acétique sont ajoutés. Le tout est refroidi à 4 °C pour une heure, puis filtré en rinçant avec de l'acide acétique froid. Le solide est placé dans un ballon de 100 mL, auquel est ajouté 30 mL de toluène et celui-ci est évaporé. Ce lavage est refait deux autres fois. Le tout est séché sous vide pour obtenir une poudre beige (8) dans un rendement de 70% (325 mg, 1,05 mmol).

- Point de fusion : 250⁰C (dégradation)
- IR (KBr) (cm⁻¹) : 3120 (C-H aromatique), 1620 et 1480 (C=C aromatique), 1750 (C=O lactone), 1540 et 1350 (NO₂)
- RMN ¹H (DMSO-d₆) : δ (ppm) 8.80 (d, *J*=2.6 Hz, 1H, H₁), 8.62 (s, 1H, H₄), 8.47 (dd, *J*=9.1 Hz, *J*=2.7 Hz, 1H, H₂), 8.37 (dd, *J*=8.9 Hz, *J*=2.0 Hz, 1H, H₆), 8.02 (dd, *J*=8.9 Hz, *J*=2.0 Hz, 2H, H₅), 7.71 (d, *J*=9.1 Hz, 1H, H₃)
- RMN ¹³C (DMSO-d₆) : δ (ppm) 159.43, 157.87, 148.46, 144.68, 142.30, 141.50, 130.85, 127.92, 125.77, 124.51, 120.53, 118.64 (Le carbone manquant est du à une superposition de pics et non à un problème de concentration qui empêcherait de voir tous les pics.)
- Masse exacte attendue : 312,038236 g/mol, masse trouvée : 312,039100 g/mol
- Analyse élémentaire de C₁₅H₈N₂O₆ attendue : C, 57.70 ; H, 2.58 ; N, 8.97.
trouvée : C, 57.37 ; H, 2.62 ; N, 8.78

3 (p-Aminophényl)-6-amino[1-benzopyran-2-one] (9)

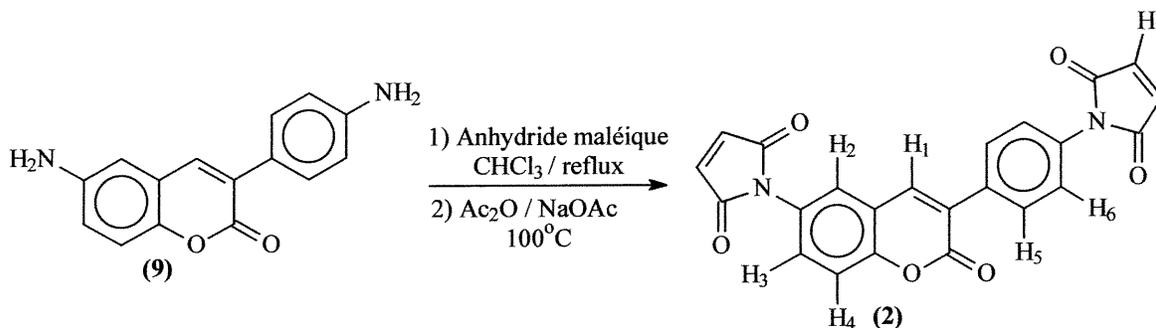


Le Pd/C (10% dans l'eau) (0,322 g) est placé dans un ballon de 1 L, sous courant d'azote, une solution de borohydrure de sodium (1.21 g, 32.9 mmol) dans l'eau (22.6 mL) est ajoutée goutte à goutte. Par la suite, une suspension du composé (8) (4.03 g, 12.9 mmol) dans du méthanol (775 mL) est ajoutée sur une période de deux heures. Le tout est laissé à la température de la pièce pour 30 min puis concentré et séché. De l'eau (750 mL) est ajoutée et le mélange réactionnel est refroidi à 4°C pendant 20 h. Le précipité est filtré et rincé avec de l'eau distillée froide. Une recristallisation dans l'éthanol permet d'obtenir le composé (9) (2.04 g, 8.1 mmol), un solide jaune, dans un rendement de 63%.

- IR (KBr) (cm⁻¹) : 3180 (NH₂), 3120 (C-H aromatique), 1700 (C=O lactone), 1610 (C=C aromatique), 850 (phényl en para)
- RMN ¹H (DMSO-d₆) : δ (ppm) 7.84 (s, 1H, H₄), 7.46 (d, J=8.5 Hz, 2H, H₅), 7.08 (d, J=8.6 Hz, 1H, H₃), 6.79 (d, J=8.5 Hz, 1H, H₂), 6.77 (s, 1H, H₁), 6.60 (d, J=7.8 Hz, 2H, H₆), 5.32 (ds, 3H, NH₂), 5.15 (ds, 3H, NH₂), (constantes en méta invisibles)
- RMN ¹³C (DMSO-d₆) : δ (ppm) 163.34, 150.20, 146.43, 145.43, 137.99, 130.38, 127.88, 123.18, 11.33, 118.85, 116.94, 114.39, 111.04
- Masse exacte attendue : 252,089878 g/mol, masse trouvée : 252,089846 g/mol
- Analyse élémentaire de C₁₅H₁₂N₂O₂ attendue : C, 71.42 ; H, 4.79 ; N, 11.10
trouvée : C, 71.30 ; H, 4.58 ; N, 10.92

3 (p-[1H-pyrrole-2,5-dione]phényl)-6-[1H-pyrrole-2,5-dione]

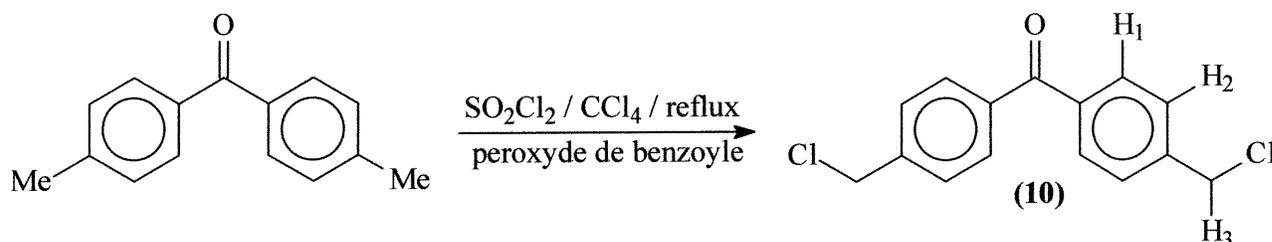
2H-1-benzopyran-2-one (2)



Le composé (9) (400 mg, 1,59 mmol) et l'anhydride maléique (777 mg, 4,77 mmol) sont placés dans un ballon sec de 50 mL. Du chloroforme (15 mL) est ajouté et un reflux est fait pour 20 heures. Une filtration est effectuée en rinçant avec beaucoup de chloroforme et le tout est bien séché. L'anhydride acétique (15 mL) et l'acétate de sodium (130 mg, 1,59 mmol) sont ajoutés et le mélange réactionnel est chauffé à 100 °C pour 1h30, puis refroidi. Un volume d'eau (50 mL) est ajouté et agité vigoureusement pour 30 minutes. Le tout est placé à 4 °C pour 4 h, puis filtré. Il faut enfin, bien sécher sous vide pour obtenir le produit attendu (2), un solide beige, dans un rendement de 20% (131 mg, 0,32 mmol).

- Point de fusion : 250⁰C (dégradation)
- IR (KBr) (cm⁻¹) : 2923 (C-H aromatique), 1721 (C=O lactone), 1615 (C=C aromatique), 1520 (amide tertiaire), 1347 (aryle-N), 853 (phényle para)
- RMN ¹H (DMSO-d₆) : δ (ppm) 8.36 (s, 1H, H₁), 7.87 (dd, *J*=8.9 Hz, *J*=2.0 Hz, 2H, H₅), 7.85 (d, *J*=8.6 Hz, 1H, H₄), 7.60 (dd, *J*=8.6 Hz, *J*=2.6 Hz, 1H, H₃), 7.59 (d, *J*=2.6 Hz, 1H, H₂), 7.45 (dd, *J*=8.9 Hz, *J*=2.0 Hz, 2H, H₆), 7.24 (d, 4H, H₇)
- RMN ¹³C (DMSO-d₆) : δ (ppm) 169.94, 159.60, 152.04, 141.00, 134.90, 133.82, 131.96, 130.50, 130.11, 129.25, 127.88, 126.95, 126.50, 119.77, 117.40, 104.30 (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 : 412,069536 g/mol, masse trouvée : 412,069540 g/mol
- Analyse élémentaire de C₂₃H₁₂N₂O₆ attendue : C, 66.99 ; H, 2.93 ; N, 6.79
trouvée : C, 66.13 ; H, 2.84 ; N, 6.64

4,4' - Bis (chlorométhyle) benzophénone (10)

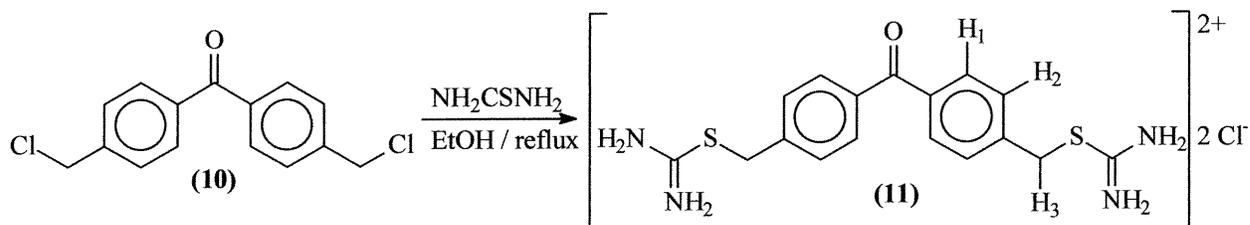


À une solution de 4,4' - diméthylbenzophénone (5 g, 23.78 mmol) dans le tétrachlorure de carbone sec (35.7 mL), est ajouté du peroxyde de benzoyle (60 mg, 0.24 mmol). Le tout est mis à reflux.

À ce mélange, une solution de peroxyde de benzoyle (175 mg, 0.74 mmol) et de chlorure de sulfuryle (4.3 mL, 53.51 mmol) dans du tétrachlorure de carbone (9.5 mL, 98.69 mmol) est ajoutée goutte à goutte sur une période d'une heure. Lorsque l'addition est complétée, un reflux est effectué pendant 16 heures. Le tout est refroidi puis une quantité de 70 mL de tétrachlorure de carbone est ajoutée. Une première extraction est faite avec une solution saturée de carbonate de sodium (3x), suivie d'une extraction avec de l'eau (3x). Le tout est séché, concentré puis recristallisé à $-10\text{ }^\circ\text{C}$ dans une solution cyclohexane : éther de pétrole pour obtenir 3.72 g (13.33 mmol) du composé **(10)**, un solide blanc, dans un rendement de 56 %.

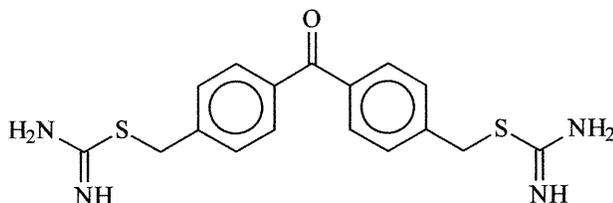
- Point de fusion attendu¹⁷ : $101 - 104\text{ }^\circ\text{C}$, point de fusion trouvé : $100 - 104\text{ }^\circ\text{C}$
- IR (KBr) (cm^{-1}) : 1650 (C=O cétone), 1607 (C=C benzène), 701 à 750 (lien $\text{CH}_2\text{-Cl}$)
- RMN ^1H (CDCl_3) : δ (ppm) 7.79 (d, $J=7.8\text{ Hz}$, 4H, H_1), 7.53 (d, $J=8.0\text{ Hz}$, 4H, H_2), 4.65 (s, 4H, H_3) (constantes en méta invisible)
- Masse exacte attendue : 278,026520 g/mol, masse trouvé : 278,026521 g/mol
- RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ (ppm) 160,00. 141.77, 137.16, 130.33, 128.36, 45.25 .
- Analyse élémentaire de $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{O}$ attendue : C, 64.54 ; H, 4.33 ; Cl, 25.40
trouvée : C, 64.70 ; H, 4.40 ; Cl, 25.25

Sel de 4,4' - bis (isothiouronium) benzophénone (11)

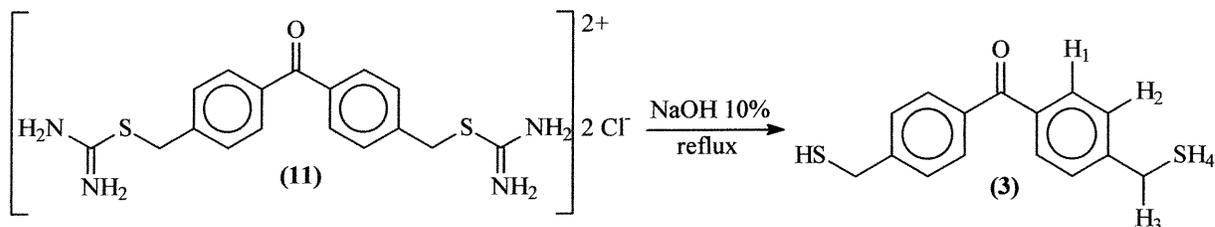


Le 4,4' - bis (chlorométhyl) benzophénone (**10**) (460 mg, 1,48 mmol) est mis dans un ballon sec de 5 mL. La thiourée (251 mg, 3,33 mmol) et l'éthanol (2,2 mL) y sont ajoutés. Par la suite, un reflux est fait pendant 1 h, puis une filtration est effectuée en rinçant avec beaucoup d'éthanol. Le solide est séché puis recristallisé dans l'acide chlorhydrique 0,2 N pour obtenir 500 mg de la molécule (**11**), un solide blanc, offrant ainsi un rendement de 86 %. Le produit peut aussi être directement remis en réaction pour l'étape suivante sans recristallisation.

- RMN ^1H (D_2O) : δ (ppm) 7.80 (d, $J=7.9$ Hz, 4H, H_1), 7.63 (d, $J=7.7$ Hz, 4H, H_2), 4.52 (s, 4H, H_3) et D_2N - invisible. La formule brute de cette structure est $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{OS}_2$, donc son poids moléculaire est de 431,39 g/mol. Par contre, le sel n'est pas visible par analyse de spectroscope de masse, il s'agit plutôt de cette molécule :



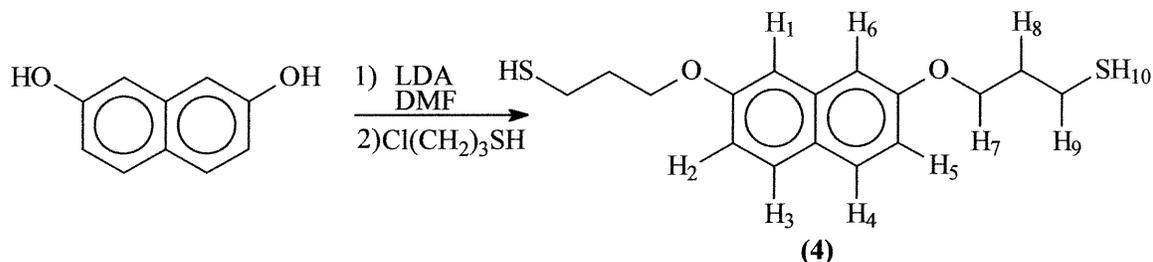
4,4' - bis (mercaptométhyl) benzophénone (3)



Le composé (11) (1.40 g, 3.25 mmol) est mis dans un ballon sec de 5mL. Le NaOH 10% (14 mL) est ajouté puis un reflux est fait pendant 2 heures. Le mélange réactionnel est filtré à chaud et refroidi. La solution est neutralisée avec une solution de HCl (6 N) (1 : 1), filtrée puis séchée. Une recristallisation dans l'éthanol est effectuée pour obtenir 600mg (67%) du produit attendu (3), un solide blanc.

- Point de fusion attendu¹⁸: 113-114°C, point de fusion trouvé : 112-115°C
- IR (KBr) (cm⁻¹) ; 2563 (S-H), 1647 (C=O), 1409 (C-H et CH₂S), 1602 (C=C benzène) ;
- RMN ¹H (CDCl₃) : δ (ppm) 7.75 (d, J=8.0 Hz, 4H, H₁), 7.45 (d, J=8.0 Hz, 4H, H₂), 3.81 (d, J=7.7 Hz, 4H, H₃), 1.83 (t, J=7.8 Hz, 2H, H₄) (cte méta invisible)
- RMN ¹³C (CDCl₃) : δ (ppm) 195.46, 145.74, 136.17, 130.41, 127.90, 28.62
- Masse exacte attendue : 275,05690 g/mol ; masse trouvée : 275,05698 g/mol
- Analyse élémentaire de C₁₅H₁₄OS₂ attendue : C, 65.65 ; H, 5.14 ; S, 23.37
trouvée : C, 65.89 ; H, 5.29 ; S, 22.63

2,7-bis(3-mercapto-1-hydroxy) naphthalène (4)

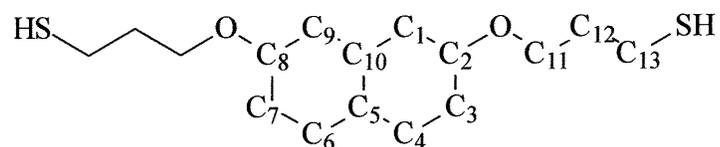


À une solution de 2,7-dihydroxynaphtalène (100 mg, 0.624 mmol) dans le diméthylformamide (2.5 mL), le LDA 2,0M (686 μ L, 1.37 mmol) est ajoutée et le tout est laissé à la température de la pièce pour une heure. Le 3-chloro-1-propanethiol est ajouté et laissé pour la nuit. Par la suite, le DMF et le 3-chloro-1-propanethiol sont évaporés sous pression réduite et une extraction eau-chloroforme est effectuée six fois (le chloroforme est utilisé puisqu'il ne solubilise pas le 2,7-dihydroxynaphtalène). Sécher sous la pompe pour obtenir la molécule attendue (4), une gomme jaune, dans un rendement de 74% (142 mg, 0.46 mmol).

Note : des traces de DMF sont toujours présentes dans le produit obtenu. Une correction sur la masse a été réalisée afin de déterminer le rendement de la réaction. Par contre, le point de fusion et l'analyse élémentaire s'en trouvent affectés. Ainsi, ces données ne seront pas incluses ci-bas.

- IR (KBr) (cm^{-1}); 3198 (C-H aromatique), 2967 (C-H alcane), 2600 (-SH), 1627 (C=C), 1229 (C-O éther), 837 (naphtalène) ;
- RMN ^1H (CDCl_3) : δ (ppm) 7.75 (m, 2H, H₃ et H₄), 7.39 (s, 2H, H₁ et H₆), 7.13 (m, 2H, H₂ et H₅), 3.60 (t, $J=7.7$ Hz, 4H, H₇), 2.58 (q, $J=7.8$ Hz, 4H, H₉), 1.95 (qu, $J=7.7$ Hz, 4H, H₈), 1,78 (t, $J=7.6$ Hz, 2H, H₁₀) ;
- RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ (ppm) 157.40, 156.15, 134.21, 130.41, 130.13, 123.17, 116.63, 114.49, 103.77, 65.83, 36.35, 19.93
- Masse exacte attendue pour $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{S}_2$: 308.09047 g/mol
Masse calculée : 308.09042 g/mol

Même si la molécule est symétrique, quelques uns des carbone sont distincts.



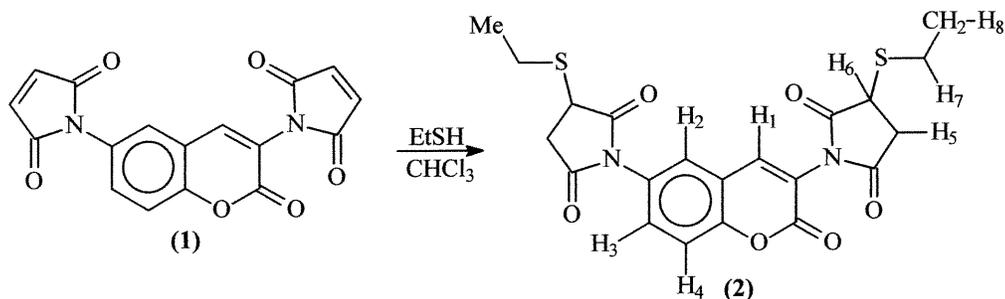
Par exemple : C₂ et C₈ ont des pics à 157.40 et 156.15ppm.

C₃ et C₇ ont des pics à 116.63 et 114.49ppm.

C₄ et C₆ ont des pics à 130.41 et 130.13ppm.

Par contre, leurs similarités nous laissent croire que la molécule attendue a bien été obtenue.

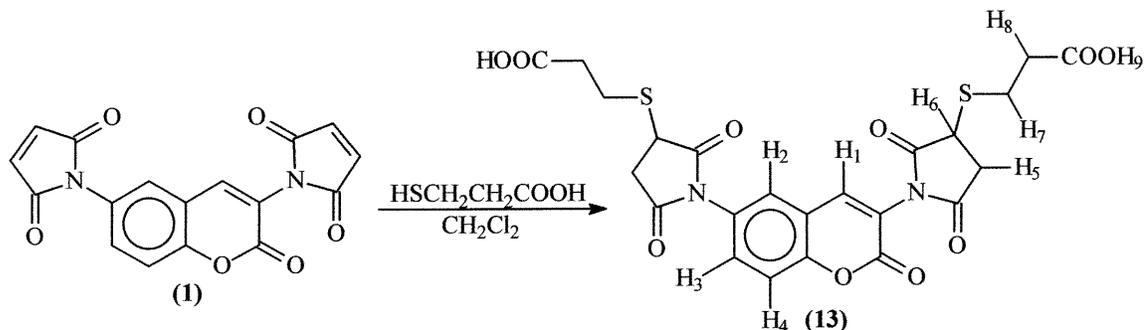
3,6-Bis[1H-pyrrolidine-2,5-dione-3-thioéthyl]2H-1-benzopyran-2-one(12)



À une suspension de produit (1) (40 mg, 0.12 mmol) dans le chloroforme anhydre (3 mL) sont ajoutés 27 μ L d'éthanethiol (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 (12) est ainsi obtenu dans un rendement de 85% (47 mg, 0,10 mmol).

- Point de fusion : 128-131⁰C
- IR (KBr) (cm⁻¹) : 3500 - 3000 (amide), 1700 (C-O lactone), 1620 (C=C aromatique), 600 (C-S)
- RMN ¹H (CDCl₃) : 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 ¹³C (CDCl₃) : 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.)
- Masse exacte attendue : 461,08510 g/mol ; masse trouvée : 461,08411 g/mol
- Analyse élémentaire de C₂₁H₂₀N₂O₆S₂
 - 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

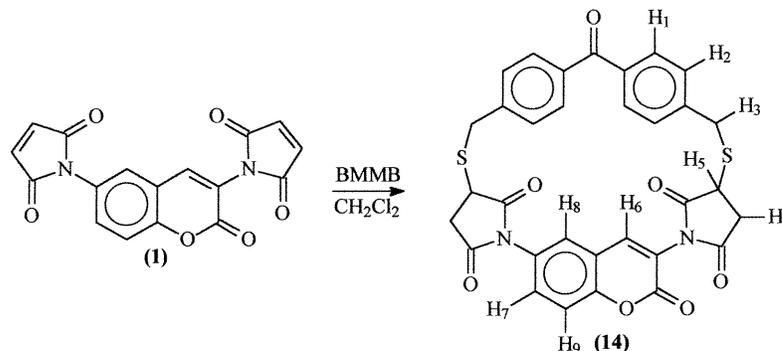
**3,6-Bis[1H-pyrrolidine-3-(acide 3-mercaptopropionique)-2,5dione]
2H-1-benzopyran-2-one(13)**



À une solution de fluorophore (1) (20mg, 0.059 mmol) dans le dichlorométhane sec (2.5 mL), l'acide 3-mercaptopropionique (26 μ L, 0.30 mmol) est ajouté et le tout est laissé à la température de la pièce pour la nuit. Une extraction avec du NaHCO₃ saturé-dichlorométhane est effectuée (répétée trois fois). La phase aqueuse est neutralisée avec du HCl (0.3 M) et une extraction eau-dichlorométhane est faite. La phase organique est séchée et concentrée sous pression réduite pour obtenir un solide beige (13) dans un rendement de 78% (25mg, 0,046 mmol).

- Point de fusion : 136-140⁰C
- IR (KBr) (cm⁻¹) : 3100 - 2900 (C-H), 1717 (C=O, ester), 1628 (C=C aromatique), 1524 (amide tertiaire), 1250 – 1150 (COOH), 774 (C-S).
- RMN ¹H (DMSO-d₆) : δ (ppm) 9.85 (s, 2H, H₉), 7.64 (d, $J=2.5$ Hz, 1H, H₂), 7.52 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, H₄), 7.36 (dd, $J=9.2$ Hz, $J=2.6$ Hz, 1H, H₃), 7.22 (s, 1H, H₁), 4.17 (m, 2H, H₅), 3.39 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, H₆), 3.00 (m, 4H, H₈), 2.75 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, H₅), 2.67 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, H₅), 2.62 (m, 4H, H₇)
- RMN ¹³C (DMSO – d₆) : δ (ppm) 176.4, 174.3, 172.5, 170.5, 157.7, 149.3, 135.2, 129.0, 128.4, 126.6, 125.3, 123.0, 120.4, 116.9, 36.2, 34.8, 26.7, 24.3
- Masse exacte attendue : 548.05594 g/mol ; masse trouvée : 548.05601 g/mol
- Analyse élémentaire de C₂₃H₂₀N₂O₁₀S₂
 - attendue : C, 50.36 ; H, 3.67 ; N, 5.11 ; S, 11.69
 - trouvée : C, 49.73 ; H, 3.58 ; N, 5.01 ; S, 11.34

3,6-Bis[1H-pyrrolidine-4,4'-cyclo(bismercaptopméthylbenzophénone)-2,5-dione] (14)



La 3,6-bismaléimidocoumarine (42mg, 0,13mmol) est placée dans un ballon sec de 5ml. Le BMMB (34mg, 0,13mmol) et du chloroforme (2,5mL) sont ajoutés. Trois équivalents de triéthylamine (52 μ L, 0,39 mmol) sont ajoutés et un reflux est fait pour douze heures. Une extraction $\text{CHCl}_3 - \text{H}_2\text{O}$ à $\text{pH} = 2,0$ est faite et la phase organique est séchée avec du MgSO_4 . Le tout est filtré et concentré sous pression réduite. Une purification sur gel de silice est faite en utilisant l'acétate d'éthyle et l'hexane comme solvant d'élution (rapport de 2 : 8). Un solide beige (61mg, 0,10mmol) est ainsi obtenu dans un rendement de 78%.

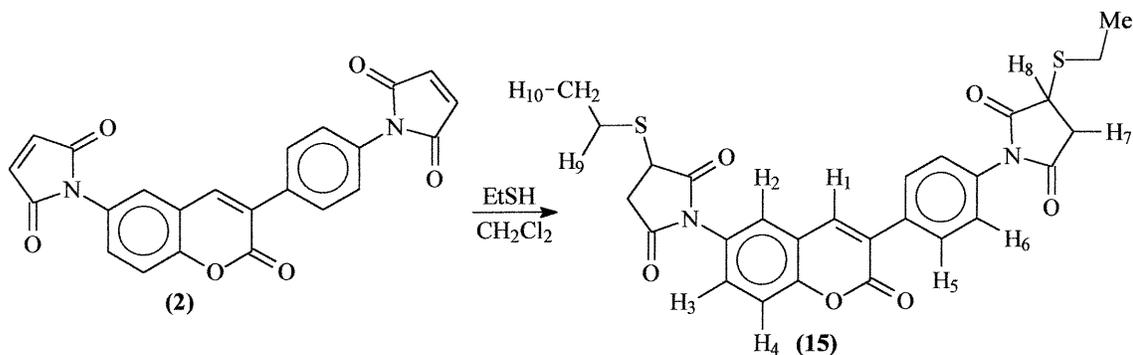
- Point de fusion : 220⁰C (décomposition)
- IR (KBr) (cm^{-1}) : 3500 - 3300 (amide), 1720 (C-O lactone), 1654 (C=C aromatique), 1605 (phényl), 602 (C-S)
- RMN ¹H (CDCl_3) : δ (ppm) 7.81 (d, $J=8.0$ Hz, 4H, H₁), 7.73 (d, $J=7.9$ Hz, 4H, H₂), 7.60 (d, $J=9.4$ Hz, 1H, H₇), 7.52 (s, 1H, H₆), 7.45 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, H₉), 7.39 (s, 1H, H₈), 4.40 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, H₄), 3.96 (d, $J=5.5$ Hz, 1H, H₄), 3.68 (s, 4H, H₃), 3.26 (qu, $J=8.8$ Hz, 2H, H₅), 2.65 (d, $J=5.6$ Hz, 2H, H₄)
- RMN ¹³C (CDCl_3) : δ (ppm) 195.92, 176.77, 175.24, 159.32, 148.90, 147.76, 143.07, 136.90, 136.51, 130.96, 130.25, 129.88, 129.38, 127.62, 127.08, 121.77, 117.69, 105.43, 36.70, 35.34, 28.47
- Masse exacte attendue : 611,09250 g/mol ; masse trouvée : 611,09467 g/mol
- Analyse élémentaire de $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2$

attendue : C, 62.94 ; H, 3.63 ; N, 4.59 ; S, 10.50

trouvée : C, 62.72 ; H, 3.54 ; N, 4.72 ; S, 10.23

Dû au chevauchement des pics des produits minoritaires et à leurs complexités d'attribution des pics, seul le diastéréoisomère majoritaire a été caractérisé (ratio \approx 5:1).

3(*p*-[1H-pyrrolidine-2,5-dione-3-thioéthyl]phényl)-6-[1H-pyrrolidine-2,5-dione-3-thioéthyl]2H-1-benzopyran-2-one (15)



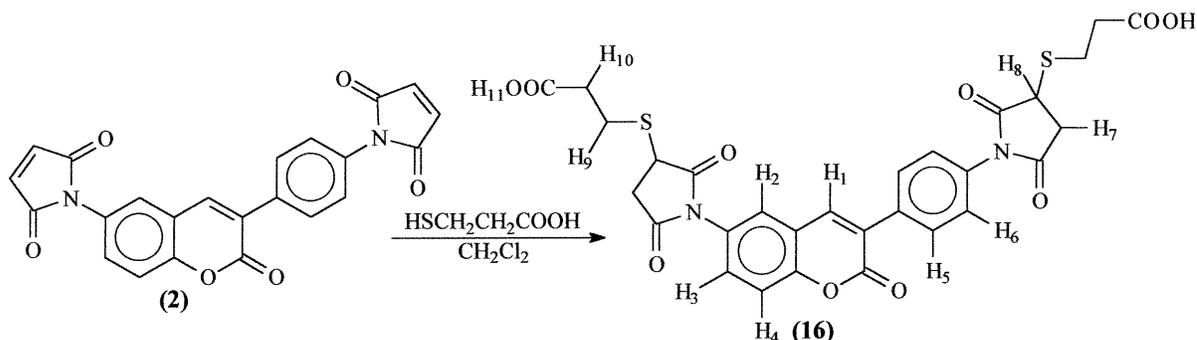
À une solution de fluorophore (2) (20 mg, 0,049 mmol) dans le diméthylsulfoxyde sec (2,5mL), l'éthanethiol (11 μ L, 0.147 mmol) est ajouté et laissé à la température de la pièce pour la nuit. Un volume de 100ml d'eau est ajouté et plusieurs lavages (4x) avec du dichlorométhane sont faits. Après avoir rassemblé les phases organiques, le tout est séché sur $MgSO_4$ et concentré 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 la réaction est évalué à 89% (22 mg, 0,044 mmol).

- IR (KBr) (cm^{-1}) : 3500 - 3300 (amide), 2950 (C-H), 1713 (C-O lactone), 1602 (C=C), 835 (phényl en para), 756 (-SEt).
- RMN 1H (DMSO- d_6) : δ (ppm) 8.39 (s, 1H, H₁), 7.86 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, H₅), 7.74 (d, $J=2.5$ Hz, 1H, H₂), 7.60 (d, $J=9.1$ Hz, 1H, H₄), 7.55 (dd, $J=8.9$ Hz, $J=2.5$ Hz, 1H, H₃), 7.38 (d, $J=8.6$ Hz, 2H, H₆), 4.17 (m, 2H, H₇), 3.42 (dd, $J=8.2$ Hz, $J=2.0$ Hz, 1H, H₈), 3.38 (dd, $J=8.2$ Hz, $J=2.0$ Hz, 1H, H₈), 2.84 (m, 4H, H₉), 2.76 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, H₇), 2.71 (d, $J=5.5$ Hz, 1H, H₇), 1.25 (t, $J=7.3$ Hz, 6H, H₁₀)
- RMN ^{13}C (DMSO- d_6) : δ (ppm) 176.96, 175.33, 160.45, 153.44, 141.38, 135.52, 133.56, 131.38, 130.26, 129.42, 127.89, 127.79, 120.76, 117.79, 37.26, 25.82, 20.49, 19.31, 15.31
- Masse exacte attendue pour $C_{27}H_{24}O_6S_2$: 537.11680 g/mol
masse trouvée : 537.11542 g/mol

3,6[1H-pyrrolidine-3-(acide-3-mercaptopropionique)-5-dione]

-6-[1H-pyrrolidine-3-mercaptopropionique)-2,5-dione]

2H-1-benzopyran-2-one (16)



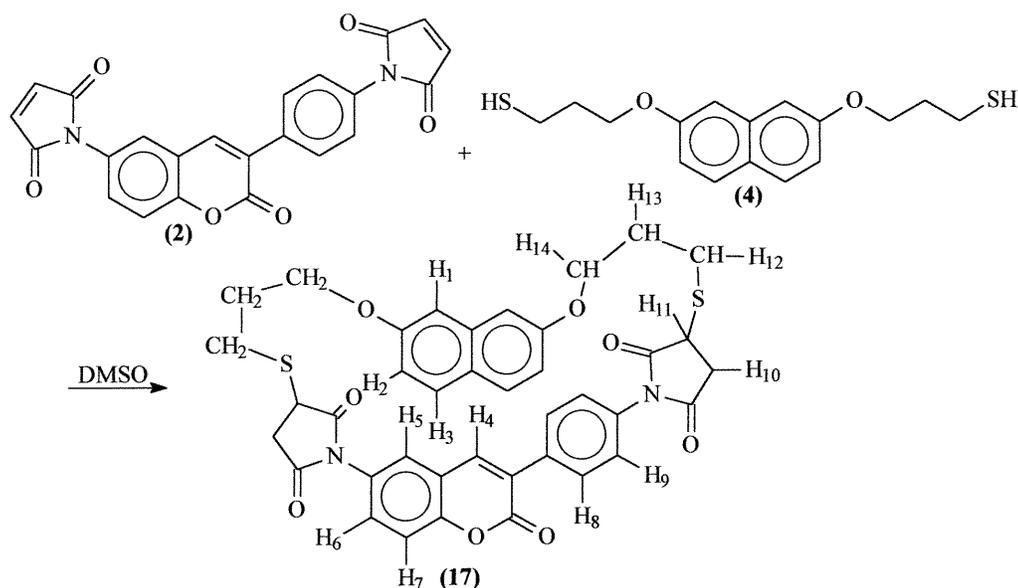
À une solution de fluorophore (2) (20mg, 0,049mmol) dans le diméthylsulfoxyde sec (2,5mL), est ajouté l'acide 3-mercaptopropionique (13 μ L, 0.147 mmol) et le tout est laissé à la température de la pièce pour la nuit. Un volume de 100ml d'eau est ajouté et plusieurs lavages (4x) avec du dichlorométhane sont faits. Après avoir rassemblé les phases organiques, il faut sécher sur MgSO₄ et concentrer 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 la réaction est évalué à 88% (26mg, 0,043mmol).

- IR (KBr) (cm⁻¹) : 3500 - 3000 (amide), 3300 – 2900 et 1385 (acide), 2641 (C-H), 1707 (C-O lactone), 1600 (C=C arotatique), 835 (phényl en para), 756 (-S-CH₂).
- RMN ¹H (DMSO– d₆) : δ (ppm) 8.94 (s, 2H, H₁₁), 8.38 (s, 1H, H₁), 7.86 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, H₅), 7.75 (d, $J=2.6$ Hz, 1H, H₂), 7.60 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H₄), 7.55 (dd, $J=8.6$ Hz, $J=2.6$ Hz, 1H, H₃), 7.39 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, H₆), 4.21 (m, 2H, H₇), 3.41 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, H₈), 3.00 (m, 4H, H₉), 2.71 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, H₇), 2.64 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, H₇)
- RMN ¹³C (DMSO– d₆) : δ (ppm) 177.04, 175.25, 173.91, 160.46, 153.45, 141.38, 135.54, 133.54, 131.39, 130.27, 129.41, 127.89, 127.80, 120.76, 117.79, 37.21, 35.17, 27.37, 27.30, 20.34

Masse exacte attendue pour C₂₉H₂₄O₁₀S₂ : 625.09340 g/mol

masse trouvée : 625.09509 g/mol

3(p-[1H-pyrrolidine-3,3'-cyclo(2,7-bis(-3-mercapto-1-hydroxy) naphthalène)-2,5-dione]-6-[1'H-pyrrolidine-2',5'-dione]-2H-1-benzopyran-2-one (17)



À une solution de fluorophore (2) (20 mg, 0,049 mmol) dans le diméthylsulfoxyde sec (2,5mL), le 2,7-bis(3-mercapto-1-hydroxy)naphthalène (4) (18mg, 1,2éq) est ajouté et laissé à la température de la pièce pour la nuit. Un volume de 100mL d'eau est ajouté et plusieurs lavages (4x) avec du dichlorométhane sont effectués. 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 la réaction est évalué à 81% (28 mg, 0,040 mmol).

- IR (KBr) (cm^{-1}) : 3500 - 3300 (amide), 3300 – 3100 (C-H aromatique), 1627 (C=C aromatique), 1510 (amide tertiaire), 1400 et 1130 (éther), 1230 (C-O lactone), 837 (phényl en para), 750 (C-S).
- RMN 1H (DMSO- d_6) : δ (ppm) 8.14 (s, 1H, H_4), 7.87 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, H_7), 7.59 (m, 4H, H_1 et H_8), 7.51 (s, 1H, H_5), 7.48 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H_6), 7.25 (d, $J=9.1$ Hz, 2H, H_9), 6.92 (d, $J=8.6$ Hz, 2H, H_3), 6.86 (d, $J=8.6$ Hz, 2H, H_2), 3.70

- (m, 4H, H₁₀), 2.80 (dd, $J=7.8$ Hz, $J=4.9$ Hz, 4H, H₁₄), 2.61 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, H₁₁), 2.47 (d, $J=5.6$ Hz, 1H, H₁₁), 1.92 (m, 4H, H₁₂), 1.14 (m, 4H, H₁₃)
- RMN ¹³C (DMSO- d₆) : δ 171.8, 171.4, 157.5, 157.3, 157.1, 156.8, 136.6, 135.2, 131.9, 131.7, 130.8, 128.4, 127.5, 124.3, 124.1, 116.8, 116.2, 115.2, 113.8, 108.3, 106.4, 37.2, 30.8, 21.7
 - Masse exacte attendue pour C₃₉H₃₂O₈S₂ : 720.16001 g/mol
masse trouvée : 720.16013 g/mol

4 Étude fluorométrique pour le fluorophore (1)

4.1 Quelques notions de fluorescence

4.1.1 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 lorsqu'une molécule est 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 nanosecondes⁵⁰.

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 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 voir même des secondes⁵⁰.

Les processus qui se produisent suite à l'absorption d'un photon par une molécule sont illustrés par un diagramme de



Figure 4.1: Professeur Alexander Jablonski (1898-1980). Tiré de *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (page 4)

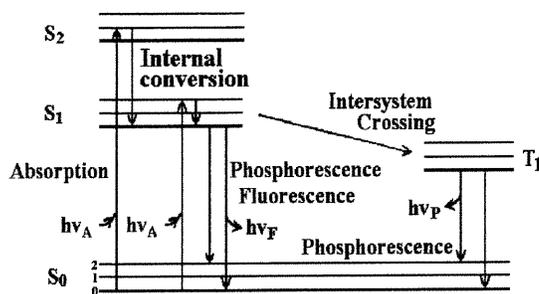


Figure 4.2 : Diagramme de Jablonski, tiré de *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, (page 5).

Jablonski (voir figures 4.1 et 4.2), en l'honneur du père de la spectroscopie de fluorescence, le professeur Alexander Jablonski.

Ce diagramme démontre 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 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 (T₁) 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 intersystème⁵⁰. La phosphorescence est une relaxation de l'état T₁ à l'état fondamental.

4.1.2 Déplacement de Stokes

En 1852, Sir G.G. Stokes (voir figure 4.3) mena une expérience sur les quinines. Il se rendit compte que la lumière du soleil passée à travers un filtre spécifique offrait une couleur bleue (400nm). 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 (450nm). 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 sont universellement observées pour toutes les molécules fluorescentes en solution. Ce changement de longueur d'onde est appelé déplacement de Stokes. Une cause du déplacement de Stoke est la relaxation rapide au plus bas niveau vibrationnel de S_1 . 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 Stoke 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 4.3 : Sir George Gabriel Stokes (1819-1903). Tiré de *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, (page 7).

4.1.3 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 collision. 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 autre), 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.

L'élaboration des fluorophores dans ce projet a été réalisée en fonction des distances entre les deux groupements réactionnels, tel que décrit en introduction, mais également en fonction de toutes ces propriétés : les maléimides sont des groupements qui réagissent de manière très spécifique avec les bases molles comme le soufre. 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 (η) des doublets d'électrons libres de l'oxygène (voir figure 4.4b). Conséquemment, l'état excité de plus basse énergie de ce chromophore est du type $\pi \rightarrow \pi^*$ i.e. 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.

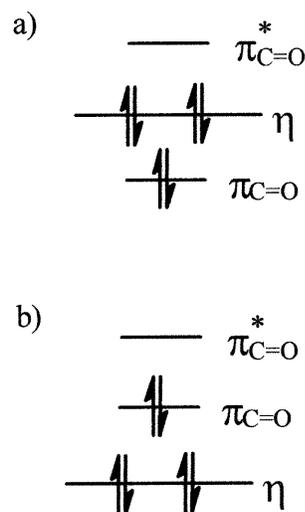


Figure 4.4 : Configuration électronique à l'état fondamental des orbitales frontières des fluorophores. a) non substituées à des sulfures. b) disubstituées.

À l'opposé, l'orbital $\pi_{C=O}$ d'un carbonyle conjugué est généralement de plus basse énergie que les orbitales non-liantes (η) (voir figure 4.4a). L'état excité de plus basse

énergie est alors de type $n \rightarrow \pi^*$, i.e un électron est promu d'une orbitale n à l'orbitale $\pi^*_{C=O}$. Cette transition ($n \rightarrow \pi^*$), et la transition inverse ($\pi^* \rightarrow n$) 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.

4.2 Test mené sur le fluorophore (1) non lié à des soufres.

Comme décrit en introduction, le but de l'étude consiste à visualiser l'apposition protéique à l'aide d'un fluorophore. Puisqu'une association protéique doit induire une forte fluorescence, il va de soit que le fluorophore non substitué à des soufres se doit d'avoir une fluorescence très faible ou même nulle (dans le meilleur des cas).

Ainsi, pour quantifier l'intensité de fluorescence (I_F) basale de la molécule, une solution 10^{-3} M dans le diméthylsulfoxyde (1,68 mg/5 mL de DMSO) a été réalisée. Par la suite, un spectre d'excitation a été pris dans le but de déterminer la longueur d'onde optimale d'excitation à utiliser afin de faire le spectre d'émission (voir figure 4.5a). Ce spectre démontre une intensité de fluorescence maximale à une longueur d'onde de 481nm. Or, ce spectre est identique au blanc (solvant ou tampon seul).

Afin de s'assurer qu'il n'y a pas de fluorescence, un spectre d'émission (voir figure 4.5b), a été fait à une longueur d'onde d'excitation de 481 nm. Celui-ci ne révèle qu'un seul pic à 481 nm qui correspond à la lumière diffuse du rayon d'excitation. Ainsi, il est possible de constater que le fluorophore (1) n'a aucune fluorescence lorsqu'il n'est pas lié à des molécules soufrées. Des tests plus approfondis sur la fluorescence du composé à d'autres longueurs d'onde (la même que celle utilisée pour le fluorophore lié à des soufres) seront réalisés dans les sections à venir.

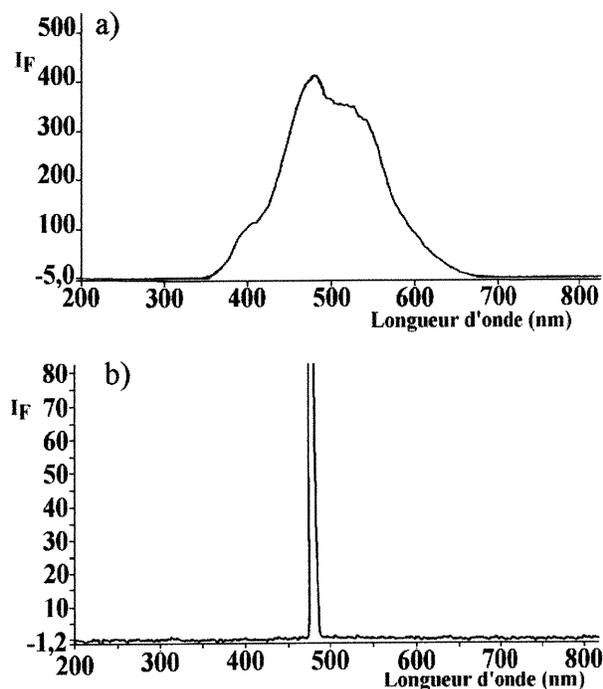


Figure 4.5 : a) Spectre d'excitation du fluorophore (1) non substitué.
b) Spectre d'émission du fluorophore (1) non substitué à $\lambda_{exc} = 481nm$.

Le spectre d'émission a été réalisé à 10^{-3} M, ce qui représente une concentration relativement grande en ce qui concerne la fluorescence. À la section 4.1, il a été question de la notion des molécules ou des groupements fonctionnels qui agissent en tant que quenchers de fluorescence. Il faut spécifier que ce quench peut être dû aux collisions moléculaires ou à d'autres moyens beaucoup plus triviaux comme l'atténuation de la lumière incidente⁵⁰. Celle-ci peut justement être observée lorsque la concentration du

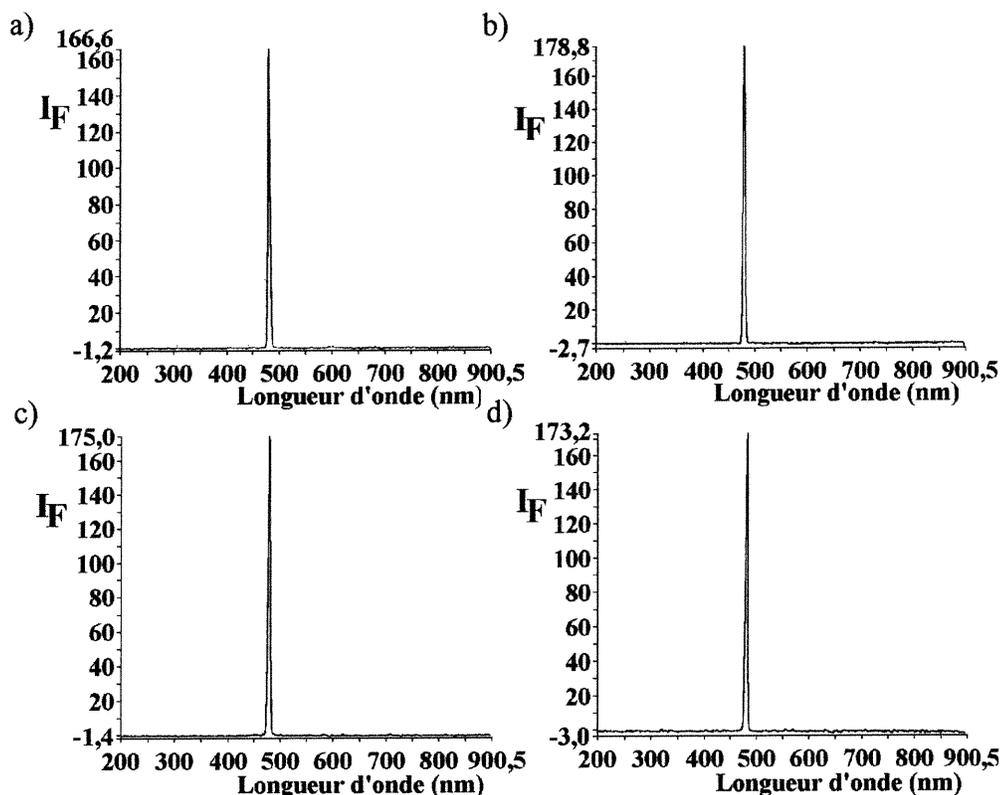


Figure 4.6 : Spectre d'émission du fluorophore (I) non substitué à des molécules soufrées, à $\lambda_{exc} = 481\text{nm}$ et à des concentrations de a) 10^{-6}M , b) 10^{-7}M , c) 10^{-8}M , d) 10^{-9}M .

fluorophore est trop importante. Ainsi, des études de dilution doivent être réalisées dans le but de confirmer l'absence de fluorescence de la bismaléimidocoumarine (voir figure 4.6). À titre d'information, tous les spectres de la section 4.2 ont été réalisés avec des fentes de 2,5 nm sur le fluorimètre.

L'effet de dilution n'a eu aucun impact sur la fluorescence basale de la bismaléimidocoumarine non substituée à des molécules soufrées. Par conséquent, il est

possible de conclure que le fluorophore (1) ne fluoresce pas, quelque soit sa concentration.

Tel que mentionné plus haut, il sera démontré plus tard que la longueur d'onde d'excitation du composé (12) et non de la molécule (1) est d'environ 370nm. Le spectre d'émission du composé (1) à cette longueur d'onde ne démontre pas de fluorescence basale, ce qui confirme que la molécule ne fluoresce pas lorsqu'elle n'est pas liée à des sulfures.

4.3 Étude fluorométrique de la bis-maléimidocoumarine liée à des composés soufrés.

4.3.1 Test de saturation avec un thiol.

En gardant toujours à l'esprit l'objectif premier de l'étude, soit une détection de l'apposition protéique, la liaison des maléimides à des molécules portant un soufre se doit d'induire de la fluorescence. En effet, si tel n'était pas le cas, le fluorophore serait sans intérêt! Afin de confirmer ou d'infirmer la fluorescence de la bismaléimidocoumarine substituée à des molécules soufrées, la réaction présentée à la figure 4.7 a été réalisée.

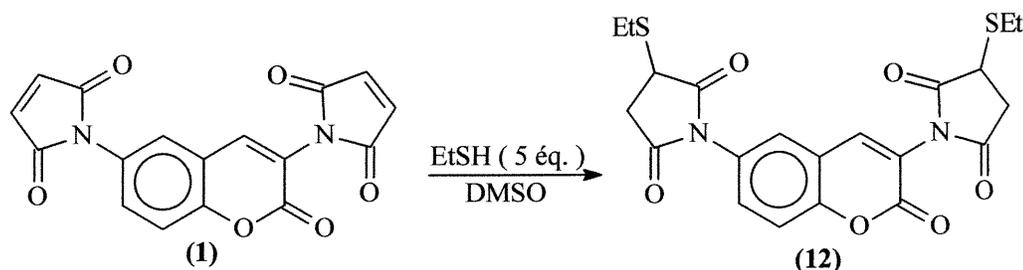


Figure 4.7 : Réaction de la bis-maléimidocoumarine avec l'éthanethiol pour des fins de détection de fluorescence.

Celle-ci a été produite à une concentration de 10^{-3} M dans le diméthylsulfoxyde (1,68 mg / 5 ml de DMSO) à la température de la pièce pour une durée totale de cinq heures. Ainsi, comme décrit à la section 4.2, un spectre d'excitation a été fait dans le but d'identifier la longueur d'onde où la fluorescence est maximale. La figure 4.8a) démontre une intensité de fluorescence maximale à une longueur d'onde évaluée à 366,5 nm (le pic à 481 nm représente la fluorescence de base su solvant). Par la suite, un spectre d'émission a pu être réalisé à cette même longueur d'onde (voir figure 4.8b). Il est donc possible de constater un gain de fluorescence lors de la liaison dans une bande de 360 nm à 570 nm. De plus, des dilutions ont permis d'évaluer la limite de détection à 10^{-9} M, ce qui est tout à fait adéquat pour des tests protéiques. En effet, une

concentration plus grande que 10^{-5} M a tendance à induire la précipitation de protéines.

Un travail en conditions diluées est donc de mise.

De plus, il est possible d'affirmer que le produit disoufré a bel et bien été obtenu puisqu'une extraction eau-chloroforme a été faite sur la solution, suivie par une analyse de spectrométrie de masse (haute et basse résolution), qui révèle la présence du produit dithiolé mais non celle du réactif de départ ou du produit monothiolé. La fluorescence provient donc essentiellement du fluorophore disubstitué. Des études plus approfondies sur ce sujet seront présentées à la section suivante.

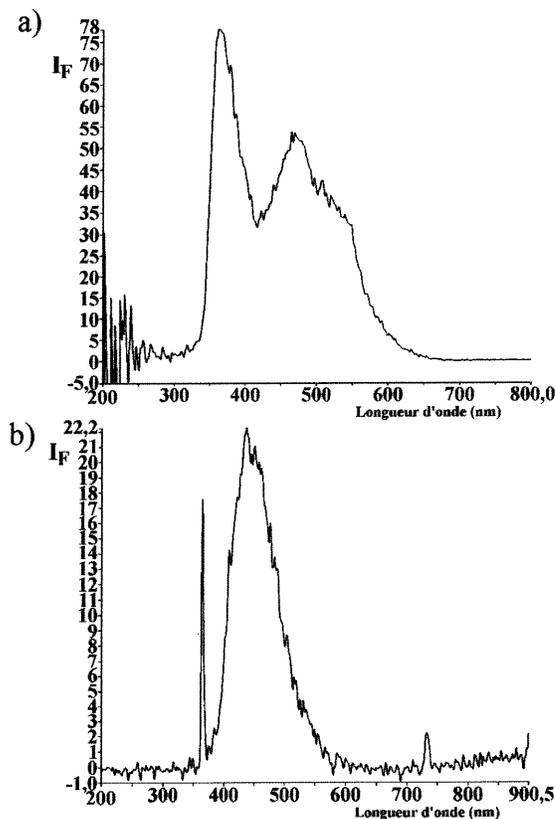


Figure 4.8 : a) Spectre d'excitation du fluorophore (1) disubstitué à l'éthanthiol. b) Spectre d'émission correspondant, à $\lambda_{exc} = 367\text{nm}$ (fente = 2,5 nm).

En ce qui concerne le fluorophore (1) non substitué, il a été démontré à la section 4.2 une absence de fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 481nm, celle-ci correspondant à l'excitation maximale de la molécule. Il faut toutefois souligner que la figure 4.5a montre un petit pic d'absorption à environ 370 nm. Une excitation spécifique à cette longueur d'onde peut, quant à elle, émettre une très faible fluorescence. Ceci n'est pas un handicap majeur au fluorophore. Cela nous force toutefois à réaliser un blanc pour chacun des tests fluorométriques.

Pour l'expérience présentée ci-haut, la valeur du blanc (test témoin) est négligeable, car la valeur d'intensité de fluorescence n'excède pas 2,5. Par contre, la nature du solvant influence grandement cette valeur. Il faut donc être extrêmement prudent avec l'analyse des résultats puisque, par exemple, une réaction du fluorophore

avec cinq équivalents d'éthanethiol réalisée dans une solution MeOH 60% / H₂O 40% à une concentration de 10⁻³M induit une intensité de fluorescence (I_F) de 350 (unités arbitraires). Pour sa part, la même réaction produite dans une solution MeOH 60% / Tampon phosphate (pH = 7,2 à 10⁻⁴ M) induit un I_F de 400. Bien que ces valeurs semblent très différentes, après correction par les blancs (24 et 74 respectivement), il est

Tableau IV.1 : Effet de la variation de la λ sur la 2^{ième} harmonique.

| Longueur d'onde d'excitation | Longueur d'onde de la 2 ^{ième} harmonique |
|------------------------------|--|
| 315 | 630 |
| 333 | 665 |
| 353 | 705 |
| 367 | 740 |
| 374 | 750 |
| 378 | 760 |
| 380 | 765 |
| 384 | 775 |
| 390 | 790 |
| 395 | 795 |

possible de constater que les deux réactions présentent exactement la même intensité de fluorescence, soit 326.

À la figure 4.8b), il est possible de voir un petit pic à 740nm. Ici, il ne s'agit pas d'une impureté, il s'agit plutôt d'une longueur d'onde d'excitation de second ordre (2^{ième} harmonique). Pour s'assurer de cela, des variations de longueur d'onde ont été réalisées tel que présenté au tableau

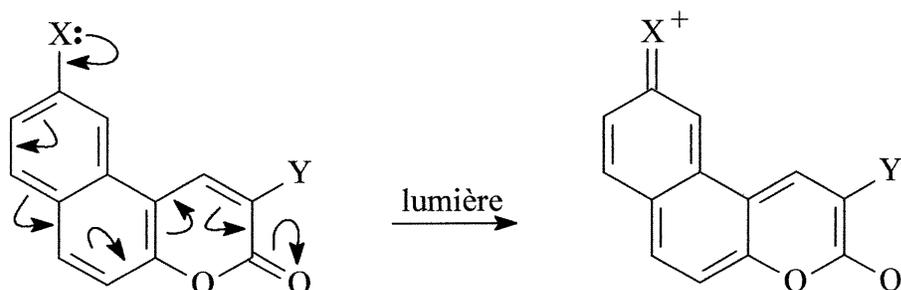
IV.1. À chaque fois que la longueur d'onde d'excitation varie, la longueur d'onde à l'étude varie également.

Pour sa part, le pic attribuable à la fluorescence ne varie jamais. En effet, il se localise constamment sur une large bande couvrant les longueurs d'onde de 350 à 550nm.

Par conséquent, il est possible de déduire que le spectre de fluorescence est constitué d'un pic d'excitation, d'une bande de fluorescence et d'un pic d'excitation de second ordre. D'un point de vue fluorométrique, le produit est donc très pur.

Il arrive parfois que le pic d'émission et le pic de fluorescence se chevauchent parfaitement de telle sorte qu'il devient impossible de déterminer la valeur de I_F, et parfois même, de déterminer la présence de fluorescence tel que démontré à la section 4.2. Ce phénomène n'a pas été observé ici (après liaison avec l'éthanethiol) grâce à la

structure même du fluorophore. En effet, un article publié par les docteurs Yang, Langmuir et al ⁴¹ affirme qu'un groupement électrodonneur lié à un naphtopyranone (voir figure 4.9) induit un déplacement important vers le rouge, grâce à l'imposante délocalisation du système.



Figures 4.9 : Hypothèse permettant de prévoir un déplacement de Stoke important par un phénomène de délocalisation.

Les auteurs ont ainsi enregistré des spectres de fluorescence portant des déplacements de Stoke très importants.

Notre fluorophore (1), pour sa part, peut induire une délocalisation et ce, sur les deux groupements électrodonneurs (voir figure 4.10). Il était donc possible de s'attendre à un déplacement vers le rouge avec une valeur de Stoke non négligeable, comme ce fut le cas ici, c'est-à-dire une distance de 148 nm entre le pic d'émission et celui de la fluorescence.

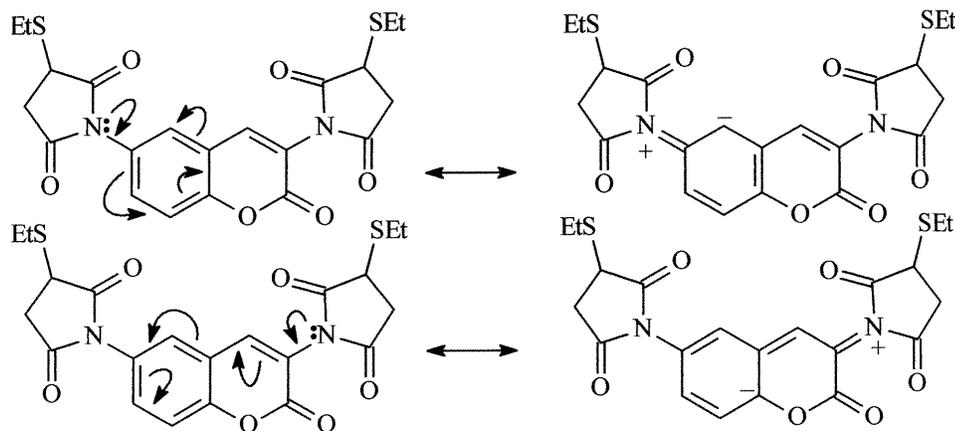


Figure 4.10 : Représentation de la résonance interne du fluorophore (1).

Les études ont démontré que le fluorophore est bien la diaminocoumarine et non

les maléimides ou même la coumarine non substituée qui, pour leur part, ne fluorescent pas. En effet, un spectre d'excitation et d'émission de la molécule (7) ; la 3,6-diaminocoumarine, fut réalisé et le même profil de fluorescence est observable (voir figure 4.11 a et b). Les maléimides, pour leur part n'offrent aucune fluorescence dans les bandes de 400 à 600nm et ce, même liés à un soufre.

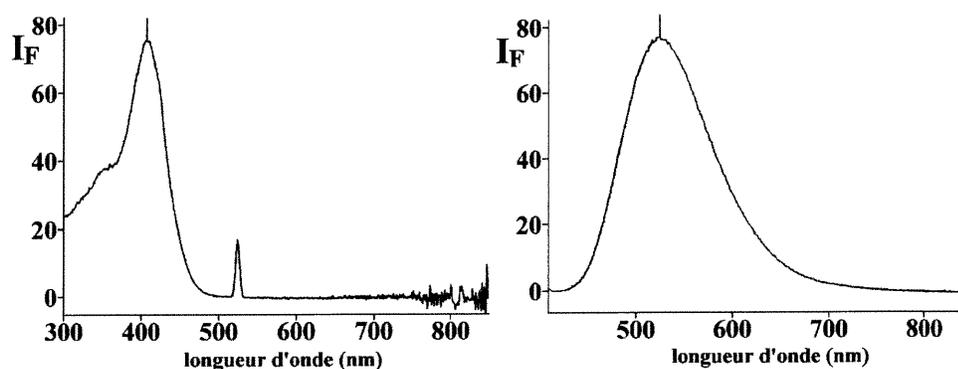


Figure 4.11 : a) Spectre d'excitation de la molécule (7). b) Spectre d'émission de la même longueur d'onde à $\lambda_{exc} = 408nm$, fente = 5nm.

Par conséquent, il est possible de conclure que le coeur de coumarine du fluorophore (1) fluoresce lorsque les maléimides qui s'y rattachent sont liés à une molécule thiolée.

4.3.2 Caractérisation du produit final.

Afin d'être en mesure de comparer la fluorescence en milieu réactionnel et la fluorescence maximale, il est essentiel de synthétiser, d'isoler et de caractériser le produit final (12) de la réaction présentée à la figure 4.7. Les conditions de réactions ainsi que les propriétés physiques du composé sont fournies à la section 3 (partie expérimentale).

Tout comme les expériences précédentes, un spectre d'excitation a été réalisé. Celui-ci est présenté à la section 4.3.5. (pour des fins de comparaison et afin d'éviter de répéter les mêmes spectres). Il ressemble en tout point aux balayage de fluorescence de réaction, ainsi la longueur d'onde d'excitation à utiliser est de 366,5 nm (puisque le pic à environ 475 nm n'induit aucune fluorescence).

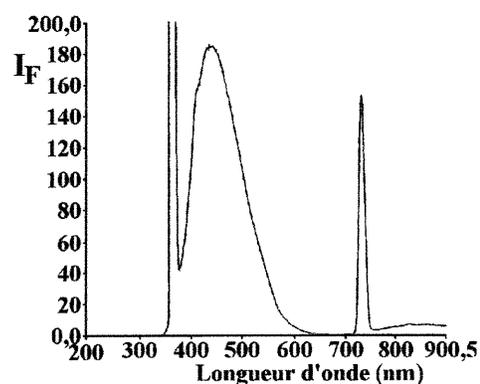


Figure 4.12 : Spectre d'émission du produit caractérisé (après réaction avec l'éthanethiol), fente = 5nm.

Le spectre d'émission démontre une intensité de fluorescence de 180 (voir figure 4.12), ce qui correspond à la fluorescence maximale que peut obtenir le fluorophore (à $10^{-3}M$) lié à deux molécules d'éthanethiol. La valeur de I_F en milieu réactionnel, pour sa part, est évaluée à 155 (toujours avec une fente de 5 nm et dans le DMSO). Ainsi, la section 4.3.4. fera la lumière sur cette différence et démontrera le procédé à respecter pour déterminer le rendement de la réaction.

4.3.3. Cinétique de fluorescence du fluorophore en réaction avec l'éthanethiol.

Une étude d'intensité de fluorescence par rapport au temps permet de mettre en évidence la vitesse de réaction. Cette étude a été réalisée dans le diméthylsulfoxyde à une concentration de 10^{-3} M et en utilisant 2éq. d'éthanethiol. De plus, les intensités de fluorescence ont été mesurées en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 367 nm avec des fentes d'émission et d'excitation de 5 nm (le résultat est présenté à la figure 4.13).

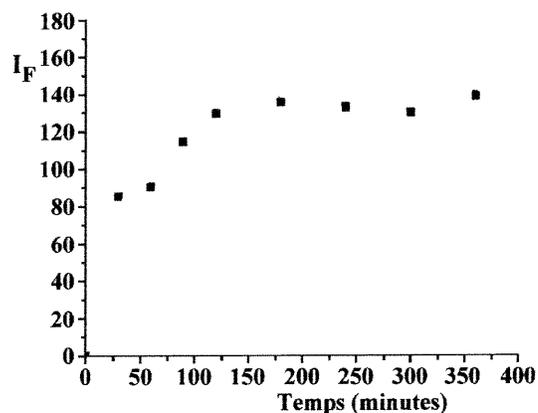


Figure 4.13 : Cinétique de fluorescence; intensité de fluorescence en fonction du temps par la réaction du fluorophore (1) avec l'éthanethiol.

Un plateau est observable à une intensité de fluorescence d'environ 135.

Les tests d'intensité de fluorescence se sont réalisés sur une période de 5040 minutes, soit 84 heures. Dans chacun des cas, le plateau s'est maintenu. Ceci laisse croire que la réaction était bien complète, mais démontre également que le produit formé ne se dégrade que très peu (ou pas du tout) en fonction du temps.

Suite à ces résultats, il est possible de conclure que la réaction est complète après environ 150 minutes, soit 2,5 heures.

4.3.4 Test de croissance de fluorescence avec un thiol.

Jusqu'à présent, il a été démontré qu'une réaction impliquant la liaison de deux molécules d'éthanethiol sur le fluorophore (**1**) a pour effet d'accroître la fluorescence et ce, de manière très importante. Il est toutefois impératif de connaître avec exactitude non seulement la fluorescence du produit de départ et du produit final mais également celle du ou des intermédiaire(s) (voir figure 4.14). En effet, si l'on émet l'hypothèse que le produit monothiolé est fluorescent, il serait alors difficile de révéler la présence d'apposition protéique. La seule information possible de déduire d'une croissance de fluorescence serait alors que le fluorophore est en mesure de se lier à au moins une (et peut être deux) des protéines d'apposition. Cette information est bien sûr très peu représentative des ambitions discutées en introduction.

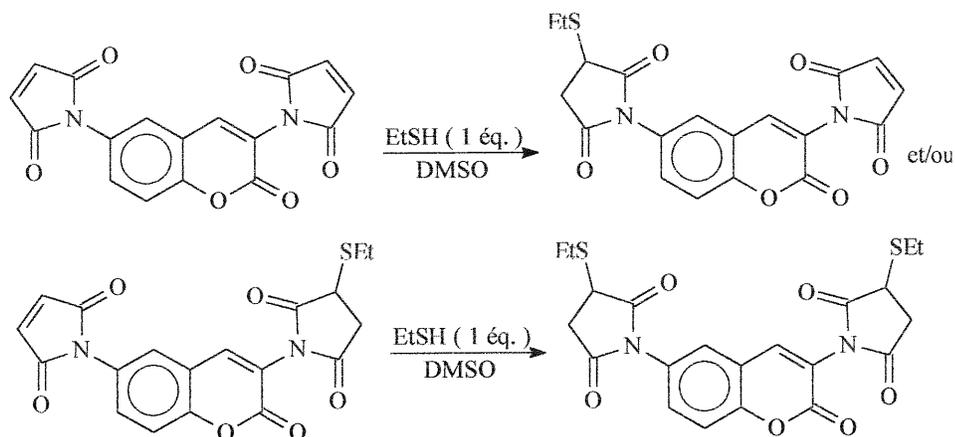


Figure 4.14 : Représentation du ou des intermédiaire(s) réactionnel(s) de la réaction fluorophore (**1**) avec l'éthanethiol.

Dans le but de visualiser et de quantifier la fluorescence du produit monothiolé, plusieurs profils de fluorescence furent envisagés en ce qui concerne ce type de réaction (tel que présenté à la figure 4.15).

Si la réaction avec le premier équivalent de thiol, pour donner le monothiolé, est une aussi rapide que celle avec la deuxième molécule, une réaction réalisée dans des conditions de (10^{-3} M) devrait théoriquement offrir le produit monothiolé dans des

rendements quantitatifs si un équivalent de thiol est ajouté. Ainsi, le produit monothiolé serait produit sous des conditions entraînant entre zéro et un équivalent d'éthanethiol alors que le produit dithiolé serait présent entre les valeurs de un à deux équivalents d'éthanethiol.

Cela dit, il est possible, dans un premier temps, que le produit monothiolé ne fluoresce pas. La fluorescence ne serait donc visible qu'après réaction avec un second équivalent d'éthanethiol puisque ce n'est qu'après ce moment que le produit dithiolé commence à se former. Le profil de la droite rouge serait donc observé (voir figure 4.15).

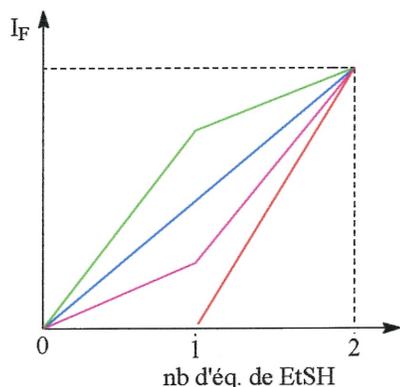


Figure 4.15 : Profils hypothétiques de la fluorescence du produit monothiolé.

Dans un deuxième temps, il serait possible que l'ajout de chacun des éthanethiols engendre précisément la même intensité de fluorescence. Ainsi, le produit monothiolé aurait une valeur de I_F exactement à 50% de sa

valeur maximale. Ce profil est représenté par la droite en bleu.

Dans un troisième temps, il est possible de retrouver tous les cas intermédiaires. C'est-à-dire que la valeur de I_F du produit monothiolé pourrait être non nul et inégal à la fluorescence du produit disoufré. Si la fluorescence engendrée est faible, le profil de la droite magenta serait observée alors que le profil de la droite verte correspond à une forte contribution de fluorescence du produit monosubstitué.

D'un point de vue expérimental, une droite a pu être réalisée en faisant plusieurs lectures de fluorescence et en faisant varier le nombre d'équivalents d'éthanethiol sur des échantillons de 10^{-3} M de fluorophore dans le diméthylsulfoxyde en utilisant des fentes de 5 nm.

En faisant un graphique de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre

d'équivalents d'éthanethiol (voir figure 4.16), il est possible d'obtenir un profil correspondant à la droite bleue présente à la figure 4.15.

Ici, les tests se sont poursuivis à plus de deux équivalents d'éthanethiol dans le but de voir si la réaction était complète. En effet, à la fin de la réaction, un plateau d'intensité de fluorescence devait être observable. La ligne pleine représente

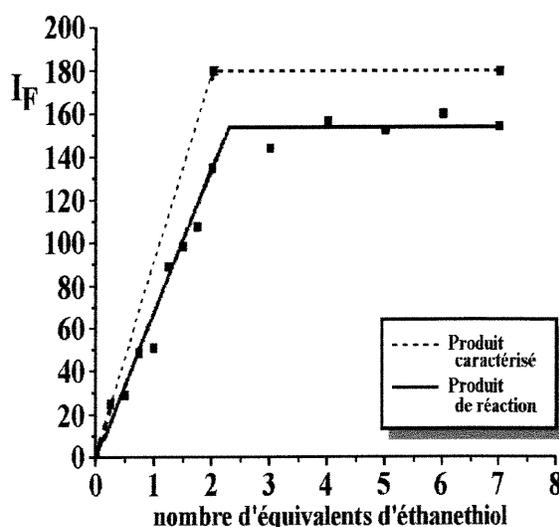


Figure 4.16 : Profil expérimental de la fluorescence du produit monothiolé.

les résultats expérimentaux, alors que la ligne pointillée représente l'allure du graphique si la réaction était quantitative. Dans le premier cas, il est possible de remarquer une augmentation linéaire de fluorescence jusqu'à une valeur de I_F égale à 155. Cette valeur est atteinte à 2,30 équivalents d'éthanethiol. Puisque celle-ci excède deux équivalents, il faut en déduire que la réaction n'est pas complète (car une réaction complète aurait un $I_{F \text{ max}}$ à exactement 2,00 équivalents). Dans le deuxième cas, la droite théorique a pu être déduite de la valeur de $I_{F \text{ max}}$ déterminée à la section 4.3.2. et de l'allure générale de la croissance de fluorescence des valeurs expérimentales. La différence de fluorescence entre le plateau de I_F expérimental et le plateau de $I_{F \text{ max}}$ n'est pas dû à une simple fluctuation des faisceaux puisque les expériences ont été réalisées en duplicata et les données obtenues sont tout à fait concordantes. En effet, il est peu probable que la même fluctuation soit survenue sur chacun des échantillons.

Avant de tirer des conclusions trop hâtives, il faut prendre conscience que les chances d'avoir un intermédiaire réactionnel qui fluoresce exactement à 50% de la valeur de $I_{F \text{ max}}$ et précisément à la même longueur d'onde sont minimales, mais toutefois possibles. Dans un tout autre ordre d'idée, il est possible qu'un phénomène d'activation ait pour effet de permettre l'ajout d'un second thiol plus facilement que le premier. Ainsi, des molécules dithiolées seraient présentes à moins d'un équivalent

d'éthanethiol, ce qui pourrait expliquer la fluorescence. Le produit monothiolé pourrait alors avoir une fluorescence variable voire même nulle. Des études beaucoup plus approfondies devront donc être menées pour comprendre cette observation (voir section 4.3.5.).

Connaissant le profil de la réaction, il sera possible de déterminer le rendement de celle-ci. En effet, les droites démontrent que le supposé produit monothiolé a une intensité de fluorescence qui lui est propre. Il est donc possible de déduire que le pourcentage de produit disoufré correspond au rapport de l'intensité de fluorescence observée (I_F obs) sur celle de l'intensité de fluorescence maximale (I_F max), ces valeurs toutefois soustraites de l'intensité de fluorescence du produit monothiolé (c'est-à-dire à 1 éq).

Donc :

$$\% \text{ de produit disoufré} = \frac{I_{F \text{ obs}} - I_{F \text{ à 1 éq}}}{I_{F \text{ max}} - I_{F \text{ à 1 éq}}} \times 100$$

De plus, puisque le rendement est proportionnel au pourcentage de produit disoufré et sachant que I_F max est la valeur du produit caractérisé, alors :

$$\text{rendement} = \left(\frac{I_{F \text{ obs à 2 éq.}}}{1/2 I_{F \text{ max}}} - 1 \right) \times 100$$

si la première hypothèse est la bonne

$$\text{rendement} = \frac{I_{F \text{ obs à 2 éq.}}}{I_{F \text{ max}}} \times 100$$

si la deuxième hypothèse est la bonne (activation)

Les détails de ces équations sont présentés à l'annexe.

Il peut sembler exagéré de s'attarder au calcul du rendement de manière si pointilleuse. Par contre, il faut garder à l'esprit que les rendements obtenus lors de l'apposition protéique ne pourront pas être calculés. Ainsi, la conclusion se portera entre deux choix : une apposition ou une absence d'apposition protéique. Cette étude ne doit

donc pas être limitée par l'efficacité de la liaison entre les sulfures et le fluorophore. Par conséquent, les tests préliminaires doivent offrir une grande efficacité, ce qui ne peut être démontré que par le biais du calcul du rendement.

Aussi, les tests de croissance de fluorescence avec un thiol permettent d'élaborer des équations qui pourront servir à déterminer le rendement de la réaction.

4.3.5 Étude du produit monthiolé.

4.3.5.1 Principe de l'électrophorèse capillaire.

Comme il a été vu à la section précédente, il est important de connaître la fluorescence du produit monthiolé, de façon à savoir à coup sûr le profil exact de la figure 4.15. Aussi, comme il a été proposé plus tôt, il est possible qu'il y ait très peu de produits monthiolés et que le produit dithiolé soit formé avant même d'atteindre 1 éq. en éthanethiol. Il faut donc trouver une manière de séparer le produit non thiolé du produit dithiolé ou, à tout le moins, suivre leur formation séparément. Une façon d'y arriver est d'utiliser l'électrophorèse capillaire.

Par définition, l'électrophorèse est la migration d'ions en solution sous l'influence d'un champ électrique ⁵¹. Ainsi, l'électrophorèse capillaire (EC) utilise un champ électrique (de 15 KV dans l'expérience décrite ci-dessous) pour séparer des composés de polarités différentes. Ceux-ci traversent alors un capillaire de silanol (SiOH) de 50 cm de long et de 25 à 75 μm de diamètre.

La figure 4.17 démontre les deux forces qui génèrent le déplacement net des molécules. Dans un premier temps, l'électroosmose est le flux moléculaire généré par une anode et une cathode localisées aux deux extrémités du capillaire (voir figure 4.17a). Par conséquent, une molécule chargée positivement aurait une migration beaucoup plus rapide qu'une molécule neutre, qui elle-même serait beaucoup plus rapide qu'une molécule chargée négativement puisqu'il y aurait répulsion entre l'ion négatif et la cathode. De plus, afin

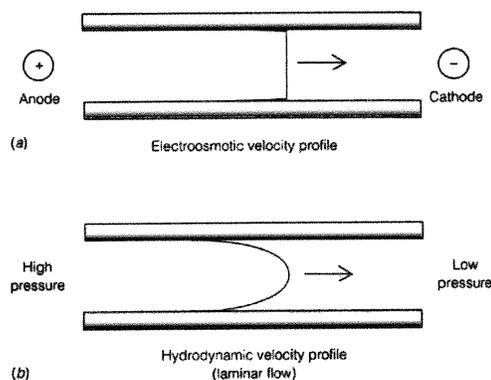


Figure 4.17 : a) Représentation de l'électroosmose. b) Représentation du flux hydrodynamique. Tiré de D.C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis* p.917.

de pouvoir récupérer et analyser les molécules chargées négativement, il est impératif de créer une différence de pression entre les deux extrémités du capillaire. Si tel n'était pas le cas, les ions négatifs migreraient vers l'anode et seraient donc irrécupérables. Le bilan net est qu'une molécule chargée positivement est attirée par la cathode et accélérée par le flux hydrodynamique, une molécule neutre, pour sa part, ne subit que l'effet du flux hydrodynamique alors qu'un ion négatif subit le même effet, mais est retardé par la répulsion de la cathode (voir figure 4.17b).

4.3.5.2 Expérience envisagée.

Le but de l'expérience consiste à visualiser la contribution de fluorescence du produit monothiolé. Pour ce faire, deux graphiques doivent être réalisés. Le premier est un graphique de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre d'équivalents de thiol (la molécule thiolée doit également porter une fonction acide pour permettre la séparation du produit mono et dithiolé). Par la suite, l'échantillon placé dans l'électrophorèse capillaire nous permettra de séparer le produit mono et dithiolé et attribuera un nombre d'unités arbitraires pour chacun d'eux, correspondant à l'aire sous la courbe de chacun des pics. Il sera ensuite possible de faire un deuxième graphique de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre d'unités correspondant au produit dithiolé. Il sera alors possible de voir la contribution de fluorescence du produit dithiolé et indirectement celle du produit monothiolé.

Il aurait, bien sûr, été possible de faire d'autres tests (moins complexes) afin de voir si le produit monothiolé est présent au cours de la réaction. En effet, une expérience impliquant la HPLC ou même la TLC aurait pu identifier le produit monothiolé sans toutefois donner d'information sur l'ampleur de la contribution de fluorescence de celle-ci.

Il faut noter que le volume d'une molécule est inversement proportionnel à la mobilité de celle-ci. Toutefois, les molécules utilisées pour l'expérience sont de tailles

très similaires, ce qui ne représente pas un problème. En effet, dans le but de voir et de quantifier le produit monothiolé, des réactions impliquant un nombre variable d'équivalents d'acide 3-mercaptopropionique ont été réalisées sur le fluorophore (1). À l'origine, le but était de faire l'analyse des produits disubstitués (donc portant deux acides), monosubstitués (avec un seul acide) et non substitués (aucun acide). Ainsi, dans un tampon CHES 0,1M, pH=9,0, les fonctions acides auraient été sous forme déprotonée et une séparation entre ces trois molécules devaient donc être observée. Toutefois, les maléimides, bien que sélectifs au produit soufré, semblent former de multiples pics de décomposition qui rendent l'analyse extrêmement complexe. Afin de remédier à ce problème, les maléimides ont été saturés en éthanethiol, après réaction avec les quantités variables d'acide 3-mercaptopropionique. Les charges n'en demeurent pas moins identiques et le problème de dégradation est alors résolu. La figure 4.19 démontre toutes les étapes à suivre pour pouvoir faire une analyse adéquate des résultats.

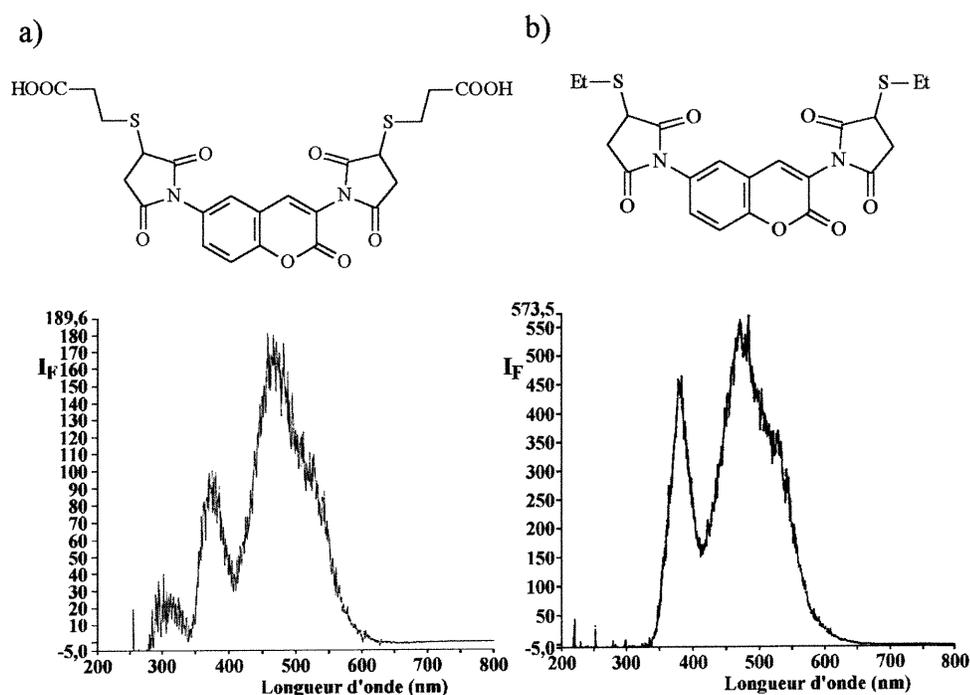


Figure 4.18 : a) Spectre d'excitation de la molécule 13, à $10^{-3}M$, fente=0 nm. b) Spectre d'excitation de la molécule 12, à $10^{-3}M$, fente=0 nm.

Ce procédé permettra donc de tirer des conclusions sur la fluorescence du produit monothiolé en prenant, pour référence, l'aire sous la courbe des produits thiolés (exprimé en nombre d'unités). En effet, si le produit monothiolé contribue à la fluorescence, la somme d'unités du mono et du diacide devrait être révélatrice de l'intensité de fluorescence. Si ce n'est pas le cas, seul le nombre d'unités du diacide serait significatif (en terme de fluorescence).

Afin de déterminer la longueur d'onde d'excitation à utiliser pour la détection, les produits caractérisés du fluorophore (1) disubstitué avec l'acide et l'éthanethiol ont été utilisés (voir figure 4.18b). À la lumière de ces spectres, une longueur d'onde de 476 nm a semblé adéquate pour l'analyse.

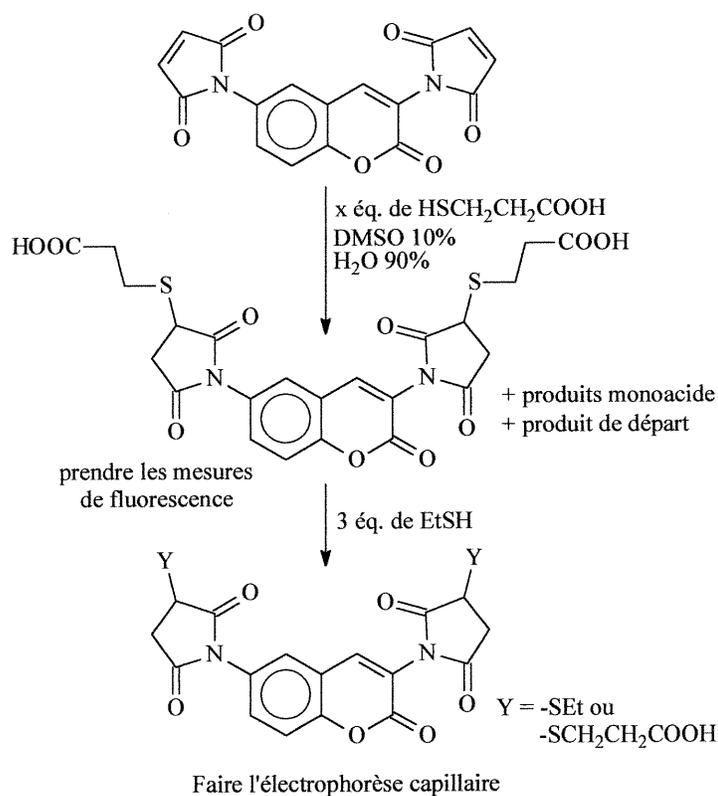


Figure 4.19 : Étapes à suivre pour pouvoir faire l'analyse par électrophorèse capillaire.

De plus, les fluorophores disubstitués à des molécules d'éthanethiols et à des acides (ainsi que le solvant seul) ont dû être analysés sur EC afin de s'assurer que la

différence de leurs temps de rétention entre eux est suffisamment grand pour permettre de voir le produit monothiolé (s'il se forme).

4.3.5.3 Résultats de l'expérience.

La figure 4.20 démontre le résultat de ces analyses. Il est possible de constater que le produit disubstitué avec l'éthanethiol (figure 4.20b) possède la même migration que le solvant (figure 4.20a). Ceci est logique puisque l'absence de charge négative facilite la migration. De plus, il est possible de voir des petits pics de décomposition entre 6,40 minutes et 8,05 minutes. Toutefois, ceci n'est pas problématique puisque ces pics ne représentent que 8% des unités et ne constituent qu'une impureté présente dans le produit caractérisé (et non dans le produit de réaction). Les produits mono- et diacide sont détectés à 4,42 minutes et 8,88 minutes respectivement.

Tel que décrit à la figure 4.19, la première étape consiste à faire réagir la 3,6-bis-maléimidocoumarine avec des nombres variables d'équivalents d'acide 3-mercaptopropionique. À la suite à cette réaction, un graphique de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre d'équivalents doit être établie. Celui-ci est présenté

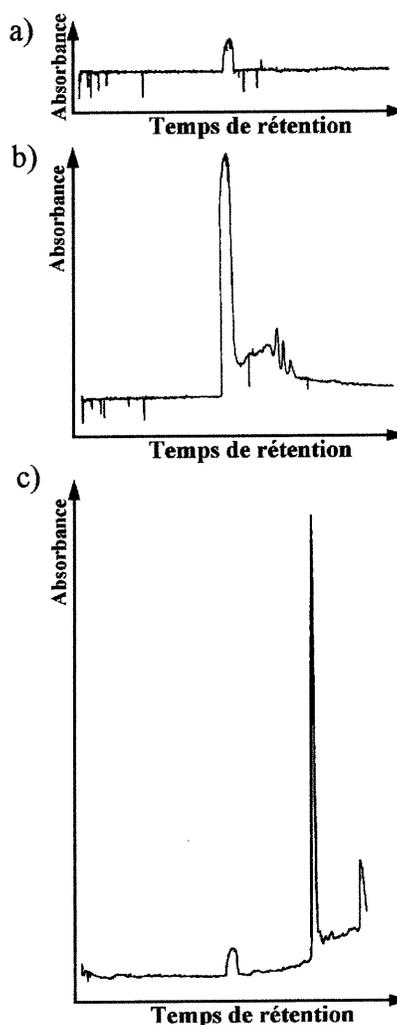


Figure 4.20 : Migration des produits finaux sur EC. a) Solvant seul. b) Produit disubstitué avec deux éthanethiols. c) Produit disubstitué avec

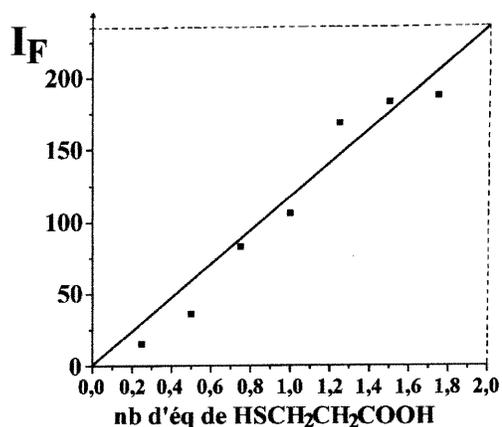


Figure 4.21 : Spectre de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre d'équivalents d'acide 3-mercaptopropionique.

à la figure 4.21.

Ici, l'on constate une grande similarité avec l'étude de croissance réalisée avec l'éthanethiol et présentée à la figure 4.16. En effet, tel qu'espéré, une droite a été obtenue.

Ces manipulations étant complétées, une saturation avec trois équivalents d'éthanethiol a été réalisée, suivi d'une analyse par électrophorèse capillaire. Le tableau IV.2 démontre les résultats obtenus.

Puisqu'il s'agit d'une mesure d'excitation de la part du détecteur de l'EC, il faut tenir compte du coefficient d'extinction molaire ϵ . Même si les valeurs du produit mono et diacide ne sont pas les mêmes, elles devraient être très près l'une de l'autre. Ainsi, afin de mieux visualiser les résultats, un tableau du rapport de chacun des constituants a été réalisé, et est présenté au tableau IV.3.

Tableau IV.2 Résultats de l'électrophorèse capillaire et des tests de fluorescence pour le fluorophore (1).

| nb éq. de HSCH ₂ CH ₂ COOH | aire du pic du monoacide | aire du pic du diacide | I _F correspondant |
|---|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| 3,00 | 000000 | 1408234 | 233 |
| 1,75 | 000000 | 1028757 | 187 |
| 1,50 | 000000 | 0902851 | 183 |
| 1,25 | 001395 | 0751913 | 168 |
| 1,00 | 066353 | 0519448 | 106 |
| 0,75 | 152975 | 0442419 | 083 |
| 0,50 | 250437 | 0272346 | 036 |
| 0,25 | 212928 | 0191530 | 015 |
| 0,00 | 000000 | 000000 | 000 |

Tableau IV.3 Rapport des produits mono et diacide.

| nb éq. de HSCH ₂ CH ₂ COOH | rapport du produit mono et diacide | I _F |
|---|---------------------------------------|----------------|
| 1,75 | 00,0 : 100,0 | 187 |
| 1,50 | 00,0 : 100,0 | 183 |
| 1,25 | 00,2 : 99,8 | 168 |
| 1,00 | 11,3 : 88,7 | 106 |
| 0,75 | 25,7 : 74,3 | 083 |
| 0,50 | 47,9 : 52,1 | 036 |
| 0,25 | 52,6 : 47,4 | 015 |
| 0,00 | 00,0 : 00,0 | 000 |

En cumulant les données de la figure 4.21 et du tableau IV.2, il est possible de tracer un graphique de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre d'unités de diacide tel que présenté à la figure 4.22. Il est possible de constater que les points forment une droite qui passe par l'origine. L'interprétation sera faite dans la discussion (section 4.3.5.4).

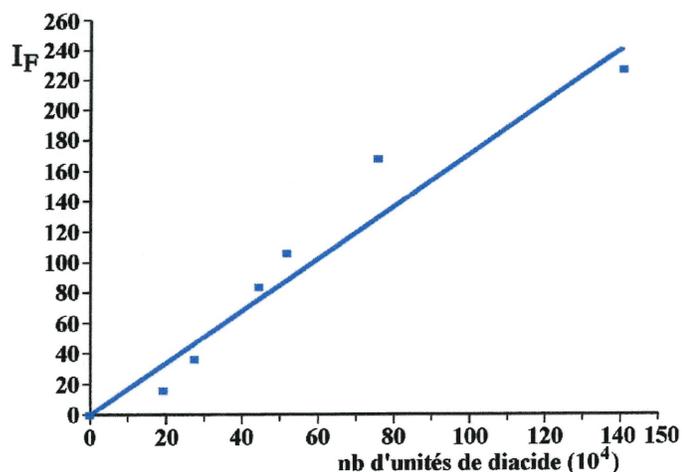


Figure 4.22 : Allure de la fluorescence du produit de réaction en fonction du nombre d'unités du produit diacide (bleu).

4.3.5.4 Discussion des résultats obtenus par électrophorèse capillaire.

En ce qui concerne la figure 4.20, il est possible d'obtenir des informations sur le temps de rétention des deux produits caractérisés mais le nombre d'unités est également extrêmement important puisque la valeur de fluorescence du produit caractérisé est connue. Ainsi, une corrélation directe pourra être établie entre la fluorescence et le nombre d'unités. Le solvant seul représente 220688 unités alors que le pic à la figure 4.20b) représente 1593167 unités, ce qui signifie que le produit disubstitué avec deux éthanethiols représente la différence entre ces deux valeurs, soit 1372479 unités. Le produit diacide, quant à lui, est évalué à 1408234 unités.

Ces informations seront importantes pour l'analyse du graphique 4.22 (intensité de fluorescence en fonction du nombre d'unités).

La figure 4.21 nous donne des informations sur l'intensité de fluorescence en fonction du nombre d'équivalents de produit thiolé placé dans la réaction. Une fois de plus, il s'agit d'une figure qui ne prendra tout son sens qu'une fois incluse dans le graphique 4.22.

En ce qui concerne les tableaux IV.2 et IV.3, la première conclusion à tirer est le très faible pourcentage de produit monoacide, par rapport au diacide. Il faut alors en déduire qu'un phénomène d'activation est probablement en cause et que l'ajout du deuxième acide doit être facilité par la présence du premier.

De plus, d'un point de vue théorique, il serait possible de tracer l'allure que pourrait avoir un graphique de l'intensité de fluorescence en fonction de l'aire sous la courbe du diacide analysé lors de l'électrophorèse capillaire (évalué en nombre d'unités). Ce graphique est présenté à la figure 4.23. Dans le premier cas, la droite bleue est représentative d'un produit monothiolé qui n'est pas fluorescent. En effet toute la fluorescence est directement reliée au nombre d'unités du produit diacide. Dans le

second cas, la droite rouge présente le cas inverse, soit un apport de fluorescence qui ne proviendrait pas exclusivement du produit diacide. À titre d'exemple, si le produit monothiolé est présent et fluorescent, il est possible d'induire de la fluorescence même si le produit monothiolé est présent et fluorescent, il est possible d'induire de la fluorescence même si le produit diacide n'est pas présent. Par

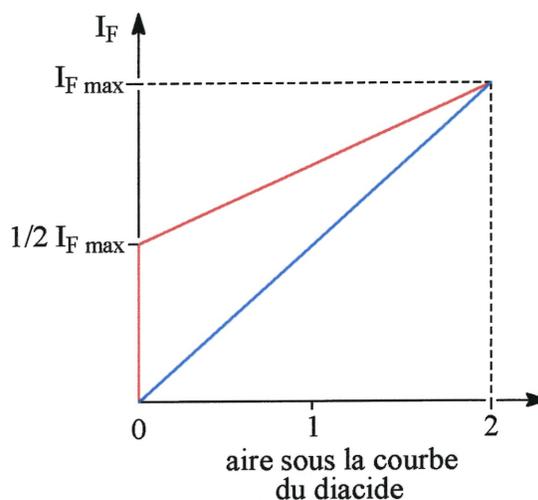


Figure 4.23 : Droite théorique de la détermination de fluorescence du produit portant une seule fonction acide (rouge) et portant deux fonctions acides (bleu).

conséquent, il est permis de tracer une droite où l'ordonnée est de valeur nulle jusqu'à une valeur maximale de $\frac{1}{2}I_F \text{ max}$. Dans un pareil cas, cela impliquerait 100% de produit monothiolé sans toutefois voir la trace du produit diacide. En ajoutant davantage de thiol sur les maléimides, le produit diacide commencerait à se former. La valeur de l'ordonnée atteindrait donc une valeur de $I_F \text{ max}$ de manière directement proportionnelle au nombre d'unités de diacide révélé par EC.

La droite de la figure 4.22 est très semblable à la droite théorique bleue de la figure 4.22. À première vue, il semble que le produit monothiolé ne soit pas fluorescent. Ceci est confirmé par plusieurs phénomènes. En effet, il est possible de constater un point à 1408234 unités, ce qui représente l'intensité de fluorescence maximale du produit diacide et la fluorescence du milieu.

À la lumière de ces nouvelles informations, il est possible de conclure que le produit monothiolé ne fluoresce pas et que le rendement de la réaction, établi à la section 4.3.4, doit être mesuré en fonction de la seconde équation, soit :

$$\text{rendement} = \frac{I_F \text{ obs à 2 éq.}}{I_F \text{ max}} \times 100$$

Sachant que I_F max est la valeur d'intensité de fluorescence du produit caractérisé à la section 4.3.2 et est évaluée à 180, il est possible de calculer un rendement de 86% puisque la valeur de I_F obs est évaluée à 155 (voir section 4.3.4)

4.4 Étude fluorométrique de la 3,6-bis-maléimidocoumarine avec un dithiol.

4.4.1 Test de saturation avec un dithiol.

En relation avec la section 4.3.1, ce segment tente de mimer les soufres des cystéines lors de l'apposition protéique. Par contre, contrairement au test décrit précédemment, les soufres du BMMB sont ici à la même distance que le seront ceux des cystéines. Ainsi, la mimique est beaucoup plus semblable et les résultats sont par conséquent très importants. Malgré la contrainte d'espace de ces mêmes soufres, le fluorophore devra induire une forte fluorescence lors de la réaction décrite à la figure 4.24.

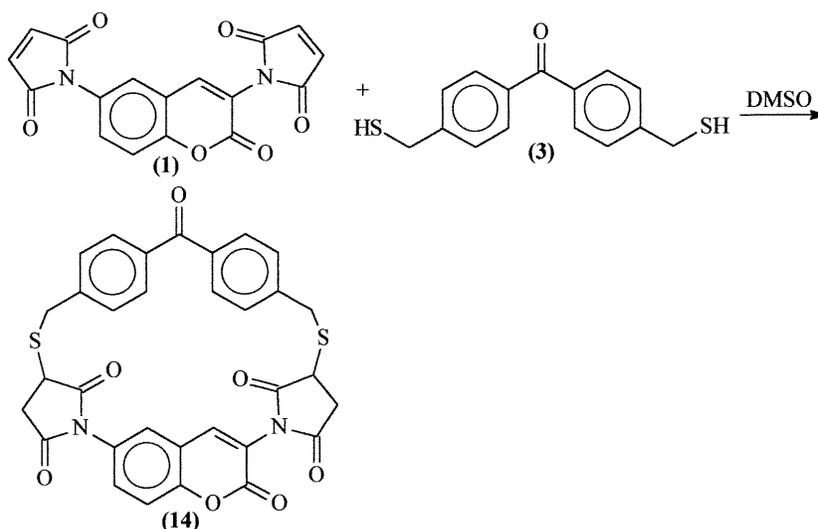


Figure 4.24 : Réaction du fluorophore (1) avec un équivalent de BMMB pour des fins de détection de fluorescence.

Les tests ont été effectués à une concentration de 10^{-3} M de fluorophore dans le diméthylsulfoxyde (1,68mg dans 5ml DMSO) en réaction avec deux équivalents de BMMB (2,74mg) à la température de la pièce pour une durée totale de 5 heures. Par la suite, un spectre d'excitation a été réalisé tel que présenté à la figure 4.25a). Un pic maximum d'excitation est identifiable à 383,6nm. Ainsi, un spectre d'émission de fluorescence a pu être réalisé à cette longueur d'onde, révélant une hausse marquée de I_F

tel qu'espéré. Ici, la valeur du blanc est nulle et la fente utilisée est de 2,5 nm.

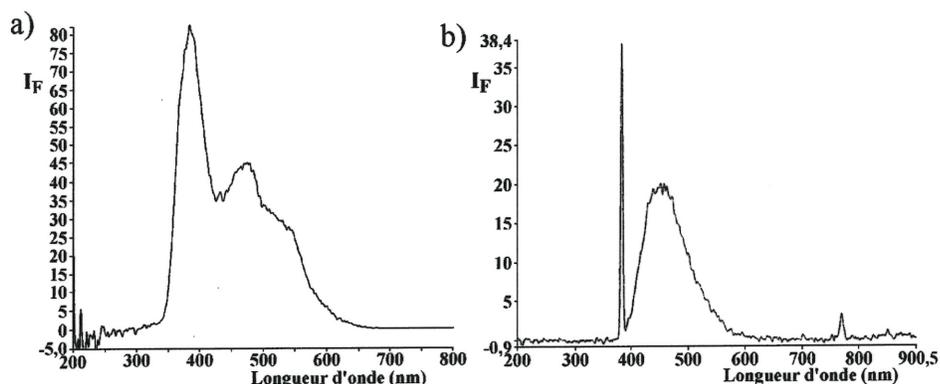


Figure 4.25 : a) Spectre d'excitation de la molécule (14) b) Spectre d'émission de la molécule (14) à 384nm.

Des dilutions ont permis de constater que la fluorescence est visible jusqu'à une concentration de 10^{-9} M. De plus, il est possible de constater que la molécule (14) (voir figure 4.26 a et b) a bien été obtenue puis qu'une extraction H₂O-chloroforme a été faite sur la solution, suivie d'un spectre de masse. La masse du produit de départ est absente (et qui serait non fluorescente de toute manière). De plus, aucun pic de masse ne correspond au fluorophore lié à deux molécules de BMMB qui, pour sa part, serait fluorescente. Par contre, un pic correspondant à 611,09g/mol est présent. Celui-ci peut correspondre au cycle ouvert (un seul soufre lié) ou au cycle fermé (deux sulfures liés). Par contre, il fut démontré à la section précédente que le produit monothiolé ne fluoresce pas. Il est donc raisonnable d'affirmer avoir obtenu le macrocycle correspondant à la molécule (14).

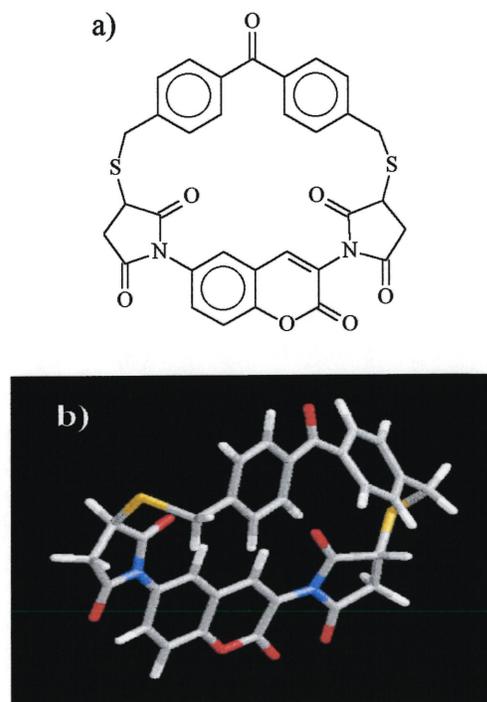


Figure 4.26 : a) Représentation de la molécule (14). b) Minimisation stérique de la molécule (14).

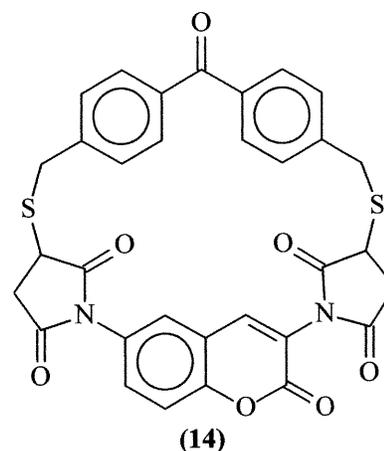
Le déplacement de Stoke est légèrement plus faible, soit de l'ordre de 66,4nm.

Il est vrai que ces molécules sont composées en fait du mélange de quatre stéréoisomères portant chacune une structure et une tension interne distinctes et, par conséquent, une fluorescence distincte. Par contre, ces valeurs, bien que différentes, se doivent d'être très proches les unes des autres. Il a été établi que les quatre stéréoisomères sont présents puisque deux produits sont observables sur RMN, et puisque les deux additions syn et les deux additions anti offrent des paires d'énantiomères⁴⁵. Il est possible de conclure que les quatre structures sont présentes. Il serait bien sûr intéressant d'isoler et de caractériser chacune de ces structures, mais il s'agirait ici d'un objectif extraordinairement complexe puisque leur séparation, sur chromatographie sur couche mince, est très subtile. De plus, il ne serait possible de séparer que les diastéréoisomères mais pas les énantiomères.

Les résultats de cette section nous permettent de conclure que le macrocycle **(14)** constitué des molécules **(1)** et **(3)** fluoresce, et ce, dans la même bande d'émission que présenté à la section 4.3.1.

4.4.2 Caractérisation du composé 14.

Tel que décrit à la section 4.3.2, il est essentiel de caractériser le produit final (14) de la réaction afin d'établir la fluorescence maximale du composé. Une comparaison entre celle-ci et la fluorescence de réaction pourra alors être réalisée afin de déterminer le rendement. Les conditions de réaction et les propriétés physiques du composé sont fournies à la section 3 (partie expérimentale).



Une fois de plus, le spectre d'excitation n'a pas été illustré puisqu'il est identique au spectre d'excitation présenté à la section 4.4.1. Par le fait même, le pic maximum d'excitation se localise à 383,6nm.

Pour sa part, le spectre d'émission obtenu à partir d'une solution à 10^{-3} M est présenté à la figure 4.27.

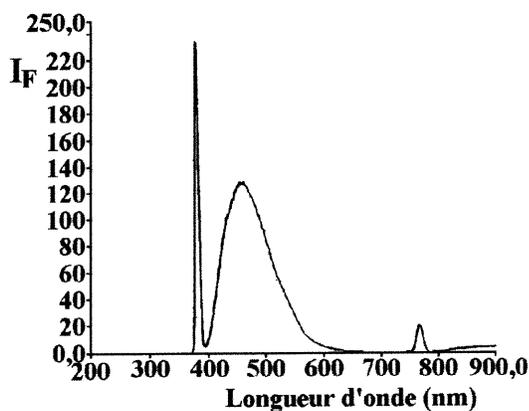


Figure 4.27 : Spectre d'émission de la molécule (14) caractérisée.

La fluorescence de réaction a une intensité de 105 (une fois soustraite du blanc) alors que la fluorescence maximale est évaluée à 125. Une discussion détaillée concernant ces résultats sera faite à la section 4.4.4.

4.4.3 Cinétique de fluorescence.

Tel que discuté à la section 4.3.3, une étude d'intensité de fluorescence en fonction du temps permet d'établir la vitesse de formation du produit attendu. Cette étude a été réalisée à $10^{-3}M$ avec un équivalent de BMMB dans le diméthylsulfoxyde à la température de la pièce. Les I_F ont été pris en utilisant une longueur d'onde d'émission de 384nm avec des fentes de 5 nm tel que démontré à la figure 4.28.

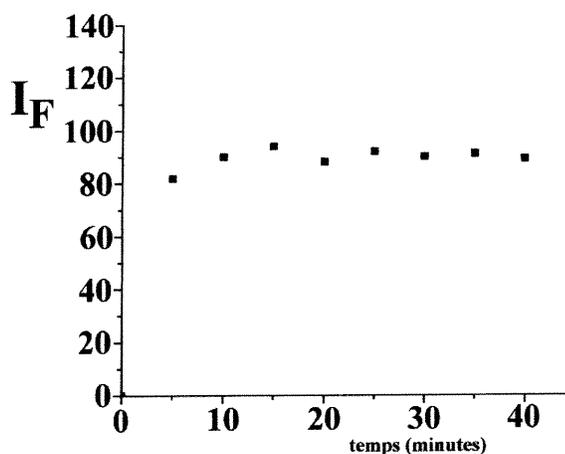


Figure 4.28 : Cinétique de fluorescence; intensité de fluorescence en fonction du temps pour la réaction du fluorophore (I) avec le BMMB.

Un plateau est formé à une valeur maximale de 90, ce qui correspond à l'intensité de fluorescence observable à la figure 4.25 et à exactement un équivalent de BMMB. Ces résultats sont donc concordants.

Tel que réalisé précédemment, les tests d'intensité de fluorescence se sont poursuivis durant 5040 minutes, soit 84 heures. Une très faible diminution de fluorescence ($I_F = 88$ après 84 heures de réaction) laisse croire que le produit formé est très stable.

À la suite de ces résultats, il est possible de déduire que la réaction est complète après environ 5 minutes.

4.4.4 Test de croissance de fluorescence avec un dithiol.

Contrairement à ce qui a été démontré à la section 4.3.4, le profil de réaction (incluant les intermédiaires) avec le BMMB est beaucoup plus simple que celui impliquant l'éthanethiol. En effet, la figure 4.29 illustre bien ce phénomène.

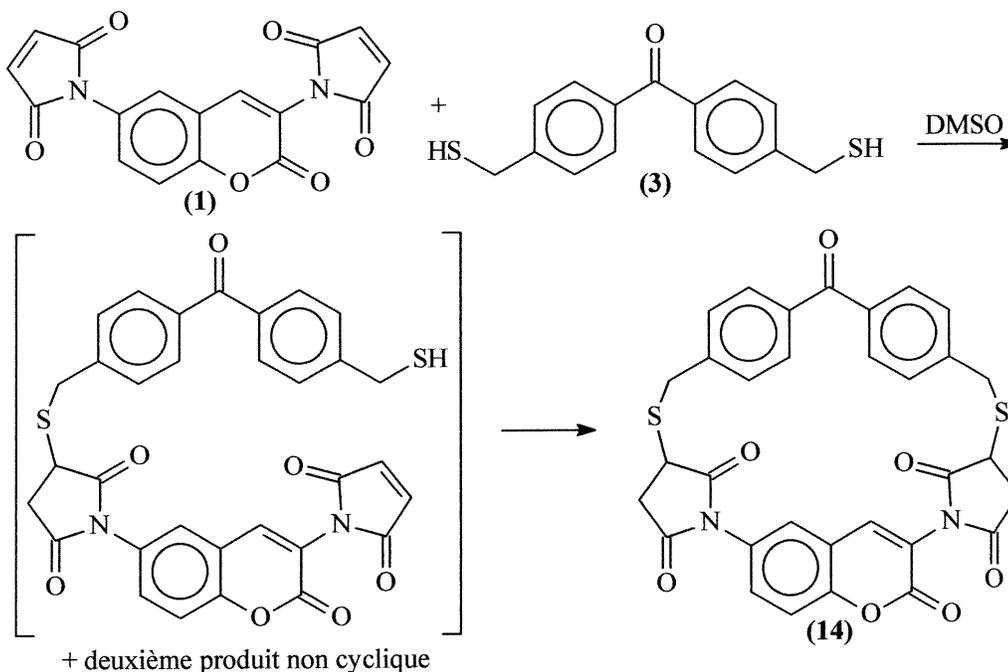


Figure 4.29 : Représentation des intermédiaires réactionnels de la réaction du fluorophore (1) avec le BMMB.

À titre d'exemple, si 0,25 éq de BMMB est placé en présence du fluorophore, il est possible de déduire que 25% du produit se retrouvera sous la forme d'intermédiaire non cyclisé (puisque'il a été démontré que deux BMMB ne se lient pas spontanément sur un même fluorophore) et 75% restera sous la forme du réactif de départ. Si la réaction est quantitative, les 25% de produit non cyclisé poursuivent leur réaction pour devenir 25% de produit cyclisé. Ainsi, le nombre

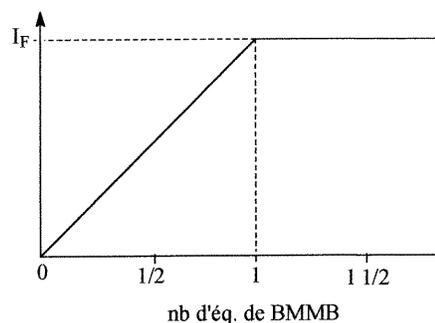


Figure 4.30 : Allure théorique d'une étude nb d'éq de fluorophore en fonction de I_F au cours de la réaction fluorophore-BMMB.

d'équivalents de BMMB est directement proportionnel au pourcentage de produit disoufré et donc à l'intensité de fluorescence tel que démontré à la figure 4.30.

D'un point de vue expérimental, une droite a été réalisée en faisant varier le nombre d'équivalents de BMMB utilisé et en prenant les valeurs de I_F correspondantes. Ces échantillons ont été réalisés à une concentration de $10^{-3}M$ dans le diméthylsulfoxyde en utilisant les fentes de 5 nm. Les résultats sont présentés à la figure 4.31.

Une fois de plus, l'accroissement de l'intensité de fluorescence se poursuit à des valeurs qui excèdent un équivalent de BMMB dans le but de voir si la réaction est complète. La ligne pleine représente les résultats expérimentaux alors que la ligne en pointillés représente l'allure du graphique si la réaction était quantitative (données prises à partir de la section 4.4.2).

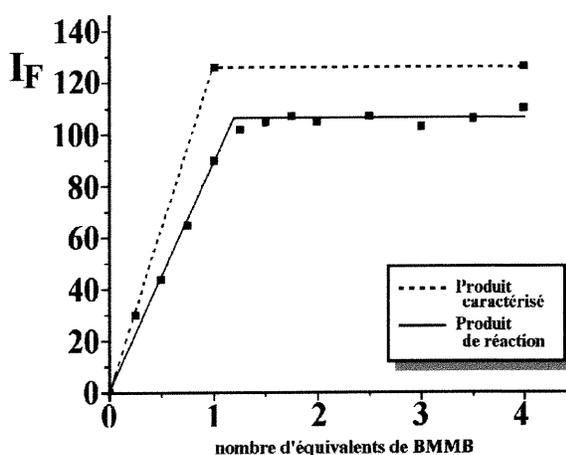


Figure 4.31 : Étude de l'augmentation de fluorescence au cours de la réaction fluorophore-BMMB en fonction du nb d'équivalents de BMMB.

Dans le premier cas, l'augmentation linéaire de fluorescence se réalise jusqu'à une valeur de I_F obs égale à 105. Cette valeur est atteinte à 1,2 équivalent de BMMB. Dans le deuxième cas, la valeur de I_F max est de 125. Puisqu'il a été démontré que la fluorescence est directement proportionnelle au pourcentage de produits disoufrés, alors

$$\text{rendement} = \frac{I_F \text{ obs à 2 éq.}}{I_F \text{ max}} \times 100$$

Ainsi, cette section permet de conclure que le rendement de la réaction est évalué à 84%.

4.5 Comportement du fluorophore dans des solvants polaires et étude de dilution.

Maintenant que les études antérieures ont démontré que le fluorophore a le comportement désiré, c'est-à-dire qu'il fluoresce peu lorsque non lié à des groupements sulfurés et qu'il devient beaucoup plus fluorescent après réaction avec deux équivalents d'un thiol ou encore avec un équivalent de dithiol, il est temps de passer à la dernière étape, à l'étude de dilution. Ici, la λ_{exc} change avec les différentes concentrations utilisées dans le seul but de maximiser la fluorescence (basé sur l'absorbance maximale de la solution). Il aurait également été possible de réaliser tous les tests à la même longueur d'onde sans voir de différence majeure.

Tableau IV.4 : Étude de fluorescence (à 10^{-3} M et à 380 nm) d'une réaction de fluorophore (I) avec l'éthanethiol.

| Solvant | Solubilité | $I_{F\ obs}$ | $I_{F\ blanc}^*$ | $I_{F\ cor.}^{**}$ |
|---------------------------------|------------|--------------|------------------|--------------------|
| MeOH 7% / DMSO 93% | Soluble | >1000 | 14 | >986 |
| MeOH 100% | Soluble | 340 | 18 | 322 |
| MeOH 90% / H ₂ O 10% | Soluble | 325 | 27 | 298 |
| MeOH 80% / H ₂ O 20% | Soluble | 320 | 22 | 298 |
| MeOH 70% / H ₂ O 30% | Soluble | 340 | 24 | 316 |
| MeOH 60% / H ₂ O 40% | Soluble | 350 | 24 | 326 |
| MeOH 50% / H ₂ O 50% | Soluble | 145 | 29 | 116 |
| MeOH 40% / H ₂ O 60% | Insoluble | >1000 | 16 | >984 |
| MeOH 30% / H ₂ O 70% | Insoluble | 325 | 29 | 296 |
| MeOH 20% / H ₂ O 80% | Insoluble | 155 | 43 | 112 |
| MeOH 10% / H ₂ O 90% | Insoluble | 400 | 100 | 300 |

$I_{F\ blanc}^*$: intensité de fluorescence du fluorophore seul (sans thiol).

$I_{F\ cor.}^{**}$: intensité de fluorescence observée ($I_{F\ obs}$) – intensité de fluorescence du blanc ($I_{F\ blanc}$).

Les protéines sont des structures qui exigent des conditions aqueuses pour éviter qu'elles ne précipitent. Jusqu'à présent, tous les tests de fluorescence se sont réalisés dans le diméthylsulfoxyde, un solvant tout à fait inapproprié pour les protéines. Il s'agit alors de déterminer d'autres conditions de solvant où la réaction peut être effectuée et ce,

dans les conditions les plus polaires possible. Le tableau IV.4 démontre la première série de tests qui a été réalisée.

Une précision importante à signaler est que la solubilité du fluorophore est très faible (exception faite du DMSO). Ainsi, la connotation "soluble" réfère à l'homogénéité de la solution après réaction et non à son état initial.

À priori, il est possible de constater que le solvant le plus polaire à utiliser à $10^{-3}M$ est MeOH 50% - H₂O 50%. Si l'on utilise un solvant plus polaire, l'intensité de fluorescence est encore visualisable (et même plus intense), mais elle est inappropriée. En effet, le solvant est trop polaire pour permettre au fluorophore de se dissoudre en quantité suffisante pour obtenir un bon rendement. De plus, la concentration solubilisée du réactif de départ est très faible.

Le fluorophore (1) a été ensuite testé dans des solutions de tampons phosphates, tel que présenté au tableau IV.5.

Tableau IV.5 : Fluorescence (à $10^{-3}M$ et à 390nm) d'une réaction du fluorophore (1) avec l'éthanethiol en utilisant du tampon phosphate, pH = 7,2.

| Solvant | Solubilité | I _{F obs} | I _{F blanc *} | I _{F cor. **} |
|-----------------------|------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| MeOH 50% / Tampon 50% | Soluble | 140 | 100 | 40 |
| MeOH 40% / Tampon 60% | Soluble | 90 | 39 | 51 |
| MeOH 30% / Tampon 70% | Soluble | 270 | 43 | 227 |
| MeOH 20% / Tampon 80% | Soluble | 320 | 38 | 282 |
| MeOH 10% / Tampon 90% | Soluble | 200 | 39 | 161 |

I_{F blanc *} : intensité de fluorescence du fluorophore seul (sans thiol).

I_{F cor. **} : intensité de fluorescence observée (I_{F obs}) – intensité de fluorescence du blanc (I_{F blanc}).

Le tampon phosphate semble affecter très peu la réaction puisque les intensités de fluorescence pour le MeOH 50% / H₂O 50% et pour MeOH 50% / Tampon phosphate 50% sont similaires. Par contre, le phosphate semble augmenter la vitesse de réaction. Cette notion de vitesse de réaction a d'ailleurs été observée dans un article⁴².

Il est impossible de concentrer des protéines jusqu'à des concentrations de l'ordre de 10^{-3} M dans le but de faire des tests de fluorescence. Une précipitation serait inévitable et ce, même avec des conditions MeOH 10% / Tampon 90%. Ainsi, il faut diluer les échantillons, ce qui devrait, par le fait même, permettre d'optimiser les conditions de polarité. Le tableau IV.6 démontre les résultats obtenus à 10^{-4} M.

Tableau IV.6 : Fluorescence (à 10^{-4} M et à 333 nm) d'une réaction de fluorophore (I) avec l'éthanethiol.

| Solvant | Solubilité | $I_{F \text{ obs}}$ | $I_{F \text{ blanc } *}$ | $I_{F \text{ cor. } **}$ |
|-----------------------|------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| MeOH 50% / Tampon 50% | Soluble | 450 | 120 | 330 |
| MeOH 40% / Tampon 60% | Soluble | 460 | 106 | 354 |
| MeOH 30% / Tampon 70% | Soluble | 400 | 74 | 326 |
| MeOH 20% / Tampon 80% | Soluble | 325 | 88 | 237 |
| MeOH 10% / Tampon 90% | Insoluble | 440 | 77 | 370 |

$I_{F \text{ blanc } *}$: intensité de fluorescence du fluorophore seul (sans thiol).

$I_{F \text{ cor. } **}$: intensité de fluorescence observée ($I_{F \text{ obs}}$) – intensité de fluorescence du blanc ($I_{F \text{ blanc}}$).

Une simple dilution de dix fois a permis de passer de MeOH 40% / Tampon 60% à MeOH 20% / Tampon 80% en gardant une intensité de fluorescence tout à fait acceptable. Par contre, 10^{-4} M est encore très concentré. Les dilutions doivent donc se poursuivre tel que démontré dans le tableau IV.7.

Il est donc possible de faire les tests protéiques dans des conditions MeOH 10% / Tampon 90%, ce qui est acceptable. En effet, la polarité est suffisante pour éviter une précipitation protéique. Par contre, l'intensité de fluorescence est relativement faible. Or, les tests protéiques ne visent pas à quantifier, mais plutôt à visualiser la fluorescence. Sachant qu'il est possible d'augmenter la sensibilité du fluorimètre, il n'y aura aucun mal à voir la fluorescence, si fluorescence il y a, lors de l'apposition protéique.

Tableau IV.7 : fluorescence (à $10^{-5}M$ et à 315nm) d'une réaction de fluorophore (I) avec l'éthanethiol.

| Solvant | Solubilité | $I_{F \text{ obs}}$ | $I_{F \text{ blanc}^*}$ | $I_{F \text{ cor.}^{**}}$ |
|-----------------------|------------|---------------------|-------------------------|---------------------------|
| MeOH 50% / Tampon 50% | Soluble | 220 | 100 | 120 |
| MeOH 40% / Tampon 60% | Soluble | 160 | 80 | 80 |
| MeOH 30% / Tampon 70% | Soluble | 93 | 65 | 28 |
| MeOH 20% / Tampon 80% | Soluble | 70 | 50 | 20 |
| MeOH 10% / Tampon 90% | Soluble | 58 | 34 | 24 |

$I_{F \text{ blanc}^*}$: intensité de fluorescence du fluorophore seul (sans thiol).

$I_{F \text{ cor.}^{**}}$: intensité de fluorescence observée ($I_{F \text{ obs}}$) – intensité de fluorescence du blanc ($I_{F \text{ blanc}}$).

Ici, il est important de spécifier que les dilutions de l'ordre de $10^{-3}M$ à $10^{-5}M$ ont pu être réalisées en pesant directement le fluorophore, puis en ajoutant le solvant adéquat, ce qui ne fut pas le cas des solutions à $10^{-6}M$ (préparation par dilution). De plus, sachant que le produit de départ n'est pas particulièrement soluble, il est possible que l'échantillon prélevé contenait beaucoup (voir MeOH 10% / Tampon 90% - test 2) ou très peu (voir MeOH 20% / Tampon 80% - tests 1 et 2) de fluorophore, ce qui a pour effet d'induire des différences marquées de fluorescence et donc des résultats très variés. Pour remédier à ce problème, il est possible d'utiliser une solution tampon-diméthylsulfoxyde. En solubilisant le fluorophore dans le DMSO puis en ajoutant le

Tableau IV.8 : Fluorescence (à $10^{-6}M$ et à 315nm) d'une réaction de fluorophore (I) avec l'éthanethiol.

| Solvant | Solubilité | $I_{F \text{ obs}}$ (test 1) | $I_{F \text{ obs}}$ (test 2) | $I_{F \text{ blanc}^*}$ | $I_{F \text{ cor.}^{**}}$ |
|-----------------------|------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| MeOH 50% / Tampon 50% | Soluble | 75 | 85 | 72 | 6,5 |
| MeOH 40% / Tampon 60% | Soluble | 82 | 58 | 55 | 15 |
| MeOH 30% / Tampon 70% | Soluble | 104 | 40 | 40 | 32 |
| MeOH 20% / Tampon 80% | Soluble | 32 | 28 | 30 | 1 |
| MeOH 10% / Tampon 90% | Soluble | 32 | 120 | 25 | 61 |

$I_{F \text{ blanc}^*}$: intensité de fluorescence du fluorophore seul (sans thiol).

$I_{F \text{ cor.}^{**}}$: intensité de fluorescence observée ($I_{F \text{ obs}}$) – intensité de fluorescence du blanc ($I_{F \text{ blanc}}$).

tampon phosphate, aucune précipitation n'apparaît et ce jusqu'à une solution 1% DMSO – 99% tampon phosphate (à 10^{-6} M). Par contre, la fluorescence devient alors imperceptible*. Les solutions MeOH-tampon phosphate, bien qu'imparfaites pour des causes de solubilité, demeurent la meilleure combinaison possible.

Il est à noter que des tests de polarité n'ont pu être réalisés sur la réaction avec le BMMB puisque ce dernier n'est soluble que dans le diméthylsulfoxyde ou les composés organiques.

Ainsi, il sera donc possible de faire les tests protéiques dans le solvant MeOH 10% / tampon 90% et à une concentration de l'ordre de 10^{-6} M.

* Test mené sur des solutions 10% DMSO jusqu'à 1% DMSO.

5 Étude fluorométrique pour le fluorophore (2)

Les tests précédents ont été menés sur un fluorophore dont la distance entre les deux groupements maléimides convient à la distance entre les cystéines de chacune des protéines qui s'apposent l'une à l'autre. Cependant, pour vérifier que la fluorescence détectée au cours d'une apposition protéique ne soit pas due à une réaction d'apposition non-spécifique ou à une autre réaction secondaire, un fluorophore trop grand doit être synthétisé et testé. Les détails expérimentaux concernant la synthèse de ce fluorophore trop grand ont été donnés au chapitre 3. Dans le présent chapitre, les résultats des tests de fluorescence faits avec la molécule (2) sont expliqués.

Même si le fluorophore à l'étude est construit spécifiquement dans le but de visualiser une réponse négative (en terme de hausse de fluorescence), lorsque mis en présence des protéines apposées, il va de soit que chacun des tests menés sur le premier fluorophore (1) doit être répété pour le second, le fluorophore (2). En effet, il faut être en mesure de prouver que celui-ci est "fonctionnel" et que l'absence de hausse de fluorescence avec les protéines n'est pas dû à une problématique structurelle de la molécule, mais bien à une absence de disubstitution de la part des cystéines contenues dans les protéines.

5.1 Test mené sur le fluorophore (2) non lié à des sulfures

Tel que décrit à la section 4.2, une hausse de fluorescence lors de liaisons sur des fonctions maléimides implique une fluorescence basale (en absence de substitution) très faible. Afin de vérifier si l'ajout du groupement phényle influence cette dernière, il faut procéder de la même façon, soit par la prise d'un spectre d'émission.

Pour ce faire, une solution de fluorophore 10^{-3} M a été réalisée dans le diméthylsulfoxyde. Un spectre d'excitation a ainsi pu être obtenu en prenant soin

d'ajuster les fentes à une valeur de 0 nm (la raison sera expliquée à la section 5.2). Le résultat est présenté à la figure 5.1a. Deux pics d'excitation maximale sont alors prédominants, soit à des longueurs d'onde de 484nm et 546nm. Afin de s'assurer que ceux-ci n'engendrent aucune fluorescence, un spectre d'émission a été établi pour chacune de ces longueurs d'onde. Aucun d'eux ne présente de trace de fluorescence (voir figure 5.1b). En effet, les pics sont principalement dû au bruit de fond et ne sont nullement ressemblants à des pics de fluorescence (comparés avec les spectres présentés aux sections 4.2 et 4.3).

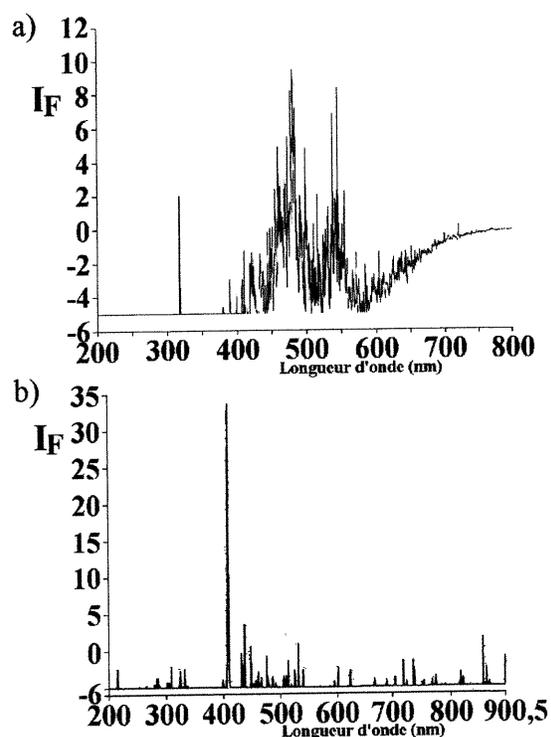


Figure 5.1: a) Spectre d'excitation du fluorophore (2) non substitué.
b) Spectre d'émission du fluorophore (2) non substitué à $\lambda_{exc}=484nm$.

De plus, des études de dilution ont démontré une absence de fluorescence et ce, même jusqu'à des concentrations de l'ordre de 10^{-12} M. L'absence de fluorescence n'est donc pas due à un effet d'atténuation de fluorescence par collision moléculaire.

Par conséquent, il est possible de conclure que l'ajout d'un groupement phényle n'altère pas la propriété fluorométrique de la molécule non substituée par des sulfures.

5.2 Étude fluorométrique de la molécule (2)

5.2.1 Test de saturation avec un thiol

Le but de cette section consiste à prouver que l'ajout de substituants soufrés sur les maléimides, induit bel et bien de la fluorescence. Afin de confirmer ce phénomène, deux structures ont été testées, soit une réaction avec l'éthanethiol (voir figure 5.2a) et une seconde à l'aide de l'acide 3-mercaptopropionique (voir figure 5.2b). Ces tests ont été réalisés à 10^{-3} M dans le diméthylsulfoxyde à la température de la pièce pour une

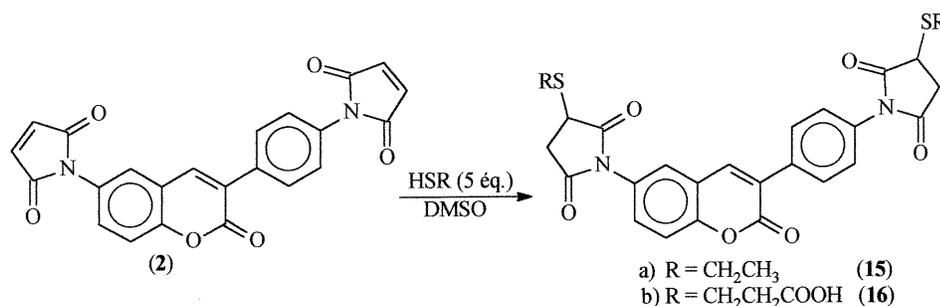


Figure 5.2 : Réaction du deuxième fluorophore (2) avec l'éthanethiol (a) ou l'acide 3-mercaptopropionique (b) pour des fins de détection de fluorescence.

durée totale de 5 heures.

Pour chacun des produit de réaction, un spectre d'excitation a été réalisé, en prenant soin d'ajuster la fente du fluorimètre à une valeur de 0 nm. Ainsi, une comparaison est facile entre ces spectres et celui du blanc, présenté à la section 5.1.

L'allure des spectres d'excitation démontrés à la figures 5.3 a et 5.3 c montrent une très grande similarité. Ces résultats tombent sous le sens en gardant à l'esprit que l'agent responsable de cette variation, réside dans les carbonyles des maléimides. La nature du thiol influence donc l'excitation de manière très subtile.

La structure de ces thiols aura, par contre, une importance indéniable en ce qui concerne l'intensité de fluorescence maximale. En effet, la fonction acide est une

structure qui atténue la fluorescence (voir section 4.1), ainsi, il est possible de s'attendre à une fluorescence plus basse en ce qui concerne la réaction avec l'acide 3-mercaptopropionique. Ce phénomène est bel et bien observé, comme le montre la figure 5.3 b et d.

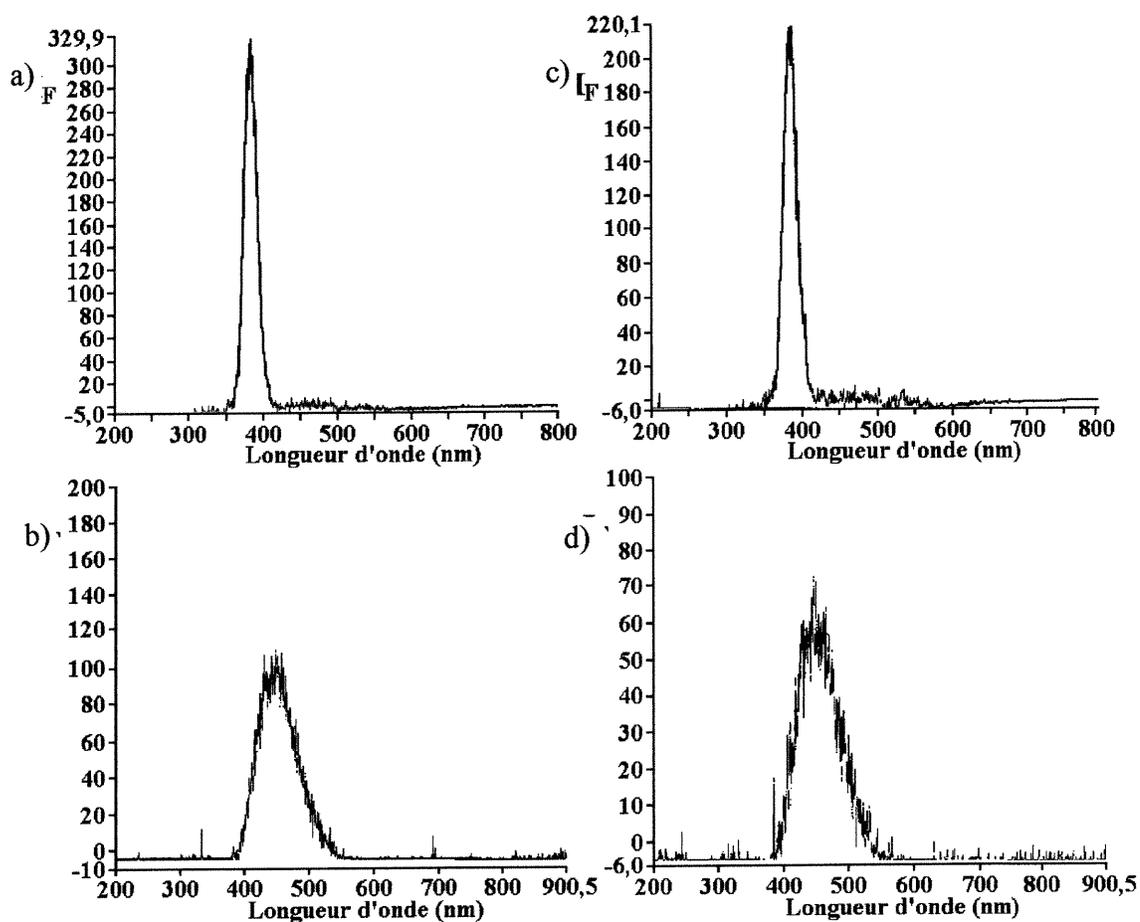


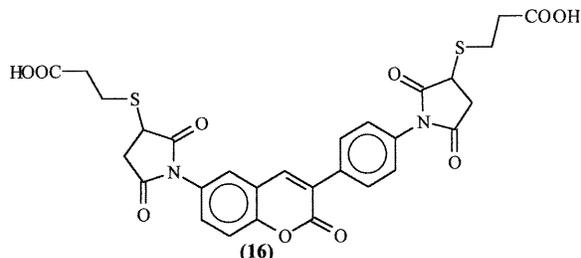
Figure 5.3 : a) Spectre d'excitation du fluorophore (2) disubstitué à l'éthanethiol, fente=0 nm. b) Spectre d'émission du fluorophore (2) disubstitué à l'éthanethiol, $\lambda_{exc} = 383$ nm et fente=0 nm. c) Spectre d'excitation du fluorophore (2) disubstitué à l'acide 3-mercaptopropionique, fente=0 nm. d) Spectre d'émission du fluorophore (2) disubstitué à l'acide 3-mercaptopropionique, $\lambda_{exc} = 384$ nm et fente=0 nm.

Pour chacun des produits de réaction, le spectre d'émission présente une large bande de fluorescence dans des longueurs d'onde de 380 à 550 nm, avec une intensité maximale à 460 nm.

La théorie de la particule dans la boîte affirme que l'ampleur de la délocalisation des électrons d'une molécule influence la longueur d'onde d'émission de celle-ci. Donc, l'ajout du groupement phényle aurait pu déplacer cette large bande d'émission. Par contre, le groupe phényle est orthogonal. Ainsi, il y a peu ou pas de conjugaison entre les systèmes π .

5.2.2 Caractérisation du composé 16

Pour des fins de commodité, les sections 5.2.4 et 5.2.5 étudient la disubstitution du fluorophore (2) avec l'acide 3-mercaptopropionique, plutôt qu'avec l'éthanedithiol tel qu'établi au



chapitre 4. En effet, les conclusions possibles à tirer de ces résultats demeurent identiques. Ainsi, la caractérisation fluorométrique du produit portant deux acides doit être faite de manière à avoir une idée de la fluorescence maximale pouvant être atteinte par la molécule disubstituée. Les conditions de réactions et les propriétés physiques du composé sont fournies au chapitre 3 (partie expérimentale).

Ici, le spectre d'excitation n'a pas été fourni puisqu'il est en tout point identique à celui présenté à la section 5.2.1. Afin de réaliser le spectre d'émission, une longueur d'onde de 384 nm a été utilisée.

Pour sa part, le spectre d'émission est présenté à la figure 5.4. Il est possible d'évaluer la fluorescence à une valeur de 368,4. Cette valeur correspond donc à l'intensité de fluorescence maximale de la molécule, avec une fente de 2,5 nm. À l'aide de cette valeur, il sera possible de déterminer le rendement de la réaction (ces résultats seront présentés dans les sections à venir).

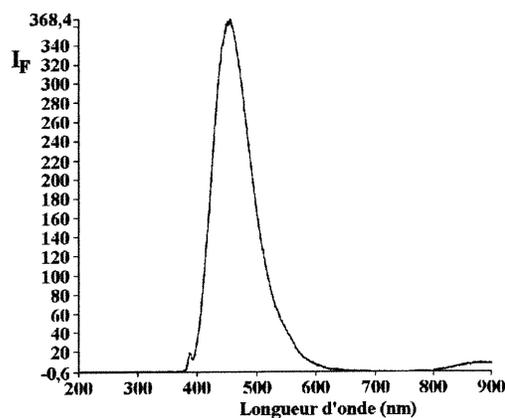


Figure 5.4 : Spectre d'émission du produit caractérisé du fluorophore (2) après réaction avec l'acide 3-mercaptopropionique, fente=2,5 nm.

5.2.3 Cinétique de fluorescence pour le fluorophore 2

Afin d'être en mesure d'évaluer la vitesse de la réaction, une étude de l'intensité de fluorescence par rapport au temps doit être réalisée (voir figure 5.5). L'étude a été réalisée à une concentration de 10^{-3} M dans le diméthylsulfoxyde tant pour la réaction avec l'éthanethiol (trait bleu) que pour l'acide 3-mercaptopropionique (trait rouge).

Chacun des points du graphique provient d'un spectre d'émission qui a été pris à une longueur d'onde de 384nm, une valeur obtenue par le spectre d'absorption.

Les plateaux obtenus sont respectivement d'une valeur de I_F évaluée à 417 pour l'éthanethiol et 273 pour l'acide 3-mercaptopropionique.

Tel que décrit à la section 4.3.3, les tests d'intensité de fluorescence ont été réalisés jusqu'à 5040 minutes soit 84 heures. Une perte de fluorescence de l'ordre de 6% a été obtenue, ce qui démontre que le produit formé ne se dégrade que très peu en fonction du temps.

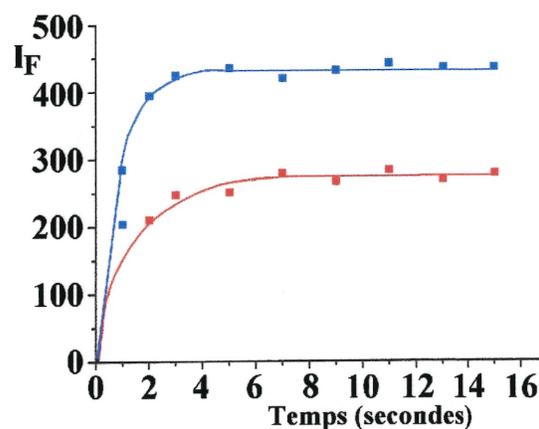


Figure 5.5 : Cinétique de fluorescence; intensité de fluorescence en fonction du temps pour la réaction du fluorophore (2) avec, l'éthanethiol (bleu) et l'acide 3-mercaptopropionique (rouge).

5.2.4 Test de croissance de fluorescence pour le fluorophore (2) en réaction avec des thiols

Au cours de la réaction de substitution des maléimides avec des molécules soufrées, les intermédiaires réactionnels sont les mêmes, peu importe la présence d'un groupement phényle. Ainsi, les profils hypothétiques de la fluorescence du produit monothiolé demeurent valables (voir figure 4.12). Les équations qui y sont associées sont, par conséquent, toujours adéquates.

De plus, la nature du thiol n'aura pas d'impact sur le profil de la croissance de fluorescence car il ne fait varier que la vitesse de réaction et l'intensité de fluorescence.

Par conséquent, un profil expérimental de la fluorescence en fonction du nombre d'équivalents de thiol (ici l'acide 3-mercaptopropionique) peut être établi (voir figure 5.6). La ligne pleine représente le profil expérimental alors que la ligne pointillée représente le profil théorique (produit caractérisé). Chacune des lectures s'est réalisée à une concentration de 10^{-3} M dans le diméthylsulfoxyde avec une fente de 2,5 nm.

À première vue, le profil expérimental (ligne pleine) ne ressemble à aucun profil proposé à la figure 4.12. Il pourrait s'agir de deux choses. Dans un premier temps, de la droite magenta, qui serait toutefois imparfaite. Dans un deuxième temps, il serait question de la droite bleue avec un effet d'atténuation beaucoup plus important que pour le fluorophore (1). Il ne sera possible de déterminer le véritable profil qu'après analyse du produit monothiolé lors de l'électrophorèse capillaire.

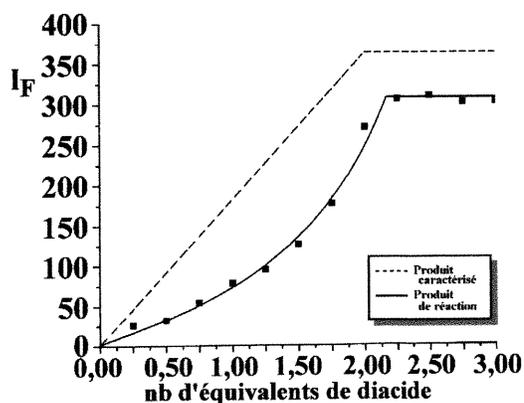


Figure 5.6 : Profil expérimental de l'intensité de fluorescence du fluorophore 2 en réaction avec des quantités variables d'acide 3-mercaptopropionique.

En ce qui concerne le calcul de rendement, si la première hypothèse est la bonne, alors :

$$\text{rendement} = \left(\frac{I_{F\text{obs à 2eq}}}{\frac{1}{2}I_{F\text{max}}} - 1 \right) \times 100$$

et si la seconde hypothèse est la bonne, alors :

$$\text{rendement} = \frac{I_{F\text{ obs à 2 éq.}}}{I_{F\text{ max}}} \times 100$$

5.2.5 Étude du produit monothiolé du fluorophore (2)

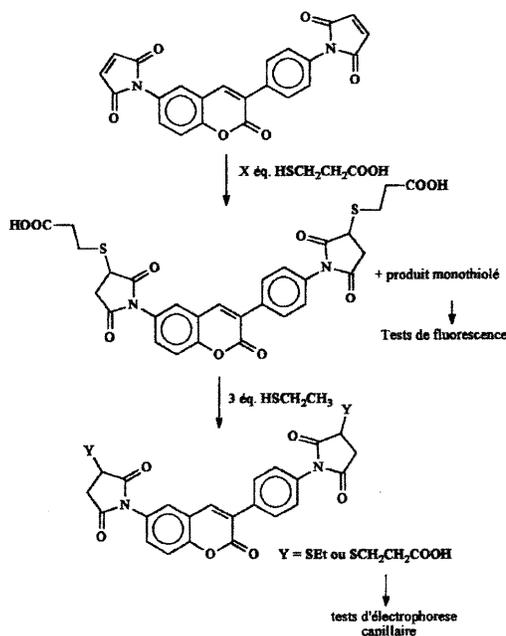


Figure 5.7: Étapes à suivre pour faire l'EC pour le fluorophore (2).

Les mêmes conditions expérimentales d'électrophorèse capillaire ont été utilisées pour chacun des fluorophores (15KV, tampon CHES 0,1M, pH=9,0, vitesse d'impression, atténuation=64 voir section 4.3.5). Les seules modifications ont été la longueur d'onde utilisée soit 384nm (voir section 5.2.1) et la nature du solvant lors de la réaction. En effet, une solution 90% H₂O – 10% DMSO ne permet pas une solubilisation adéquate du fluorophore. Ainsi, la réaction s'est produite à 10⁻³M dans le diméthylsulfoxyde.

Les mêmes pics de dégradation sont observables après réaction avec uniquement l'acide 3-mercaptopropionique et à moins de deux équivalents. Ainsi, les maleimides doivent être saturés d'éthanethiol pour remédier à ce problème, comme ce fut le cas pour le fluorophore (1) (voir figure 5.7).

Le produit disubstitué à deux éthanethiols n'est pas chargé et a donc une migration rapide. En fait, il sort avec le front de solvant à 6,64 minutes. Puisque le comportement est identique au fluorophore (1), seul le pic du produit caractérisé a été représenté (voir figure 5.8). Le

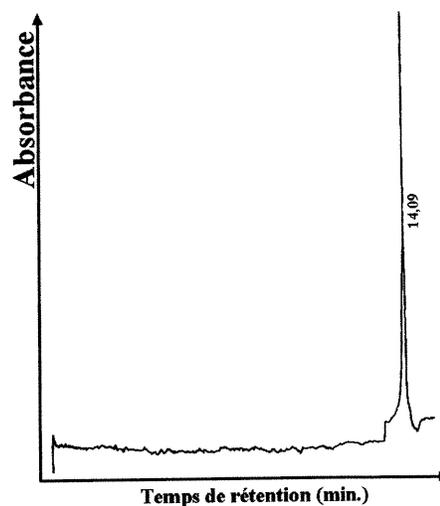


Figure 5.8: Migration du produit disubstitué avec deux fonctions thioacides sur EC.

pic du fluorophore portant deux fonctions thioacides sort à 14,09 minutes, ce qui est logique puisque la charge et le volume de la molécule sont déterminants sur le temps de sortie de la molécule (voir figure 5.8). Le fluorophore (2) a donc un temps de sortie plus long que celui du fluorophore (1).

En reprenant les échantillons de la section 5.2.4, et après saturation avec l'éthanethiol, des lectures du nombre d'unités de diacide ont pu être établies. Le tableau V.1 démontre les résultats obtenus.

Tableau V.1 : Résultats de l'électrophorèse capillaire et des tests de fluorescence pour le fluorophore (2).

| nb éq. de diacide | nb d'unité du diacide | I _F correspondant |
|----------------------|--------------------------|---------------------------------|
| 2,25 | 1541082 | 305 |
| 2,00 | 1490311 | 270 |
| 1,75 | 1313689 | 176 |
| 1,50 | 1119096 | 126 |
| 1,25 | 0929987 | 095 |
| 1,00 | 0746320 | 078 |
| 0,75 | 0560822 | 054 |
| 0,50 | 0374852 | 032 |
| 0,25 | 0194390 | 026 |
| 0,00 | 0000000 | 000 |

Ici, la colonne du nombre d'unités du monoacide n'a pas été écrite pour la bonne raison que celui-ci est inexistant. Ceci implique deux phénomènes. Premièrement, l'activation décrite pour le fluorophore (1) est toujours présente, mais pour (2), elle est importante à tel point que le produit monoacide est inexistant (la vitesse de l'ajout du premier thioacide est donc extrêmement plus lente que l'ajout du second). Deuxièmement, cela implique que la deuxième

hypothèse décrite à la page 61 est la bonne et que, par conséquent un effet d'atténuation très important est présent au sein même de la structure moléculaire non substituée.

La figure 5.9 présente le graphique de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre d'unités de diacide. L'effet d'atténuation est toujours présent puisque pour un nombre d'unités donné de produit diacide, la fluorescence est sous-évaluée (ligne pleine) ; comparativement au produit caractérisé (ligne en pointillés). Ce phénomène s'atténue à mesure que le nombre d'unités de diacide augmente, ce qui est logique

puisque le nombre de maléimides non substitués diminue avec le nombre d'équivalents de thioacide. Lorsque la réaction est quasi complète, il est possible de remarquer que la ligne pleine rejoint celle en pointillés, ce qui marque la fin de l'atténuation (l'absence de maléimides non substitués).

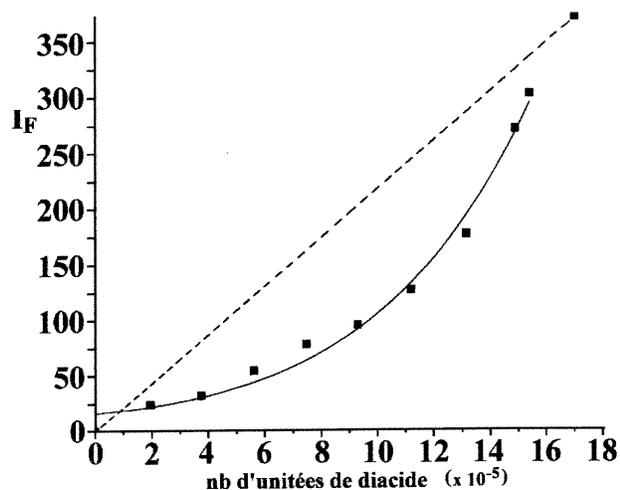


Figure 5.9 : Intensité de fluorescence du fluorophore (2) en fonction du nombre d'unités de diacide.

Même s'il va de soit que le produit monothiolé ne contribue pas à la fluorescence (puisqu'il n'existe pas), les théories énoncées au chapitre 4.3.4 demeurent valables.

À la lumière de ces nouvelles informations, il est possible de conclure que le rendement de la réaction se calcule à l'aide de l'équation :

$$\text{rendement} = \frac{I_{F \text{ obs à 2eq}}}{I_{F \text{ max}}} \times 100$$

De plus, sachant que la valeur de $I_{F \text{ max}}$ est évaluée à 368,4 et que l'intensité observée au plateau est de 308, le rendement de la réaction s'évalue à 84%.

L'étude du produit monothiolé du fluorophore (2) permet de conclure que la fluorescence ne provient pas uniquement du fluorophore lié à deux produits thiolés puisque le produit monothiolé n'a jamais été observé.

5.3 Étude fluorométrique de la bis-maléimidocoumarine avec le dithiol

5.3.1 Test de fluorescence avec le dithiol

Cette section vise à mettre en évidence le comportement du fluorophore (2) en présence de la molécule (4) : un dithiol possédant des soufres distants de 15,8Å (voir figure 5.10). Les conclusions qui en découleront seront extrêmement importantes puisque si une hausse de fluorescence est notable, cela implique que le fluorophore serait en mesure de se lier à deux cystéines possédant des soufres espacés de la même distance (puisque le dithiol a été spécifiquement conçu pour faire cette mimique), mais cela permettra de conclure qu'une absence de hausse de fluorescence, au niveau protéique, ne serait pas due à une défaillance du fluorophore, mais plutôt à une distance inappropriée entre les cystéines et les maléimides du fluorophore (test négatif).

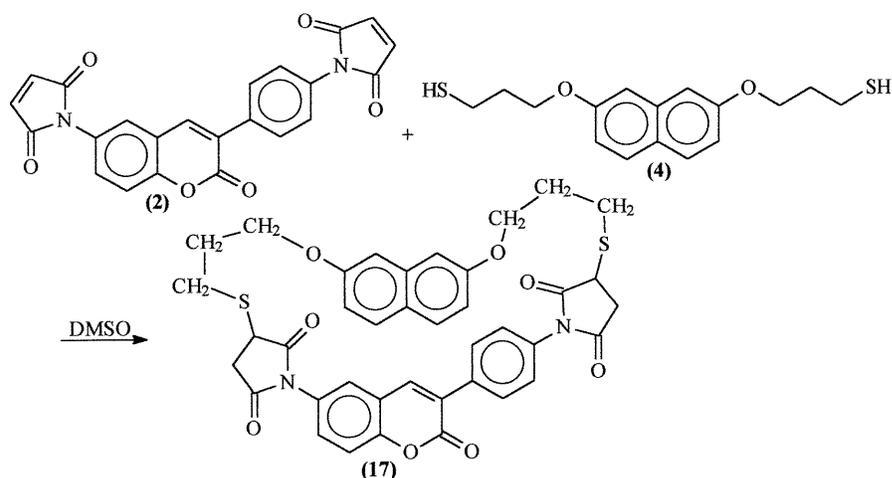


Figure 5.10 : Réaction du fluorophore (2) avec le dithiol (4) pour des fins de détection de fluorescence.

Tel que décrit dans les sections précédentes, les tests ont été réalisés à une concentration de 10^{-3} M de fluorophore dans le diméthylsulfoxyde en réaction avec un équivalent de dithiol (4) à la température de la pièce pour une durée totale de 5 heures. Les spectres d'excitation et d'émission ont ainsi pu être obtenus et sont présentés à la figure 5.11.

Tel qu'espéré, une hausse significative de fluorescence est à signaler (en comparaison avec la section 5.1), ce qui permet de confirmer les hypothèses de départ avancées au début de cette section (le fluorophore réagit avec un dithiol de bonne grandeur).

Ici, il est intéressant de constater que pour la première fois, la bande d'émission est déplacée vers le rouge. En effet, tous les spectres d'émission du fluorophore (1) avec des thiols ou le BMMB présentaient une émission entre 400 et 600nm. Malgré la théorie de la particule dans la boîte et en accord avec l'hypothèse émise à la section 5.2.1, le fluorophore (2) présentait également une bande d'émission entre 400 et 550nm. Par contre, le spectre montré plus bas offre une émission entre 450 et 650nm. Ce déplacement ne peut donc pas être causé par la présence du groupement phényle du fluorophore (2) (puisque dans un pareil cas, l'émission des molécules 15 et 16 aurait également suivi un déplacement vers le rouge).

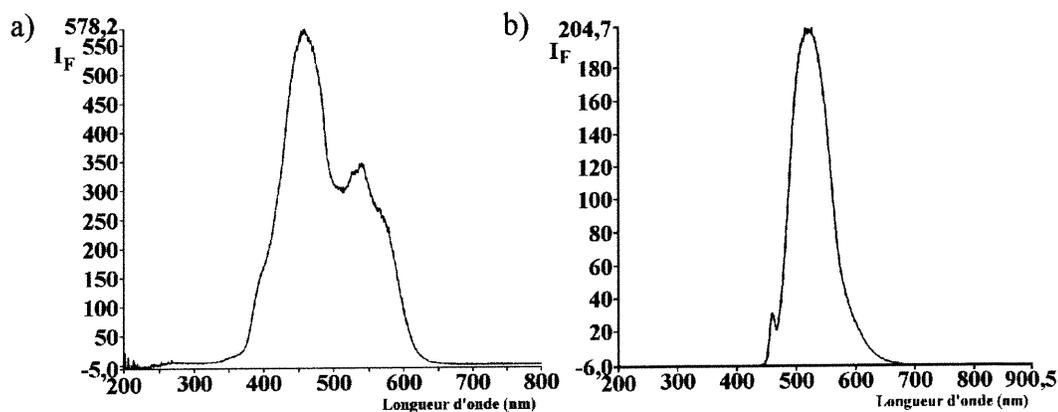


Figure 5.11 : a) Spectre d'excitation de la molécule (17). b) Spectre d'émission de la même molécule (λ excitation = 459,1nm) avec des fentes de 2,5 nm.

L'explication se trouve au niveau de la structure tridimensionnelle de la molécule. En effet, lorsque des orbitales p sont superposées les unes par-dessus les autres, il s'ensuit une stabilisation qui a pour effet d'influencer à la fois la longueur d'onde d'émission et la longueur d'onde d'excitation, un phénomène appelé le " π -stacking"²⁰. La molécule (17) présente un groupement coumarine superposé à un naphthalène (voir figure 5.12), ce qui correspond au phénomène décrit plus haut. Par

contre, même si le BMMB offre des groupements phényles, ceux-ci ne sont pas parallèles à la coumarine dans la molécule (14) (voir figure 4.25), ce qui empêche la stabilisation et, par conséquent, l'absence de modification de la bande d'émission.

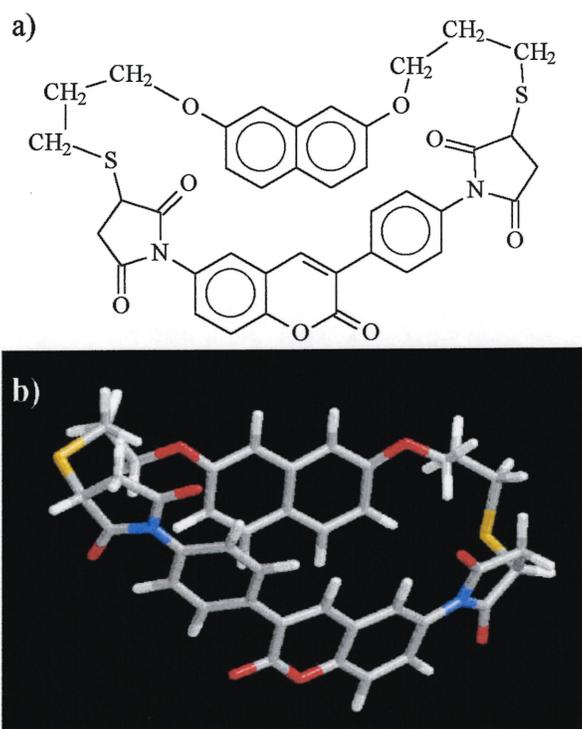
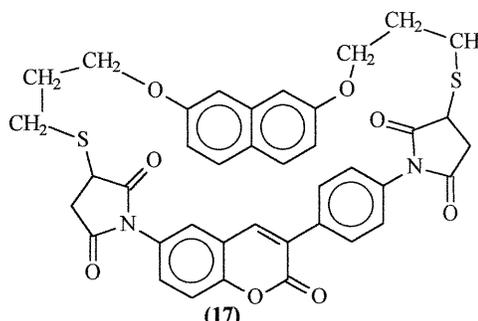


Figure 5.12 : a) Structure de la molécule (17). b) Minimisation stérique de la molécule (17).

Cette section permet de conclure que le macrocycle (17) est fluorescent et possède une bande d'émission légèrement décalée par rapport au macrocycle (14), soit dans une bande de 450 à 650nm.

5.3.2 Caractérisation du macrocycle (17)

Comme il a été fait précédemment, une caractérisation du produit final est réalisée afin de comparer la fluorescence de réaction et la fluorescence maximale (du produit caractérisé) pour ainsi déterminer le rendement de la réaction.



La molécule a donc été synthétisée, isolée et purifiée tel que décrit à la partie expérimentale (chapitre 3). Par la suite, un spectre d'excitation a été pris. Celui-ci n'a pas été fourni puisqu'il est identique au spectre d'excitation présenté à la section précédente (5.3.1). En sélectionnant la longueur d'onde d'excitation maximale, soit 459nm, un spectre d'émission a pu être réalisé tel que démontré à la figure 5.13.

Une intensité de fluorescence de l'ordre de 255 a été obtenue contre un I_F expérimental de 215. Ainsi, à la suite d'une étude du profil de croissance de fluorescence en fonction du nombre d'équivalents de dithiol, un rendement de réaction pourra être établi, ce qui sera fait à la section suivante.

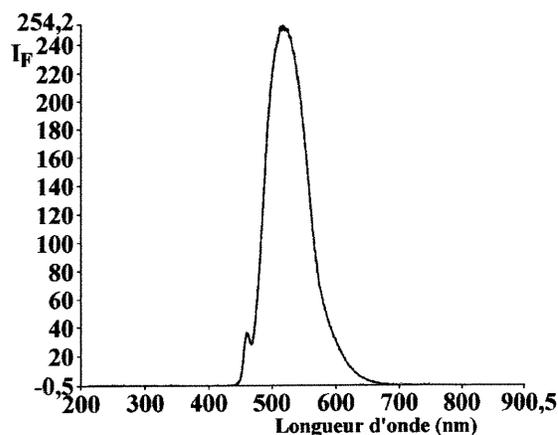


Figure 5.13 : Spectre d'émission du produit caractérisé du fluorophore (2) après réaction avec le dithiol (4), fente = 2,5 nm.

5.3.3 Test de croissance de fluorescence avec le dithiol (4)

Le profil fluorométrique d'une réaction impliquant un fluorophore de type bis-maléimidocoumarine avec un dithiol a été décrit à la section 4.4.4. Par conséquent, un graphique de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre d'équivalents de dithiol devrait offrir une droite jusqu'à une intensité de fluorescence maximale correspondant au I_F du fluorophore caractérisé (en théorie !).

Le profil expérimental est fourni à la figure 5.14. La droite en pointillés représente l'allure théorique de l'augmentation de fluorescence alors que la ligne pleine représente les résultats expérimentaux obtenus.

Il est possible de remarquer que la croissance de fluorescence n'est pas linéaire. Ceci suggère le même type de conclusion qu'à la section 5.2.4, soit une extinction de fluorescence du réactif de départ mais plus faible.

La réaction est complète après l'ajout de 1,04 équivalent de dithiol pour atteindre un plateau d'une valeur de 215. De plus, sachant que la valeur de $I_{F \text{ max}}$

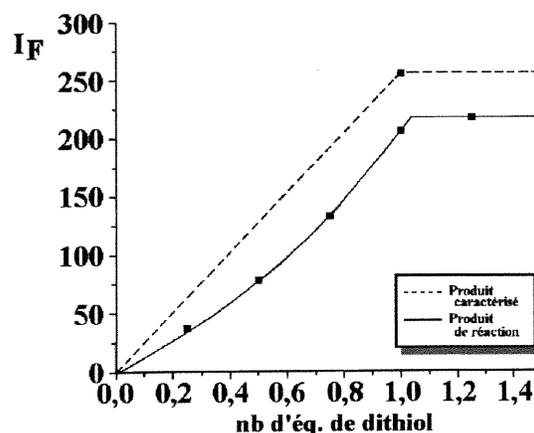


Figure 5.14 : Étude de l'augmentation de l'intensité de fluorescence au cours de la réaction fluorophore (2) en fonction du nombre d'équivalents de dithiol (4).

est de 255 et connaissant le profil de croissance de fluorescence (l'effet quench ne contredit pas la linéarité de la réaction), il est possible de calculer le rendement de la réaction, qui est de 84%.

5.3.4 Test de fluorescence avec le BMMB

Cette étude est un test contrôle qui vise à comprendre ce qui peut se passer par la mise en commun d'un fluorophore (**2**) en présence d'un dithiol (BMMB) de taille inappropriée. Ici, deux événements peuvent se produire. Premièrement, il est possible, dans un premier temps, d'obtenir le fluorophore lié par un seul soufre du dithiol, ce qui ne devrait pas engendrer de fluorescence. Dans un deuxième temps, le maléimide libre du fluorophore pourrait se lier à une deuxième molécule de dithiol pour ainsi émettre de la fluorescence (voir figure 5.15).

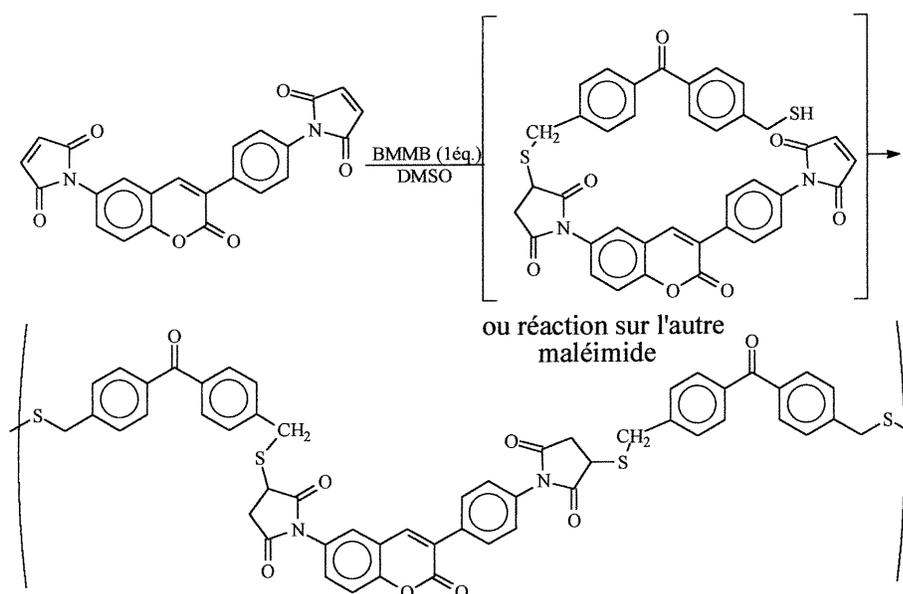


Figure 5.15 : Réaction du fluorophore (2) en réaction avec le BMMB et menant à la plus petite unité fluorescente possible.

La plus petite unité fluorescente serait donc le fluorophore lié à deux molécules de BMMB. Or, puisque celles-ci présentent un autre soufre (à leurs extrémités), il est peu probable que cette structure ne subisse pas de polymérisation. Afin de s'en assurer, un spectre d'excitation et d'émission a été pris à une concentration de 10^{-3} M et avec une fente de 0 nm (voir figure 5.16).

La seconde hypothèse semble donc être la bonne. Or, afin de s'en assurer, un spectre de masse a été réalisé et aucun pic ne correspond au fluorophore seul ou au fluorophore lié à un ou deux dithiols, ce qui corrobore l'hypothèse de la polymérisation. (Des tests de dilution n'ont jamais permis de minimiser la polymérisation).

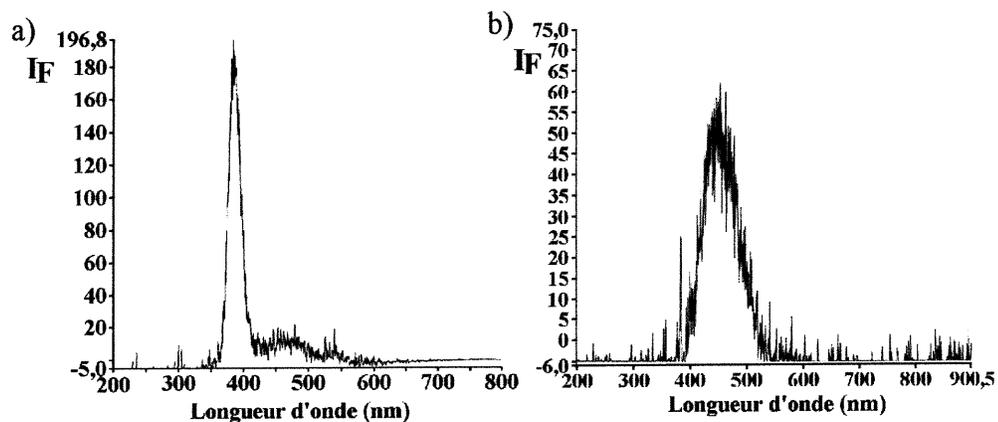


Figure 5.16 : a) Spectre d'excitation et b) spectre d'émission du fluorophore (2) en réaction avec le BMMB.

5.4 Comportement du fluorophore (2) dans des solvants polaires et étude de dilution

Afin d'éviter plusieurs tests inutiles et sachant que le fluorophore (1) sera testé à une concentration de 10^{-6} M, les études ont été réalisées essentiellement à cette concentration.

Contrairement au fluorophore (1) qui pourrait réagir même s'il n'était pas soluble dans le solvant (dilution partielle et produit final soluble), il semble que le fluorophore (2) se comporte différemment. En effet, l'absence de solubilité a révélé une absence de réaction pour tous les échantillons. Ainsi, la première étape consistait donc à faire une étude de solubilité. Les résultats sont rapportés au tableau V.2.

Tableau V.2: *Étude de solubilité du fluorophore (2) dans les solvants DMSO-tampon phosphate, pH=7,2.*

| Solvant | Concentration | | | |
|-----------------------|---------------|-------------|-------------|-------------|
| | 10^{-3} M | 10^{-4} M | 10^{-5} M | 10^{-6} M |
| MeOH 10% / Tampon 90% | Insoluble | Insoluble | Soluble | Soluble |
| MeOH 20% / Tampon 80% | Insoluble | Insoluble | Soluble | Soluble |
| MeOH 30% / Tampon 70% | Insoluble | Insoluble | Soluble | Soluble |
| MeOH 40% / Tampon 60% | Insoluble | Soluble | Soluble | Soluble |
| MeOH 50% / Tampon 50% | Insoluble | Soluble | Soluble | Soluble |
| MeOH 60% / Tampon 40% | Insoluble | Soluble | Soluble | Soluble |

Puisque l'échantillon est soluble dans le solvant MeOH 10% / Tampon 90% à 10^{-6} M, il sera possible d'effectuer l'étude d'apposition dans ces conditions.

6 Conclusion générale

Tel qu'espéré en introduction, il a été possible de construire un fluorophore possédant deux groupements réactifs au soufre dont la fluorescence basale est très faible. Lorsque lié à des thiols ou à un dithiol de distance appropriée, une fluorescence importante est visualisable. De plus, malgré de légers problèmes de solubilité, la molécule peut réagir dans des solvants aussi polaires que MeOH 10% - tampon phosphate 90% et à une dilution de l'ordre de 10^{-6} M.

De plus, un second fluorophore, spécifiquement conçu pour ne pas réagir avec les protéines, a été établi. En effet, l'espacement entre les groupements réactifs aux soufres devrait être inadéquat dans ce système, de tel sorte qu'il serait possible de procéder à un test négatif qui empêcherait de croire à une fluorescence fortuite de la part du fluorophore de taille adéquate (car, bien sûr, ce fluorophore serait idéal en cas d'espacement de Cys à 16Å entre deux protéines).

À la lumière de ces données, il est possible de conclure que l'élaboration d'un fluorophore permettant une étude d'apposition protéique a bel et bien été établie.

Les études protéiques qui s'y rattachent seront réalisées prochainement.

7 Autres expériences à envisager

Bien que les fluorophores permettent de procéder à une étude d'apposition de protéines, il faut souligner que leur solubilité en milieu aqueux est très restreinte. Ainsi, il pourrait être intéressant de refaire ces expériences avec les mêmes fluorophores mais, cette fois, en y greffant un groupement polaire qui accroîtrait la solubilité (voir figure 7.1).

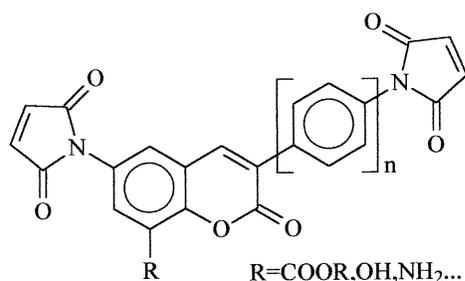


Figure 7.1 : *Expérience future, dans le but d'augmenter la solubilité des fluorophores.*

Il faut toutefois garder à l'esprit que des tests *in vivo* seront éventuellement réalisés. L'apposition protéique pourrait donc être détectée à l'intérieur même d'une cellule. Par le fait même, le groupement R est limité quant à sa nature. Les groupements nitro par exemple sont très toxiques pour les cellules. De plus, le fluorophore doit être de nature suffisamment apolaire pour traverser la membrane cellulaire.

Une autre série de fluorophores pourrait également être réalisée en utilisant des valeurs de n supérieures à 1. Le groupement espaceur phényle pourrait même se trouver sur les deux maléimides (voir figure 7.2).

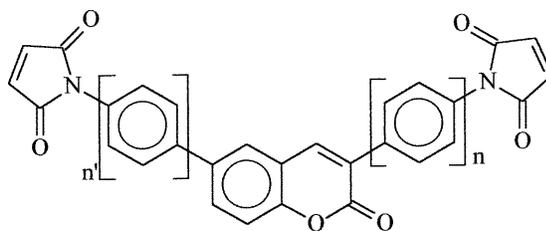


Figure 7.2 : *Groupement espaceur localisé sur les deux fonctions maléimides des fluorophores.*

Une banque complète de fluorophores pourrait alors être établie en portant des groupements réactionnels maléimides espacés de $\approx 11 \text{ \AA}$ (lorsque n et $n' = 0$) à des valeurs très grandes (dépendant de la nature des n). Des appositions entre des protéines de nature diverse pourraient ainsi être suivies.

8 Références

1. Solomon D., (1981) *Anatomie et physiologie humaines*. Hillsborough Community College, Mc Graw – Hill
2. Pitcher J.A., Freedman N.J., Lefkowitz R.J., (1998) *Annu Rev Biochem.* **67**. 653-692
3. Hunter R., (2000) *Cell* **100**. 113-127
4. Gingras A.C., Raught B., Sonenberg N., (1999) *Annu Rev Biochem.* **68**. 913-963
5. Myers L.C., Kornberg R.D., (2000) *Annu Rev Biochem.* **69**. 729-749
6. Waga S., Stillman B., (1998) *Annu Rev Biochem.* **67**. 721-751
7. Grandori C., Cowley S.M., James L.P., Eisenman R.N., (2000) *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 653-699
8. Strasser A., O'Connor L., Dixit V.M., (2000) *Annu Rev Biochem.* **69**. 217-245
9. Klemm J.D., Schreiber S.L., Crabtree G.R., (1998) *Annu Rev Immunol.* **16**. 569-592
10. Aronheim A., Zandi E., Hennemann H., Elledge S.J., Karin M. (1997) *Mol Cell Biol.* **17**. 3094-3102
11. Blakely B.T., Rossi F.H., Tillotson B., Palmer M., Estelles A., Blau H.M., (2000) *Nat Biotechnol.* **18**. 218-222
12. Rossi F., Charlton C.A., Blau H.M., (1997) *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**. 8405-8410
13. Fields S., Song O., (1989) *Nature* **340**. 245-246
14. Vidal M., Legrain P., (1999) *Nucleic Acids Res.* **27**. 919-929
15. Legrain P., Selig L., (2000) *FEBS Lett.* **480**. 32-36
16. Johnson N., Varshavsky A., (1994) *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**. 10340-10344
17. Stagljar I., Korostensky C., Johnson N., Hessen S., (1998) *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**. 5187-5192
18. Rojo-Niersbach E., Morley D., Heck S., Lehming N., (2000) *Biochem J.* **348**. 585-590
19. Xu Y., Piston D.W., Johnson C.H., (1999) *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**. 151-156
20. Wilson T., Hastings J.W., (1998) *Annu Rev Cell Dev biol.* **14**. 197-230
21. Pelletier J.N., Campbell-Valois F.-X., Michnick S.W., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**. 12141-12146

22. Pelletier J.N., Arndt K.M., Pluckthun A., Michnick S.W., (1999) *Nat. Biotechnol.* **17**. 683-690
23. Arndt K.M., Pelletier J.N., Muller K.M., Alber T., Michnick S.W., Pluckthun A., (2000) *J. Mol. Biol.* **295**. 627-639
24. Remy I., Michnick S.W., (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**. 5394-5399
25. Remy I., Wilson I.A., Michnick S.W., (1999) *Science.* **283**. 990-993
26. Selvin P.R., (2000) *Nat. Struct Biol.* **7**. 730-734
27. Mahajan N.P., Linder K., Berry G., Gordon G.W., Heim R., Herman B., (1998) *Nat. Biotechnol.* **16**. 547-552
28. Ullmann A., Jacob F., Monod J., (1967) *J. Mol. Biol.* **24**. 339-343
29. Ladurner A. G., Itzhaki L. S., de Prat Gay G., Fersht A. R., (1997) *J. Mol. Biol.* **273**. 317-329
30. de Prat Gay G., Ruiz-Sanz J., Fersht A. R., (1994) *Biochemistry.* **33**. 7963-7970
31. Shiba K., Schimmel P., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**. 1880-1884
32. Griffin B. A., Adams R. S., Tsien Y. R. (1998) *Science.* **281**. 269-272
33. Whittaker V.P., (1947) *J. Biochem.* 41-56
34. Webb E.C., Van Heyningen R., *ibid.* 74
35. Kalef E., Gitler C., (1994) *Methods Enzymol.* 233-395
36. Merutka G., Shalongo W., Stellwagen E., (1991) *Biochemistry.* **30**. 4245
37. Lowe W.G., Hamilton C.S., (1935) *J. Am. Chem. Soc.* **57**. 1081
38. Spang C., Edelman F.T., Noltemeyer M., Roesky H.W., (1989) *Chem. Ber.* **122**. 1247
39. Voet D., Voet J. G., (1990) *Biochemistry.* University of Pennsylvania, Wiley J
40. Kammerer R. A., Schulthess T., Landwehr R., Lustig A., Engel J., Aebi U., Steinmetz M. O., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**. 13419-13424
41. Langmuir M. E., Yang J.-R., Moussa A. M., Laura R., LeCompte K. A., (1995) *Tetrahedron Letters.* **36**, 3989-3992
42. Yang J.-R., Langmuir M. E. (1991) *J. Heterocyclic Chem.* **28**. 1177
43. Trivedi K., Sethna S., (1960) *J. Org. Chem.* **25**. 1817
44. Kokotos G., Tzougraki C., (1986) *J. Heterocyclic Chem.* **23**. 87
45. March J., (1985) *Advanced Organic Chemistry.* 3rd edition

46. Blazevic N., Kolbah D., Belin B., Sunjic V., Kajfez F., (1979) *Synthesis*. 161-176
47. Golden J. H., (1961) *J. Chem. Soc.* 1604
48. Podkoscielny W., Kultys A., (1997) *Angew. Makromol. Chem.* **246**. 71-83 (Nr. 4285)
49. Connerade, (1933), *Bull. Soc. Chim. Belges.* **42**. 311
50. Lakowicz J.R., (1999) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2^e edition
51. Harris D.C., *Quantitative chemical analysis*, 4^e edition

Annexe

Équations pour déterminer les rendements de réaction.

Il a été démontré que

$$\% \text{ produit disoufré} = \frac{I_{\text{Fobs à 2eq}} - I_{\text{F à 1 éq}}}{I_{\text{Fmax}} - I_{\text{F à 1 éq}}} \times 100$$

Or, si la première hypothèse est la bonne, le produit monothiolé a une valeur de 50% de la valeur de I_{F} maximale.

$$\text{Ainsi, } I_{\text{F à 1eq}} = \frac{1}{2} I_{\text{Fmax}}$$

Par conséquent :

$$\begin{aligned} \% \text{ produit disoufré} &= \frac{I_{\text{Fobs à 2eq}} - \frac{1}{2}I_{\text{Fmax}}}{I_{\text{Fmax}} - \frac{1}{2}I_{\text{Fmax}}} \times 100 \\ &= \frac{I_{\text{Fobs à 2eq}} - \frac{1}{2}I_{\text{Fmax}}}{\frac{1}{2}I_{\text{Fmax}}} \times 100 \\ &= \left(\frac{I_{\text{Fobs à 2eq}}}{\frac{1}{2}I_{\text{Fmax}}} - 1 \right) \times 100 \end{aligned}$$

De plus, si la seconde hypothèse est la bonne, c'est-à-dire que le produit monothiolé est non fluorescent et facilite l'ajout d'un deuxième thiol, alors :

$$I_{\text{F à 1eq}} = 0$$

Par conséquent :

$$\% \text{ produit disoufré} = \frac{I_{\text{Fobs à 2eq}}}{I_{\text{Fmax}}} \times 100$$